

**AG490 PROMUEVE  
LA ACUMULACIÓN  
DE HIF-1 $\alpha$   
POR INHIBICIÓN  
DE SU  
HIDROXILACIÓN**



**TESIS DOCTORAL**  
**Ruth Fernández Sánchez**  
**IIS – Fundación Jiménez Díaz**  
**Madrid, 2013**







*Facultad de Medicina*  
*Departamento de Medicina*

**AG490 PROMUEVE LA ACUMULACIÓN DE  
HIF-1 $\alpha$  POR INHIBICIÓN DE SU  
HIDROXILACIÓN**

**TESIS DOCTORAL**

Ruth Fernández Sánchez  
Laboratorio de Nefrología e Hipertensión  
IIS – Fundación Jiménez Díaz  
Madrid, 2013





D. Alberto Ortiz Arduán, Doctor en Medicina, Jefe Asociado del Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz y Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y D. Juan José Peña Deudero, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Alfonso X el Sabio.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “*AG490 promueve la acumulación de HIF-1 $\alpha$  por inhibición de su hidroxilación*”, que presenta Dña. Ruth Fernández Sánchez, licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid para obtener el Grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne todos los requisitos exigidos de calidad y originalidad, autorizándola para su presentación al Tribunal Calificador.

En Madrid, a 09 de septiembre de 2013

Fdo. Prof. Dr. Alberto Ortiz Arduán  
Codirector de la Tesis Doctoral

Fdo. Dr. Juan José Peña Deudero  
Codirector de la Tesis Doctoral



*A mis padres*





## *AGRADECIMIENTOS*



A todas las personas que habéis estado a mi lado todo este tiempo y que, directa o indirectamente, habéis hecho posible este trabajo, gracias.

Gracias, al doctor *Carlos Caramelo*, por reorientar mi trabajo e invitarme a formar parte de su equipo. - Seguramente, por el tiempo que ha pasado, ésta sea la última tesis iniciada en tu laboratorio y aunque no has llegado a ver los resultados, forman parte de ti. No lo olvidaré. Ojalá que allá donde te encuentres, los sientas como tuyos y de alguna manera emerja el orgullo de quien ha dedicado su vida a la labor investigadora.

Al doctor *Alberto Ortiz*, por tu valentía al enfrentarte a un proyecto, el mío, cuando yo pensaba que no tenía buenas perspectivas; por orientarme y guiarme hasta el final; por el tesón y la constancia que me has transmitido. Gracias, por *dar en el clavo* más allá de las cuestiones científicas.

A *Juanjo*. Juanjo, qué adjetivos añado a quien me ha brindado el descubrimiento que inicia esta tesis; a quien me ha acompañado intelectualmente en su desarrollo incluso desde la distancia. Por ello, esta tesis es también tuya. Me has aportado tu capacidad analítica y tu perfeccionismo. Enhorabuena también por su primera tesis doctoral desde ese lado al doctor *P. Deudero*.

A la *Fundación Conchita Rábago*, en especial a Marta Jiménez, por permitir que jóvenes como yo, cuando empecé, puedan formar parte de la CIENCIA, una pasión que de alguna manera sigue orientando mis pasos. Al *Instituto de Salud Carlos III*, a la *Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo* y a la persona cuyos fondos personales, y confianza en el trabajo del Dr. Caramelo, contribuyeron desinteresadamente a la realización de esta tesis; - deseo que algún día la investigación pueda responder a sus preguntas-. A todos ellos mi agradecimiento por su generosidad.

A los doctores *Ayuso, Egido y Tejedor* por su preocupación y dedicación al laboratorio de Nefrología e Hipertensión en los momentos difíciles. Muy especialmente a ti *Carmen*, por tu incombustible energía y por hacerme un hueco en tu equipo, un privilegio que me ha abierto nuevas posibilidades. Ni olvido, ni olvidaré la gran lección que me has dado: recordarme de dónde vengo y a dónde voy.

A los compañeros con los que empecé: Elena, Lourdes, Junior, Carolina, Beatriz. Y los que han sido mis cómplices: Rosa, Laura, Charo, Elise y Blanca.

A mis *colegas del laboratorio de Nefrología* por haber compartido conmigo vuestro tiempo y esfuerzo: María Ángeles, Frank, Juanjo, Nando, Olalla, Chuache, Alai, Eva, María, Lola, Curra. A todos tengo mucho que agradecer. A Nando, por lo que no dices; a Frank por estar a mi lado en los momentos más difíciles; a Sergio por hacer las comidas más “ligeras” y regalarme ese collage que me recuerda lo divertido que es estar de viaje con vosotros; A Olalla, por estar a mi lado, por ser mi amiga y decir con cariño lo que tienes que decir; siempre lo haces todo más fácil.

A los que me han mantenido en contacto con el exterior: Juan, Bea S, Laura, Iris, Bea C, Pía, Cristina, Blanca, Sara, Mati, Carlos, Bea N, Beñat, Álvaro, Elisa, y a los “laboratorios de la cuarta”.

A los profesionales y compañeros con los que comparto el día a día en el *Servicio de Genética*: Isa, Carmen R, Marta RA, Rosa, Miguel, Marta C, Camilo, Jesús, Chony, Rocío, Sorina, Clara, Raquel, Sara, Cristina, Fiona, Patricia, Olga, Noelia, Iker, Pilar, Aurora, Fernando, Rocío, Laura, Nieves, María y a los que volaron: Mónica S, Berta, Mónica M, Diego, Esther, Jana, María, Elena, Tere. Trabajar con vosotros es una motivación. Especialmente a *María José* por confiar siempre en mí, en que esto terminaría y recordármelo a la mínima oportunidad; a *Ana*, por tu serenidad; a *Almu* por la seguridad que me brindas, por la certeza de contar siempre con tu mano abierta.

A mis *chicas*, por atender bastante más que al teléfono: Elena, Mónica, Laura M, Pilar, Conchi, Cristina G, Cristina M, Cristina P, Alba, Merce, Bea, Laura P, Marta y Tamara. Sois muy especiales; os debo vuestro ánimo para llegar hasta aquí. A *Eva*, a *Teresa*, a *Manuel*; gracias por lo que hacéis.

A *María Luisa, Silvia, Mayte, Sofía, Adela, Arancha, Esther, María José*. Teneros como amigas y seguir creciendo a vuestro lado es una gran fortuna. *Laura, Elisa* gracias por incorporaros más tarde a este listado. Gracias *Ángela*, por tu apoyo desde Rapid City.

A *Belén*, por los dos años enteros y constantes de apoyo; por intentar hacer algo muy difícil de hacer, gracias.

A mi *gran familia*: a mis abuelas, a mis tíos (Maricarmen, Pedro, Ramón, Carlos, Pablo, Almudena, Emilio, Jose, Eduardo, Loli, Merce, Verónica, Pilarín y los que han tenido el valor de añadirse); a mis primas y primos. Formar parte de una familia como la vuestra y teneros cerca es el mejor regalo. No sé si sabéis lo importantes que sois para mí.

Tendría muchas cosas por las que daros las gracias a cada uno de vosotros; lo que no tengo es tanto espacio.

Y sobre todo:

A ti *Marta*, por ser mi asombrosa opuesta y complementaria; porque tienes muchas lecciones que darme; porque tu forma de ver la vida transforma lo pequeño y lo grande en algo muy valioso, sencillez. La sencillez de tu carácter es un bastón cuando me quiebro.

A *mis padres*, porque sois un ejemplo de nobleza, constancia, elegancia, fortaleza y honestidad; no se puede ser más afortunada. Gracias papá por tener el don de convertir mis lágrimas en una sonrisa y estar ahí para enseñarme a levantarme en cada tropiezo. Gracias mamá por ser una mujer excepcional en todas sus formas, madre, amiga, trabajadora, compañera, hermana. Siempre estás conmigo, a mi lado, en todo lo que hago.

Ruth Fernández Sánchez

Madrid, 03 de octubre de 2013



## *ÍNDICE*





Clave de abreviaturas	IX
Índice de figuras	XIX
Índice de tablas	XXV
<i>1. INTRODUCCIÓN</i>	1
1.1. Anatomía y fisiología renal	3
1.2. Daño renal agudo	7
1.3. Isquemia	8
1.4. Hipoxia	10
1.4.1. Factor inducible por hipoxia	10
1.4.1.1. HIF-1 $\alpha$	15
1.4.1.2. HIF-2 $\alpha$	16
1.4.1.3. HIF-3 $\alpha$	17
1.4.1.4. ARNTs	17
1.4.2. Regulación de HIF-1 $\alpha$	18
1.4.2.1. Regulación dependiente de O <sub>2</sub>	18
Prolil hidroxilasas	18
OS-9	19
ARD1	19
Proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau	20
Ubiquitina	21
Proteasoma	23
Factor inhibidor de HIF (FIH)	23

1.4.2.2. Regulación independiente de O <sub>2</sub>	23
1.5. VEGF	26
1.6. Tirfostinas	29
1.6.1. Tirfostinas como inhibidores de PTKs	29
1.6.2. Estructura de las tirfostinas	30
1.6.3. Otras funciones de las tirfostinas	32
1.6.3.1. Tirfostinas como inhibidores de GC	32
1.6.3.2. Tirfostinas como inhibidores de la respiración celular	35
1.6.3.3. Tirfostinas antioxidantes	37
1.6.3.4. Tirfostinas que interaccionan con metales	38
1.6.3.5. Tirfostinas que estimulan la expresión de genes	38
1.7. AG490	40
1.7.1 Acciones descritas de AG490	40
1.7.1.1. AG490 inhibe EGFR	40
1.7.1.2. AG490 inhibe JAKs	41
Janus quinasas	43
1.7.1.3. AG490 inhibe otros receptores con actividad tirosina quinasa	44
1.7.1.4. AG490 inhibe GCs y ACs	44
1.7.1.5. Acciones descartadas de AG490	45
1.7.2. AG490 en el daño renal agudo	45
1.7.2.1. AG490 en el daño renal agudo por isquemia reperusión	49
1.7.2.2. AG490 en el daño renal agudo inducido por sepsis	50
1.7.2.3. AG490 en el daño renal agudo asociado a ciclosporina	51
1.7.2.4. AG490 en el daño renal agudo inducido por cisplatino	51

1.7.3. Posibles implicaciones biológicas y fisiopatológicas de la acción de AG490 sobre HIF-1 $\alpha$	52
1.7.3.1. Anemia y eritropoyesis	52
1.7.3.2. Enfermedad cardiaca	53
1.7.3.3. Ictus	53
1.7.3.4. Patología tumoral	54
1.7.3.5. Patología retiniana	54
1.7.3.6. Preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado	54
1.7.3.7. Tabaco/Humo	55
1.7.3.8. Heridas	55
2. <i>OBJETIVOS</i>	57
2.1. Objetivo general	59
2.2. Objetivos específicos	59
3. <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	61
3.1. Cultivos Celulares	63
3.1.1. Obtención y cultivo primario de células endoteliales de aorta bovina (CE)	63
3.1.2. Obtención y cultivo primario de células de músculo liso vascular de aorta bovina (CMLV)	64
3.1.3. Cultivo de células epiteliales de túbulo renal porcino (PTEC)	65
3.1.4. Cultivo de células tubulares proximales murinas (MCT)	65
3.1.5. Cultivo de células claras de carcinoma renal (RCC4)	65
3.1.6. Procedimiento experimental general con células	66
3.1.7. Plásmidos, silenciadores y método de transfección de CE	66

Método de transfección de CE	66
Plásmidos de expresión	67
Silenciadores (siARN)	67
3.2. Estudios <i>in vivo</i>	68
3.2.1. Isquemia/Reperusión	68
3.3. Análisis de proteínas	69
3.3.1. Extracción de proteínas	69
3.3.2. Western Blot	69
3.4. Análisis de la expresión génica	70
3.4.1. Extracción de ARN	70
3.4.2. PCR en tiempo real	70
3.5. Medida de creatinina sérica	70
3.6. Análisis histoquímico	71
3.6.1. Inmunofluorescencia y microscopía confocal en CE	71
3.6.2. Inmunohistoquímica y microscopía óptica en tejidos	71
3.7. Estadística	72
3.8. Relación de productos y casa comerciales	73
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>79</b>
4.1. Efecto del AG490 en los niveles de las proteínas HIF-1 $\alpha$ y HIF-1 $\beta$	81
4.1.1. El AG490 incrementa los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$	81
4.1.2. El AG490 no modifica los niveles de la proteína HIF-1 $\beta$	82
4.1.3. El incremento en los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$ es dependiente del tiempo	83
4.1.4. El incremento en los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$ es dependiente	85

de la concentración de AG490	
4.2. Mecanismos de acción del AG490 sobre los niveles de HIF-1 $\alpha$	86
4.2.1. El AG490 no modifica la expresión del ARN mensajero de HIF-1 $\alpha$	86
4.2.2. El AG490 impide la degradación de la proteína HIF-1 $\alpha$	87
4.2.3. Degradación de la proteína HIF-1 $\alpha$ tras la eliminación del AG490	88
4.3. Mecanismo de acción del AG490 como inhibidor de la degradación de HIF-1 $\alpha$	90
4.3.1. El efecto del AG490 sobre el incremento de la proteína HIF-1 $\alpha$ no está mediado por la inhibición de la ruta JAK2/STAT	90
4.3.2. El efecto del AG490 sobre el incremento de la proteína HIF-1 $\alpha$ no está mediado por el receptor del EGF	92
4.3.3. El efecto del AG490 sobre el incremento de la proteína HIF-1 $\alpha$ no está mediado por la inhibición de la GC	94
4.3.4. El efecto del AG490 sobre el incremento de la proteína HIF-1 $\alpha$ no está mediado por la inhibición del proteasoma	95
4.3.5. La ausencia de VHL previene la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$ inducida por AG490	100
4.3.6. El AG490 previene la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$	102
4.4. Consecuencias biológicas del incremento de HIF-1 $\alpha$ inducido por AG490	103
4.4.1. El AG490 incrementa los niveles del ARNm de VEGF en CE cultivadas	103
4.4.2. El AG490 protege del daño renal inducido por isquemia/reperfusión en ratones	106
5. <i>DISCUSIÓN</i>	111
5.1. El AG490 estabiliza HIF-1 $\alpha$ de modo dependiente de la concentración y del tiempo en células tubulares renales, endoteliales y de músculo liso vascular	113
5.2. El efecto de AG490 no es compartido por otras tirfostinas y es independiente de su acción sobre JAK2, EGFR o GC	114

5.3. El efecto de AG490 depende de una mayor vida media de la proteína HIF-1 $\alpha$ por inhibición de la hidroxilación	115
5.4. Efectos biológicos de AG490 mediados por HIF-1	117
5.5. AG490 como un nuevo agente terapéutico en el fracaso renal agudo	118
5.6. Otras aplicaciones terapéuticas de AG490	120
6. <i>CONCLUSIONES</i>	125
7. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	129
8. <i>ANEXO I: PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO</i>	153

## ***CLAVE DE ABREVIATURAS***





8pCPT-GMPc: 8 clorofeniltio GMPc (del inglés *8-(p-chlorophenylthio) cGMP*)

## A

A: base nitrogenada adenina

ADN: ácido desoxirribonucleico

AKI: daño renal agudo (del inglés *acute kidney injury*)

Akt o PKB: proteína quinasa B

ANP: péptido natriurético del atrio (del inglés *atrial natriuretic peptide*)

ARD1: proteína acetiltransferasa 1 (del inglés *N-acetyltransferase arrest-defect 1 protein*)

Arg: aminoácido arginina (R)

Asn: aminoácido asparagina (N)

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNT: translocador nuclear del receptor aril-hidrocarburo (del inglés *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*)

Asn: aminoácido asparagina (N)

ATF3: factor activador de la transcripción 3 (del inglés *activating transcription factor 3*)

ATP: trifosfato de adenosina (del inglés *adenosine triphosphate*)

## B

BCRP: proteína de resistencia al cáncer de mama (del inglés *breast cancer resistance protein*)

bHLH: dominios proteicos del tipo hélice-lazo-hélice básicos (del inglés *basic helix-loop-helix*)

BNIP3: proteína 3 que interacciona con Bcl-2 (del inglés *Bcl-2/adenovirus E1B nineteen Kd interacting protein-3*)

BSA: albúmina de suero bovino (del inglés *bovine serum albumin*)

BSO: butionina sulfoxamina (del inglés *buthionine sulfoxamine*)

## C

C: base nitrogenada citosina

Ca<sup>2+</sup>: ión de calcio (II)

CaCl<sub>2</sub>: cloruro de calcio (II)

CBP: proteína de unión a CREB (del inglés *CREB binding protein*)

cDNA: ADN complementario (del inglés *complementary DNA*)

CE: células endoteliales

CMLV: células de músculo liso vascular

CO: monóxido de carbono

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

Co<sup>2+</sup>: ión de cobalto (II)

CoCl<sub>2</sub>: cloruro de cobalto (II)

C-P4H-I: prolil hidroxilasa del colágeno tipo 1 (del inglés *collagen prolyl-4-hydroxylase type I*)

CREB: factor de transcripción que se une a elementos de respuesta a adenosina monofosfato cíclica en el ADN (del inglés *cyclic adenosine monophosphate response element-binding*)

CsA: ciclosporina A

CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo (del inglés *connective-tissue growth factor*)

Cu(II): cobre (II)

CYP2C11: citocromo P450 2C11

CYP3A6: citocromo P450 3A6

CYP4B1: citocromo P450 4B1

## D

d.s.: desviación estándar

DAB: diaminobencidina

DCS: suero de ternera (del inglés *donor calf serum*)

DMEM: medio de cultivo (del inglés *Dulbecco's modified eagle medium*)

DMSO: dimetil sulfóxido

DPBS: solución tamponada de fosfato de Dulbecco (del inglés *Dulbecco's phosphate buffer saline*)

DTT: ditioneitol

## E

ECL: ensayo de quimioluminiscencia (del inglés *enhanced chemiluminescence*)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EF2: factor de elongación 2 (del inglés *elongation factor 2*)

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés *epidermal growth factor receptor*)

EGTA: ácido etilenglicol tetraacético (del inglés *ethylene glycol tetraacetic acid*)

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial (del inglés *endothelial nitric oxide synthase*)

EPO: eritropoyetina

ERK: familia de quinasas reguladas por señales extracelulares (del inglés *extracellular signal-regulated kinase*)

## F

Fe<sup>+2</sup>: ión de hierro (II)

Fe<sup>+3</sup>: ión de hierro (III)

FeCl<sub>3</sub>: cloruro de hierro (III)

FeSO<sub>4</sub>: sulfato de hierro

FIH: factor inhibidor de HIF (del inglés *factor inhibiting HIF*)

FITC: isotiocianato de fluoresceína (del inglés *fluorescein isothiocyanate*)

## G

G: base nitrogenada guanina

GADPH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GC: guanilato ciclasa

G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos (del inglés *granulocyte colony-stimulating factor*)

GCp: guanilato ciclasas particuladas unidas a membrana

GCs: guanilato ciclasas solubles

GFP: proteína verde fluorescente (del inglés *green fluorescent protein*)

GLUT1: transportador de glucosa -1 (del inglés *glucose transporter 1*)

GLUT3: transportador de glucosa -3 (del inglés *glucose transporter 3*)

GMPc: guanosina monofosfato cíclica

GMPc1: dibutiril GMPc

GMPc2: 8pCPT-GMPc

GPx-3: glutatión peroxidasa 3 (del inglés *glutathione peroxidase*)

GSK-3: glucógeno sintasa quinasa -2 (del inglés *glycogen synthase kinase 3*)

GTP: guanosina trifosfato

## H

H<sup>+</sup>: ión de hidrógeno o protón

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno o agua oxigenada

HAC/AK3: adenilato quinasa 3 (del inglés *adenylate kinase 3*)

HAF: factor asociado a hipoxia (del inglés *hypoxia associated factor*)

HAM'S: medio de cultivo desarrollado por Ham  
HCA: ácido homocisteico (del inglés *homocysteic acid*)  
HIF: factor inducible por hipoxia (del inglés *hypoxia-inducible factors*)  
HIF-1 $\alpha$ : subunidad 1 $\alpha$  del factor inducible por hipoxia  
HIF-1 $\alpha$ -OH: subunidad 1 $\alpha$  del factor inducible por hipoxia hidroxilado  
HIF-1 $\beta$ : subunidad 1 $\beta$  del factor inducible por hipoxia o ARNT1  
HIF-2 $\alpha$ : subunidad 2 $\alpha$  del factor inducible por hipoxia  
HO-1: hemo-oxigenasa 1  
HRE: elementos de respuesta a hipoxia (del inglés *hypoxia-responsive element*)  
HRP: peroxidasa de rábano picante (del inglés *horseradish peroxidase*)  
HSP90: proteína de choque térmico 90 (del inglés *heat shock protein 90*)  
HXK1: hexoquinasa 1  
HXK2: hexoquinasa 2

## I

i.p.: intraperitoneal  
I/R: isquemia/reperfusión  
IC<sub>50</sub>: concentración de inhibición reducida a la media  
ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1 (del inglés *intercellular adhesion molecule 1*)  
ID: dominio regulador (del inglés *inhibitory domain*)  
IgA: Inmunoglobulina A  
IGF2: factor de crecimiento derivado de insulina 2 (del inglés *insulin growth factor 2*)  
IGFBP: proteína transportadora del factor de crecimiento tipo insulina (del inglés *insulin growth factor binding protein*)  
IGFBP-1: proteína transportadora del factor de crecimiento insulínico tipo 1 o proteína placentaria 12 (del inglés *insulin growth factor binding protein-1*)  
IGF1R: receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (del inglés *insulin-like growth factor 1 receptor*)  
IL-1: interleuquina 1  
IL-10: interleuquina 10  
IL-6: interleuquina 6  
IL-7: interleuquina 7  
IL-7R: receptor de interleuquina 7 (del inglés *IL-7 receptor*)

IL-8: interleuquina 8

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible (del inglés *inducible nitric oxide synthase*)

IPAS: proteína inhibidora PAS (del inglés *inhibitory PAS protein*)

IR: receptor de insulina (del inglés *insulin receptor*)

ITF: factor trefoil intestinal (del inglés *intestinal trefoil factor*)

IIS: insulina-transferrina-selenio

## J

JAKs: familia de proteínas quinasas (del inglés *just another kinase*)

JH: región de homología a Jak (del inglés *Jak homology*)

## K

KDa: kilodalton

KH-2: células tubulares renales humanas

KHD: dominio homólogo al dominio quinasa (del inglés *kinase homology domain*)

K<sub>m</sub>: constante de Michaelis-Menten

## L

Leu: aminoácido leucina (L)

LOX: lisil oxidasa

LPS: lipopolisacárido

Lys: aminoácido lisina (K)

## M

MAPK: familia de proteínas quinasas activadas por mitógeno (del inglés *mitogen-activated protein kinase*)

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1 (del inglés *monocyte chemotactic protein-1*)

MCT: células tubulares proximales murinas

MDA: malondialdehído

MDR1: proteína 1 de resistencia a fármacos (del inglés *multidrug resistance related protein 1*)

MEM: medio de cultivo (del inglés *minimum essential media*)

MG132: inhibidor de proteasoma

Mg<sup>2+</sup>: ión de magnesio (II)

MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio (II)

Mn<sup>2+</sup>: ión de manganeso (II)

MnCl<sub>2</sub>: cloruro de manganeso (II)

## N

N<sub>2</sub>: nitrógeno molecular

Na<sup>+</sup>: ión de sodio

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (del inglés *nicotine amide adenine dinucleotide*)

NGAL: lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo

NGFIB: Factor de crecimiento nervioso IB (Nur77 o NR4A1) (del inglés *nerve growth factor*)

Nip3: proteína 3 inductora de neoplasias (del inglés *nineteen kD interacting protein-3*)

NLS: secuencia de localización nuclear (del inglés *nuclear localization signal*)

NO: óxido nítrico

## O

O<sub>2</sub>: oxígeno molecular

ODDD: dominio de degradación dependiente de oxígeno (del inglés *oxygen-dependent degradation domain*)

## P

PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1 (del inglés *plasminogen activator inhibitor -1*)

PAS: dominios proteicos PER / ARNT1 / SIM (del inglés *period homolog / aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 1 / single-minded homolog*)

PBS: solución tamponada de fosfato (del inglés *phosphate buffer saline*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)

PDEs: fosfodiesterasas reguladas por GMPc (del inglés *phosphodiesterase*)

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés *platelet-derived growth factor*)

PDK: piruvato deshidrogenasa quinasa (del inglés *pyruvate dehydrogenase kinase*)

PEPCK: fosfoenolpiruvato de carboxiquinasa (del inglés *phosphoenolpyruvate carboxykinase*)

PFKFB: 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (del inglés *6-phosphofructo-2-kinase / fructose 2,6 bispfosphatase*)

PGF: factor de crecimiento placentario (del inglés *placental growth factor*)

PHD: prolil hidroxilasa (del inglés *prolyl hydroxylase domain*)

PI3K: fosfatidilinositol-3 quinasa (del inglés *phosphatidylinositol 3'-kinase*)

PK: piruvato quinasa (del inglés *pyruvate kinase*)

PKG: proteína quinasa dependiente de GMPc (del inglés *protein kinase G*)

PMA: acetato de forbol miristato (del inglés *phorbol 12-myristate 13-acetate*)

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

Pro: aminoácido prolina (P)

PTEC: células epiteliales de túbulo renal porcinas (del inglés *proximal tubular epithelial cell*)

PTK: proteína quinasa específicas de tirosina (del inglés *protein tyrosine kinase*)

pVHL: proteína von Hippel-Lindau

## R

RACK1: receptor para la proteína quinasa C activada tipo 1 (del inglés *receptor of activated protein kinase C*)

RCC4-VHL-: células claras de carcinoma renal humano deficientes en VHL

RCC4-VHL+: células claras de carcinoma renal humano con el gen VHL reintroducido

ROS: especies reactivas de oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*)

rpm: revoluciones por minuto

RPMI: medio de cultivo (del inglés *Roswell Park Memorial Institute*)

RTK: receptor tirosina quinasa (del inglés *receptor tyrosine kinase*)

## S

SDF-1: factor 1 derivado del estroma (del inglés *stromal cell-derived factor 1*)

SDS: dodecil sulfato de sodio (del inglés *sodium dodecyl sulfate*)

Ser: aminoácido serina (S)

SFB: suero fetal bovino

siARN HIF-1 $\alpha$ : silenciador del mensajero de HIF-1 $\alpha$

siARN  $\emptyset$ : silenciador de secuencia inespecífica

siRNA: silenciador de ARN (del inglés *small interfering RNA*)

STATs: familia de proteínas transductoras de la señal y activadoras de la transcripción (del inglés *signal transducer and activator of transcription*)

## T

T: base nitrogenada timina



TA: temperatura ambiente

TAD: dominio de transactivación (del inglés *transactivation domain*)

TBS: solución tamponada con hidrocloreuro de tris (hidroximetil) aminometano (del inglés *Tris HCl Buffer Saline*)

TBT: solución TBS con Tween (del inglés *Tris HCl Buffer Saline Tween*)

TERT: telomerasa transcriptasa inversa (del inglés *telomerase reverse transcriptase*)

TGF- $\beta$ 3: factor de crecimiento transformante  $\beta$ 3 (del inglés *transforming growth factor  $\beta$ 3*)

TGF- $\beta$ 1: factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (del inglés *transforming growth factor  $\beta$ 1*)

Thr: aminoácido treonina (T)

TIMP-1: inhibidor de la metaloproteínasa 1 de la matriz (del inglés *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1*)

TK: tirosina quinasa (del inglés *tyrosine kinase*)

TPEN: N,N,N,N,tetrakis (2-piridilmetil) etilendiamina (del inglés *Tetrakis-(2-Pyridylmethyl) ethylenediamine*)

TPI: triosa fosfato isomerasa (del inglés *triosephosphate isomerase*)

TWEAK: citoquina de la familia de TNF (del inglés *TNF-like weak inducer of apoptosis*)

Tween: éster de sorbitol polioxietileno

## V

VDU2: proteína deubiquinizadora que interacciona con pVHL (del inglés *pVHL-interacting de-ubiquitylating enzyme*)

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés *vascular endothelial growth factor*)

VEGF-R1: receptor 1 de VEGF

VEGF-R2: receptor 2 de VEGF

VHL -: deficientes en VHL

VHL +: con el gen VHL reintroducido

## W

wt: alelo normal de mayor frecuencia (del inglés *wilde type*)

## Z

Zn(II): zinc (II)

## *ÍNDICE DE FIGURAS*



## 1. Introducción

<i>Figura 1.1.</i> Estructura del riñón	3
<i>Figura 1.2.</i> Estructura de la nefrona	4
<i>Figura 1.3.</i> Estructura del corpúsculo renal	6
<i>Figura 1.4.</i> Proteínas HIF-1 $\alpha$ y HIF-1 $\beta$	15
<i>Figura 1.5.</i> Estructura de la proteína HIF-1 $\alpha$	16
<i>Figura 1.6.</i> Estructura de la proteína HIF-1 $\beta$	17
<i>Figura 1.7.</i> Complejo multienzimático ubiquitin ligasa E3 o complejo supresor tumoral	20
<i>Figura 1.8.</i> Ubiquitinación de proteínas	22
<i>Figura 1.9.</i> Regulación de HIF-1 $\alpha$	25
<i>Figura 1.10.</i> Familia del VEGF y sus receptores	27
<i>Figura 1.11.</i> Señalización de VEGF	27
<i>Figura 1.12.</i> Proteínas Tirosina Kinasas	30
<i>Figura 1.13.</i> Estructura de las tirfostinas	31
<i>Figura 1.14.</i> Estructura de las Guanilato Ciclasas	33
<i>Figura 1.15.</i> Estructura de las tirfostinas inhibidoras de Guanilato Ciclasas	35
<i>Figura 1.16.</i> Estructura de tirfostinas inhibidoras de la respiración celular	36
<i>Figura 1.17.</i> Estructura de tirfostinas que actúan como antioxidantes	37
<i>Figura 1.18.</i> Estructura de las tirfostinas que interaccionan con metales	38
<i>Figura 1.19.</i> Estructura de las tirfostinas que estimulan la expresión de genes regulados por NO y actividad redox	39
<i>Figura 1.20.</i> Estructura química del AG490	40
<i>Figura 1.21.</i> Estructura de JAKs y STATs	44

### 3. Materiales y métodos

<i>Figura 3.1.</i> Obtención de células endoteliales de aorta bovina	64
--	----

### 4. Resultados

<i>Figura 4.1.</i> AG490 aumenta los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$ en núcleo y citoplasma	81
<i>Figura 4.2.</i> AG490 aumenta los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$ en el citoplasma y en el núcleo	82
<i>Figura 4.3.</i> El AG490 no modifica los niveles de la proteína HIF-1 $\beta$	82
<i>Figura 4.4.</i> El AG490 aumenta los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$ en CE de forma dependiente del tiempo	83
<i>Figura 4.5.</i> El AG490 aumenta los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$ en CMLV y PTEC de forma dependiente del tiempo	84
<i>Figura 4.6.</i> El AG490 incrementa precozmente los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$	84
<i>Figura 4.7.</i> El AG490 incrementa los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$ en CE, CMLV y PTEC de forma dependiente de la concentración	85
<i>Figura 4.8.</i> El AG490 no modifica la expresión del ARN mensajero de HIF-1 $\alpha$	86
<i>Figura 4.9.</i> El bloqueo de la síntesis proteica con cicloheximida no impide el incremento de HIF-1 $\alpha$ inducido por el AG490	88
<i>Figura 4.10.</i> Degradación de HIF-1 $\alpha$ tras la eliminación de AG490	89
<i>Figura 4.11.</i> Efectos del AG490 sobre la fosforilación de JAK2	90
<i>Figura 4.12.</i> El efecto de AG490 sobre HIF-1 $\alpha$ no está mediado por la inhibición de JAK2	91
<i>Figura 4.13.</i> Ausencia de efecto de otros inhibidores de tirosina quinasas sobre el incremento de HIF-1 $\alpha$	93
<i>Figura 4.14.</i> Ausencia de efecto de inhibidores de GC y de análogos de GMPc sobre el incremento de HIF-1 $\alpha$ en presencia de AG490	94

<i>Figura 4.15.</i> El MG132 incrementa los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$ en el citoplasma pero no en el núcleo	95
<i>Figura 4.16.</i> El AG490, a diferencia del MG132, permite la translocación de HIF-1 $\alpha$ al núcleo	96
<i>Figura 4.17.</i> El AG490 incrementa ligeramente los niveles ubiquitinación aunque en menor medida que el MG132	97
<i>Figura 4.18.</i> El AG490 aumenta el grado de ubiquitinación de forma independiente de la concentración	97
<i>Figura 4.19.</i> El AG490 no tiene efectos citotóxicos sobre CE en cultivo	98
<i>Figura 4.20.</i> La exposición prolongada a MG132 aumenta la expresión de formas de HIF-1 $\alpha$ de alto peso molecular	98
<i>Figura 4.21.</i> El AG490 no impide la liberación de los monómeros de NF- $\kappa$ B2	99
<i>Figura 4.22.</i> AG490 no incrementa los niveles de HIF-1 $\alpha$ con respecto al basal en células carentes de pVHL	100
<i>Figura 4.23.</i> pVHL es necesaria para la estabilización de HIF-1 $\alpha$ inducida por AG490	101
<i>Figura 4.24.</i> Translocación de HIF-1 $\alpha$	101
<i>Figura 4.25.</i> AG490 previene la hidroxilación de la proteína HIF-1 $\alpha$	102
<i>Figura 4.26.</i> El AG490 incrementa la expresión del ARN mensajero de VEGF	103
<i>Figura 4.27.</i> El siARN HIF-1 $\alpha$ bloquea la traducción del ARNm de HIF-1 $\alpha$	105
<i>Figura 4.28.</i> El siARN HIF-1 $\alpha$ impide el incremento del ARNm de VEGF en presencia de AG490	106
<i>Figura 4.29.</i> El AG490 previene el incremento de creatinina sérica inducido por isquemia/reperfusión en ratones	107
<i>Figura 4.30.</i> El AG490 protege del daño renal inducido por isquemia/reperfusión en ratones	108
<i>Figura 4.31.</i> El AG490 disminuye el daño endotelial inducido por isquemia/reperfusión en riñones de ratones	109

*Figura 4.32.* El AG490 disminuye el estrés oxidativo renal inducido por isquemia/reperfusión en ratones

110

## *ÍNDICE DE TABLAS*





## **1. Introducción**

<i>Tabla 1.1.</i> Productos génicos dianas de HIF	11
<i>Tabla 1.2.</i> Comparación de las prolil hidroxilasas de HIF-1 $\alpha$ con la hidroxilasa de procolágeno 4 tipo I	19
<i>Tabla 1.3.</i> Principales acciones de AG490 sobre la ruta JAK/STAT	42
<i>Tabla 1.4.</i> Principales acciones de las tirfostinas estudiadas en daño renal agudo	47
<i>Tabla 1.5.</i> Principales tirfostinas estudiadas en daño renal agudo in vivo	48

## **3. Materiales y métodos**

<i>Tabla 3.1.</i> Soluciones tamponadas	71
<i>Tabla 3.2.</i> Suplementos de los medios de cultivo	72
<i>Tabla 3.3.</i> Medios de cultivo	73
<i>Tabla 3.4.</i> Reactivos empleados	74
<i>Tabla 3.5.</i> Estímulos empleados durante la experimentación	75
<i>Tabla 3.6.</i> Tampones empleados para la extracción de proteínas	75
<i>Tabla 3.7.</i> Listado de anticuerpos empleados	76



## *INTRODUCCIÓN*



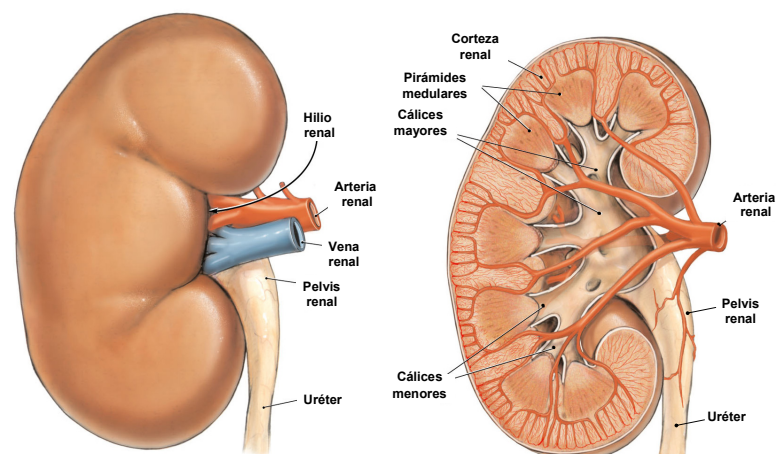
Las células vasculares y las células endoteliales son células diana del daño renal por isquemia. En el transcurso de los estudios sobre nuevos agentes terapéuticos llevados a cabo en el laboratorio dirigido por el Dr. Carlos Caramelo, se observó que una tirfostina, AG490, inducía la expresión de HIF-1 $\alpha$ . Por ello, desarrollamos la hipótesis de que la inducción de la expresión de HIF-1 $\alpha$  podría ser una nueva acción de AG490 de potencial interés terapéutico y decidimos caracterizar esta acción, sus mecanismos moleculares y testar su potencial relevancia terapéutica durante la lesión renal por isquemia/reperfusión.

## 1.1. Anatomía y fisiología renal

Los riñones son órganos vitales cuya función principal es filtrar la sangre del aparato circulatorio y permitir la eliminación, a través de la orina, de diversos residuos metabólicos. Esto se realiza por medio de un complejo sistema que incluye mecanismos de filtración, reabsorción y excreción. Esta función está íntimamente relacionada con el mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base del organismo.

Los riñones desempeñan también un importante papel en la función endocrino-metabólica mediante la liberación de hormonas como:

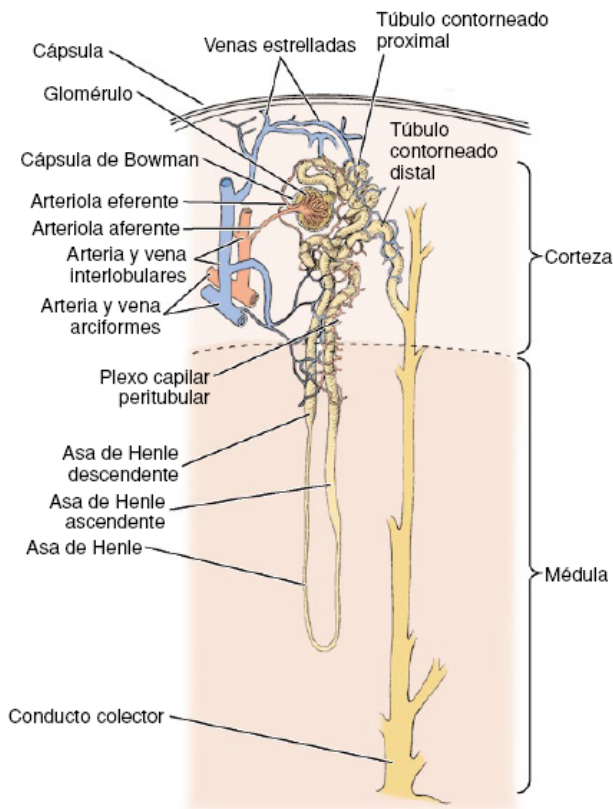
- la eritropoyetina, que estimula la producción de glóbulos rojos,
- la renina y las prostaglandinas, que regulan la presión arterial,
- la forma activa de la vitamina D, esencial en el mantenimiento del calcio y el equilibrio químico, y
- las quininas, mediadores químicos en la vasodilación y el aumento de permeabilidad a proteínas de la respuesta inflamatoria.



**Figura 1.1. Estructura del riñón.** A la izquierda, se observan los vasos sanguíneos penetrando en cada riñón a nivel del hilio y detrás de éstos la pelvis renal, con el uréter, abandonándolo. A la derecha, corte esquemático de riñón que representa la topografía general del órgano y ramificación de la arteria renal en pequeños vasos irrigando los diferentes lóbulos del riñón (reproducido de © MediVisuals, Inc 2007).

## 1. Introducción

Los riñones reciben por minuto aproximadamente una cuarta parte del flujo cardíaco. La sangre es suministrada por medio de la arteria renal. Ésta se ramifica en pequeños vasos que irrigan los diferentes lóbulos del riñón. Una vez la arteria ha penetrado en el riñón, se ramifica a nivel del límite entre corteza y médula del riñón, desde donde se distribuye a modo de radios en el parénquima. Las arterias arciformes irrigan la corteza y dan lugar a pequeñas y numerosas arteriolas que forman los glomérulos. A partir de esta estructura, tras formar varios lóbulos, las arteriolas se reúnen nuevamente en la arteriola eferente que da lugar a una fina red que irriga el correspondiente túbulo que surge de la zona del glomérulo. Estas arterias dispuestas peritubularmente, drenan hacia pequeñas vénulas en venas colectoras más anchas, y finalmente hacia la vena renal y hacia la vena cava.



**Figura 1.2. Estructura de la nefrona.** Constitución de una nefrona en la que se muestra la localización cortical y medular de sus componentes, el sistema de los conductos colectores y la vascularización sanguínea (reproducido de Junqueira y Carneiro: *Histología básica*, © Masson, Barcelona, 2005).

Los riñones eliminan la urea y otros productos de la sangre a través de unas unidades estructurales y funcionales de filtración denominadas nefronas. Cada nefrona está formada por el corpúsculo renal o corpúsculo de Malpighi (formado a su vez por el glomérulo y la cápsula de Bowman), por el túbulo contorneado proximal, por los segmentos delgado y grueso del asa de Henle y por el túbulo contorneado distal. Los corpúsculos de Malpighi y los túbulos proximal y distal son corticales, mientras que el asa de Henle se localiza en la médula (Figura 1.2).

El glomérulo es el responsable de la producción de la orina a partir de la elaboración del ultrafiltrado plasmático. La capacidad de filtración de esta barrera glomerular tiene una doble naturaleza, mecánica y eléctrica. La pared capilar glomerular es una barrera molecular capaz de excluir la mayoría de las proteínas plasmáticas y permitir el paso del agua, de pequeñas moléculas de soluto y de iones.

Entre la sangre y el espacio urinario, una sustancia debe atravesar la barrera de filtración glomerular compuesta por:

- **El endotelio.** Al igual que en el resto de los vasos del sistema vascular el interior de los capilares glomerulares están cubiertos en su superficie interior por células endoteliales. En esta localización el endotelio está perforado por poros o fenestraciones que permiten la separación mecánica de los elementos de la sangre y el plasma. Los poros miden de 70 a 100 nm de diámetro y permiten que el plasma entre en contacto con la membrana basal glomerular. La superficie de la célula endotelial está cargada negativamente por la presencia de una glucoproteína polianiónica, la podocalixina, que es la principal sialoproteína glomerular. La aglomeración de moléculas superficiales aniónicas y las fenestraciones hacen que la membrana plasmática del endotelio glomerular se diferencie de otras membranas plasmáticas endoteliales y la convierten en una membrana no muy selectiva con una capacidad para limitar el paso de macromoléculas no muy eficiente.

- **La membrana basal glomerular.** Es una membrana gruesa, que yace entre el endotelio glomerular y el epitelio visceral impidiendo, de forma mecánica y eléctrica, el paso de macromoléculas. Estudios con dextranos han sugerido que la integridad estructural de la membrana basal glomerular es clave para el mantenimiento de la permeabilidad de la barrera al agua, a pequeños solutos, a iones y a proteínas de pequeño tamaño. Está integrada por tres capas, la lámina interna, la lámina densa y la lámina externa. Las células endoteliales y epiteliales adyacentes secretan moléculas como el colágeno IV, la laminina, la fibronectina, la enactina y proteoglicanos de heparán sulfato en las tres capas que la componen de forma que, una eliminación de estas células adyacentes, incrementan la permeabilidad de la membrana basal glomerular.

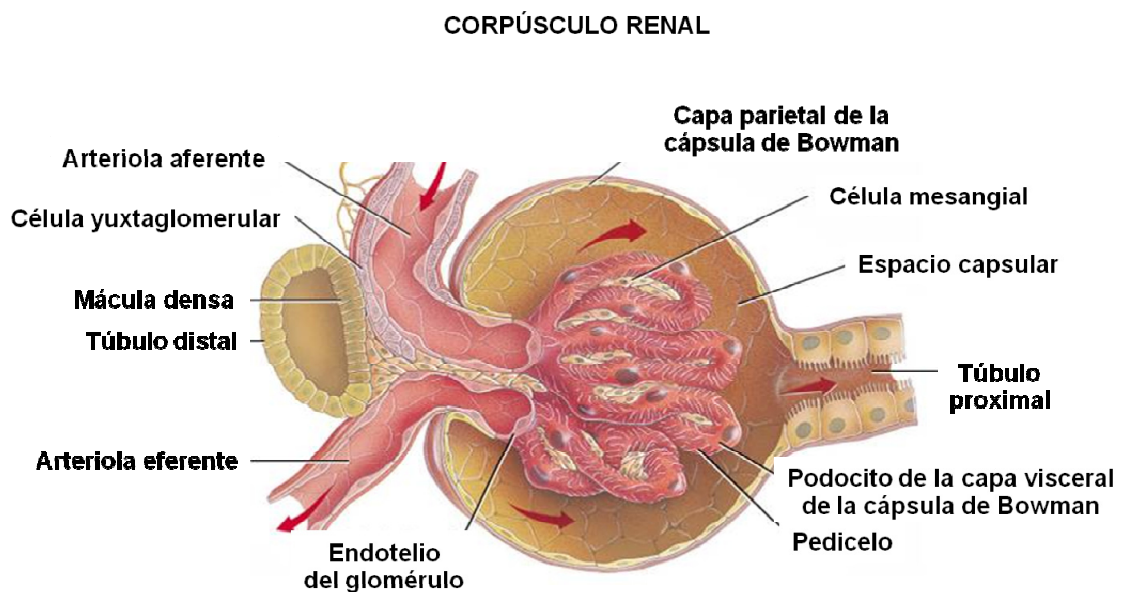
- **El epitelio visceral o podocitos.** Es el tercer elemento de la barrera de filtración glomerular. Los podocitos son células altamente especializadas con una organización celular y citoarquitectura compleja. Recubren el otro lado de la membrana basal formando parte del recubrimiento del espacio de Bowman. La superficie del podocito está dividida en tres dominios con diferentes localizaciones, componentes proteicos y funciones. En cada dominio existen proteínas fundamentales para el mantenimiento y la integridad del mismo y por lo tanto de la estabilidad global de la arquitectura del podocito. Su cuerpo principal se sitúa por encima de la superficie externa del capilar proyectando extensiones citoplásmicas que contactan con la membrana basal, los pedicelos.



- La **célula mesangial intraglomerular** se encuentra en el intersticio que hay entre las células endoteliales del glomérulo. No es parte de la barrera de filtración sino que son pericitos especializados que participan en la filtración de forma indirecta.

Los túbulos renales están recubiertos de células epiteliales polarizadas, críticas en el proceso de filtración y secreción renal. El túbulo contorneado proximal nace del polo urinario glomerular y continúa en la rama fina del asa de Henle. Sus paredes están formadas por una única capa de células cúbicas. Estas células tienen un lado luminal con microvellosidades en “borde de cepillo” ampliamente desarrolladas que incrementan su superficie de reabsorción permitiéndole recuperar entre el 40 y el 60% del ultrafiltrado glomerular. El túbulo proximal reabsorbe el 60-70% del potasio, el 80 % del bicarbonato, el agua y el cloruro de sodio según las necesidades corporales. Esta reabsorción puede ocurrir tanto de forma pasiva, por gradiente químico y eléctrico, como de forma activa, a través de múltiples transportadores.

El Asa de Henle consiste de dos segmentos paralelos conectados por una horquilla. El segmento descendente va desde el túbulo contorneado proximal hacia la horquilla y el ascendente desde la horquilla hasta el túbulo contorneado distal. Posee la capacidad de producir orina hiperosmótica desempeñando un importante papel en la concentración de la orina. El túbulo contorneado distal desemboca en el tubo colector. Es un túbulo más corto que el proximal y de luz más amplia. Sus paredes están formadas también por una única capa de células cúbicas, aunque en esta ocasión son más pequeñas y carecen del ribete en cepillo presente en las células del túbulo proximal y sus funciones principales son la absorción de agua y sodio y la excreción de potasio.



*Figura 1.3. Estructura del corpúsculo renal. Estructura del corpúsculo renal y distribución celular (reproducido de © John Wiley & Sons, Inc).*

## 1.2. Daño renal agudo

El daño renal agudo - AKI (*acute kidney injury*) es un síndrome caracterizado por un daño agudo de las células renales que conduce a la pérdida repentina de la función renal y engloba todos los aspectos del síndrome, desde pequeños cambios en la función renal al requerimiento del trasplante renal<sup>1-3</sup>. En pacientes hospitalizados, pequeños cambios en la función de los riñones están asociados a la progresión en la severidad de la enfermedad y al incremento significativo de la mortalidad a corto o largo plazo<sup>4-6</sup>.

El daño renal agudo está también relacionado con el incremento del riesgo a desarrollar enfermedad renal crónica<sup>7</sup> y/o a la pérdida completa o casi completa de la función renal<sup>8</sup>. La incidencia del daño renal agudo, en población hospitalizada y en pacientes en situación crítica, se ha incrementando en los últimos años y ha alcanzado ya entre el 2000 – 3000 por millón de población al año, para daño renal agudo poco severo, y a 200-300 por millón de población al año para daño renal agudo con necesidad de trasplante<sup>9</sup>. El daño renal agudo representa por tanto un problema en la práctica clínica actual al tener, independientemente de su origen o grado, un fuerte impacto en la morbilidad y mortalidad de los pacientes.

A nivel celular, el daño renal agudo es un complejo proceso que abarca desde el daño subletal de las células a la apoptosis o necrosis de las células tubulares<sup>10-12</sup>. La infiltración de leucocitos, la mayor expresión de factores quimiotácticos y la generación local de mediadores inflamatorios manifiestan que el daño renal agudo tiene un importante componente inflamatorio<sup>13</sup> y que, cambios en la microvasculatura renal, contribuyen al daño tubular<sup>14,15</sup>.

En los pacientes que superan episodios de fracaso renal, existe un proceso de recuperación espontánea en los que las células epiteliales del tubulo renal y células progenitoras mesenquimales y específicas de riñón reemplazan las células perdidas o dañadas<sup>16</sup>. El amplio espectro de moléculas implicadas en las vías de muerte celular y las de reparación y recuperación renal ofrecen diversas dianas terapéuticas de intervención.

A pesar de los avances en el entendimiento de la patofisiología del daño renal agudo, a día de hoy no existen terapias capaces de revertirlo o acelerar su recuperación. Esto se suma a que actualmente no existen marcadores específicos o de alta sensibilidad que nos permitan reconocer el daño renal agudo en sus etapas más tempranas. Técnicas de elevado rendimiento, como son la proteómica y la transcriptómica, han permitido identificar nuevos biomarcadores, como la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL)<sup>17</sup>, que brindan una oportunidad al diseño de terapias específicas dirigidas a los estadios tempranos de la enfermedad y que permitirán un tratamiento profiláctico al daño renal agudo en caso de nefrotoxicidad, trasplante renal o cirugía mayor cardiovascular.

### 1.3. Isquemia

Se denomina isquemia al daño celular causado por la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo y la consecuente disminución del aporte de oxígeno (hipoxia), de nutrientes y la eliminación de productos del metabolismo del tejido biológico. Este sufrimiento celular puede ser suficientemente intenso como para causar la muerte celular y del tejido al que pertenece (necrosis). En la isquemia renal, la reducción del flujo sanguíneo renal (hipoperfusión uni o bilateral) bien por disminución del volumen sanguíneo total, por redistribución de la sangre o por obstrucción originada por complicaciones quirúrgicas, hemorragias, traumatismo, rhabdomiolisis con mioglobinuria, sepsis por gram-negativos, pancreatitis, etc., puede condicionar una insuficiencia renal aguda por necrosis tubular o en casos de obstrucción unilateral (estenosis renal, embolia, etc) dar lugar a una atrofia renal (isquemia crónica).

En este sentido, la isquemia, tanto aguda como crónica, es una causa prevalente de fracaso de la función de los riñones (insuficiencia renal). De hecho, el daño vascular por la arteriosclerosis (nefropatía isquémica) o la hipertensión (nefroangiosclerosis) son algunas de las causas más frecuentes de insuficiencia renal crónica terminal que precisa tratamiento sustitutivo de la función renal mediante diálisis o trasplante. Además, la isquemia renal es, junto con la nefrotoxicidad, la causa más habitual de la forma más frecuente de fracaso renal agudo, la necrosis tubular aguda. El índice de mortalidad, asociada a la necrosis tubular aguda, alcanza el 50% y no existen tratamientos que eviten la lesión o aceleren la recuperación.

Clínicamente existe lesión renal por isquemia, y la subsiguiente reperfusión, en la extracción de riñones que posteriormente van ser utilizados para trasplante. En estos casos la lesión del injerto por la isquemia-reperfusión no sólo complica el tratamiento post-trasplante inmediato sino que además, favorece la antigenicidad del injerto y puede afectar al pronóstico a largo plazo del trasplante.

Entre los procesos que contribuyen al fracaso renal durante la isquemia encontramos el estrés oxidativo y la lesión y la muerte de células endoteliales y tubulares. Cortos periodos de isquemia conducen a una pérdida o fusión de las microvellosidades apicales de las células epiteliales mientras que periodos algo más largos provocan la deposición de las microvellosidades al lumen tubular, la pérdida del citoesqueleto y por último a la muerte celular <sup>18</sup>. Además los complejos de unión intracelulares se interrumpen incrementando la permeabilidad y contribuyendo a la incapacidad del túbulo proximal para reabsorber el sodio <sup>19</sup>. El daño en la microvasculatura también desempeña un papel crítico <sup>14;15</sup>. Las células endoteliales dañadas son capaces de liberar moléculas implicadas tanto en la inflamación como en la activación de leucocitos favoreciendo la progresión de la enfermedad <sup>20-22</sup>.

La recuperación del tejido, tras el daño tubular agudo, es un proceso poco comprendido que implica la liberación de factores de crecimiento, proliferación y diferenciación capaces de restablecer el tejido dañado.

Debido a la implicación de la célula endotelial y de epitelio tubular renal en el daño renal agudo y en la posterior recuperación tisular, hemos centrado este estudio en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas en nefrología en ambos tipos celulares.

### 1.4. Hipoxia

En los organismos aerobios la disponibilidad de oxígeno molecular ( $O_2$ ) es imprescindible para la generación de energía. La fosforilación oxidativa transforma la energía de óxido-reducción mitocondrial de la cadena transportadora de electrones, en la que el  $O_2$  actúa como aceptor final, en enlaces de alta energía en forma de ATP.

Los organismos multicelulares han desarrollado así complejos órganos que les permiten incorporar (pulmones), transportar (sangre) y distribuir (sistema cardiovascular) el  $O_2$  liberándolo a las zonas más internas de los tejidos. El aporte permanente de ésta molécula a las células garantiza su funcionalidad y supervivencia.

No obstante, la disponibilidad de esta molécula y su difusión hacia células alejadas de estos conductos, es fluctuante y las células han desarrollado mecanismos que les permiten adaptarse a los diferentes gradientes. En la última década se han realizado numerosos trabajos dirigidos a la identificación de la maquinaria molecular empleada por la célula para adaptarse a estas variaciones y a su funcionamiento y se ha visto que, el factor inducible por hipoxia es un mediador crítico en esta adaptación celular.

El término hipoxia hace referencia a un estado de baja presión parcial del  $O_2$ , por debajo de un umbral crítico, en los que la respuesta a nivel celular, incluye cambios significativos en la expresión génica de proteínas que regulan la transformación del metabolismo aerobio en glicólisis anaerobia y finalmente el complejo equilibrio entre supervivencia o muerte celular.

#### 1.4.1. Factor inducible por hipoxia

El término “factor inducible por hipoxia” fue acuñado en 1993 por Gregg Semenza para denominar a un complejo de transcripción heterodimérico capaz de unirse, en respuesta a una baja disponibilidad de oxígeno, a elementos de respuesta a hipoxia (HRE, *hypoxia-responsive element*) localizados en el gen de la eritropoyetina <sup>23</sup>.

Actualmente se sabe que los factores inducibles por hipoxia o HIFs (*hypoxia-inducible factors*) son factores de transcripción constituidos por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , también conocida como ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) con unos pesos moleculares aproximados de 120-130 y 91-94 kDa, respectivamente <sup>24</sup>. Ambas subunidades pertenecen a la familia de proteínas denominada bHLH-PAS, contienen dominios de tipo hélice-lazo-hélice básico o bHLH (*basic helix-loop-helix*) <sup>24</sup> y dos dominios PAS, llamados así por las iniciales de las tres primeras proteínas descubiertas que tenían en común dicho dominio (PER (*period homolog*) / ARNT1 / SIM (*single-minded homolog*)) <sup>25,26</sup>. Estos dominios son esenciales para la formación del heterodímero y la unión al ADN <sup>27</sup>.

Los HIFs reconocen en el ADN nuclear la secuencia G/ACGTG <sup>26</sup>, denominada elemento de respuesta a hipoxia o HRE <sup>28-30</sup>, presente en los promotores de un gran

número de genes <sup>31</sup>. Los HIFs se convierten así en reguladores clave de la respuesta hipóxica, activando la transcripción de más de 100 genes cruciales para la adaptación (Tabla 1.1).

PRODUCTO GÉNICO	FUNCIÓN ESPECÍFICA	REF.
Aporte de O <sub>2</sub>		
Eritropoyetina ( <i>EPO</i> )	Eritropoyesis	23;32
Globina-2	Transportador de O <sub>2</sub>	33
Ferroquelatasa ( <i>FECH</i> )	Síntesis del grupo Hemo	34
Proteína de resistencia al cáncer de mama ( <i>BCRP</i> )	Unión del grupo hemo	35
Transferrina ( <i>TF</i> )	Transportador del hierro	36
Receptor de transferrina ( <i>TFRC</i> )	Transportador del hierro	37;38
Ceruloplasmina ( <i>CP</i> )	Oxidasa del hierro	39
Factor de crecimiento del endotelio vascular ( <i>VEGF</i> )	Angiogénesis y supervivencia	40;41
Receptor 1 de VEGF ( <i>Flt-1/VEGF-R1</i> )	Angiogénesis	42
Receptor 2 de VEGF ( <i>Flk-1/VEGF-R2</i> )	Angiogénesis (HIF-2)	43
Leptina ( <i>LEP</i> )	Metabolismo y angiogénesis	44;45
Óxido nítrico sintasa inducible ( <i>iNOS</i> )	Diámetro de vasos sanguíneos	46;47
Óxido nítrico sintasa endotelial ( <i>eNOS</i> )	Diámetro de vasos sanguíneos	48
Hemo-oxigenasa-1 ( <i>HMOX-1</i> )	Diámetro de vasos sanguíneos	49
Endotelina-1 ( <i>EDN1</i> )	Diámetro de vasos sanguíneos	50
Receptor adrenérgico $\alpha_{1B}$ ( <i>ADRA1B</i> )	Diámetro de vasos sanguíneos	51
Adrenomedulina ( <i>ADM</i> )	Diámetro de vasos sanguíneos	52;53
Inhibidor del activador de plasminógeno ( <i>PAI-1</i> )	Flujo sanguíneo y angiogénesis	54;55
Péptido natriurético del atrio ( <i>ANP</i> )	Volumen sanguíneo	56

**Tabla 1.1. Productos génicos dianas de HIF.** Productos génicos más relevantes regulados por HIF, se hace mención a su función fisiológica en la respuesta de adaptación a la disponibilidad de oxígeno <sup>31</sup>.

## 1. Introducción

PRODUCTO GÉNICO	FUNCIÓN ESPECÍFICA	REF.
Metabolismo celular		
Fosfofructoquinasa L ( <i>PFKL</i> )	Glucólisis	57
Aldolasas A y C ( <i>ALDOA / ALDOC</i> )	Glucólisis	26;57
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa ( <i>GAPDH</i> )	Glucólisis	58;59
Fosfoglicerato quinasa 1 ( <i>PGK1</i> )	Glucólisis	26;57
Hexoquinasa 1 ( <i>HXK1</i> )	Glucólisis	60
Hexoquinasa 2 ( <i>HXK2</i> )	Glucólisis	60;61
Piruvato deshidrogenasa quinasa ( <i>PK/PDK1-2-3-4</i> )	Glucólisis	60;62
Enolasa 1 ( <i>ENO1</i> )	Glucólisis	26;57
Lactato deshidrogenasa A ( <i>LDHA</i> )	Glucólisis	32;60
Glucoquinasa ( <i>GCK</i> )	Glucólisis	63
6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-3 ( <i>PFKFB<sub>3</sub></i> )	Regulación de la glucólisis	64;65
6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-4 ( <i>PFKFB<sub>4</sub></i> )	Regulación de la glucólisis	66
Triosa fosfato isomerasa ( <i>TPI</i> )	Glucólisis	67
Fosfoenolpiruvato de carboxiquinasa ( <i>PEPCK</i> )	Gluconeogénesis	68
Transportador de glucosa -1 ( <i>GLUT1</i> )	Aporte celular de glucosa	69;70
Transportador de glucosa -3 ( <i>GLUT3</i> )	Aporte celular de glucosa	71
Anhidrasa carbónica IX ( <i>CA9</i> )	Regulación del pH	72
Glutation peroxidasa 3 ( <i>GPx-3</i> )	Glutation peroxidasa	73
Citocromo P450 4B1 ( <i>CYP4B1</i> )	Síntesis de eicosanoides	74
Citocromo P450 3A6 ( <i>CYP3A6</i> )	Metabolismo xenobiótico	75
Citocromo P450 2C11 ( <i>CYP2C11</i> )	Metabolismo xenobiótico	76
Glucoproteína transmembrana ( <i>MDR1</i> )	Transportador xenobiótico	77
Adenilato quinasa 3 ( <i>HAC/AK3</i> )	Metabolismo de nucleótidos	71

**Tabla 1.1. Productos génicos dianas de HIF.** Productos génicos más relevantes regulados por HIF, se hace mención a su función fisiológica en la respuesta de adaptación a la disponibilidad de oxígeno <sup>31</sup>.

PRODUCTO GÉNICO	FUNCIÓN ESPECÍFICA	REF.
Crecimiento celular y apoptosis		
IGF2	Supervivencia y proliferación	78
IGFBP-1, IGFBP-2 y IGFBP-3	Factores de crecimiento	78,79
p21	Proliferación	80
TGF- $\beta$ 3	Angiogénesis, proliferación y desarrollo placentario	81;82
Endoglina ( <i>ENG</i> )	Co-receptor TGF- $\beta$	83
Factor de crecimiento de tejido coectivo ( <i>CTGF</i> )	Factor de crecimiento	84
Factor trefoil intestinal ( <i>ITF</i> )	Funcionalidad de la barrera intestinal	85
CD73	Funcionalidad de la barrera intestinal	86
ROR $\alpha$ 4	Receptor huérfano relacionado con RA	87
RTP801/REDD1	Crecimiento celular	88
Factor derivado del estroma 1 ( <i>SDF-1</i> )	Quimioquina de células progenitoras endoteliales	89;90
Receptor de SDF-1 acoplado a proteína G	Receptor de SDF-1	90;91
Receptor de quimioquina 4 ó CD184 ( <i>CXCR4</i> )	Receptor de quimioquina	92
NGFIB/Nur77/NR4A1	Receptor huérfano de esteroides	93
Met	Proto-oncogen	94
Wt1	Supresor del tumor de Wilms	95
Telomerasa transcriptasa inversa ( <i>TERT</i> )	Subunidad de la Telomerasa	82;96
Proteína 3 inductora de neoplasias ( <i>NIP3</i> )	Pro-apoptótico	97
Proteína 3 que interacciona con Bcl-2 ( <i>BNIP3</i> )	Pro-apoptótico	98
Noxa	Pro-apoptótico	99
Ciclina G2 ( <i>CCNG2</i> )	Proliferación	100
PP5	Anti-apoptótico	101
Mcl-1	Anti-apoptótico	102
Nucleofosmina ( <i>NPM1</i> )	Inhibición de p53	103

**Tabla 1.1. Productos génicos dianas de HIF.** Productos génicos más relevantes regulados por HIF, se hace mención a su función fisiológica en la respuesta de adaptación a la disponibilidad de oxígeno <sup>31</sup>.

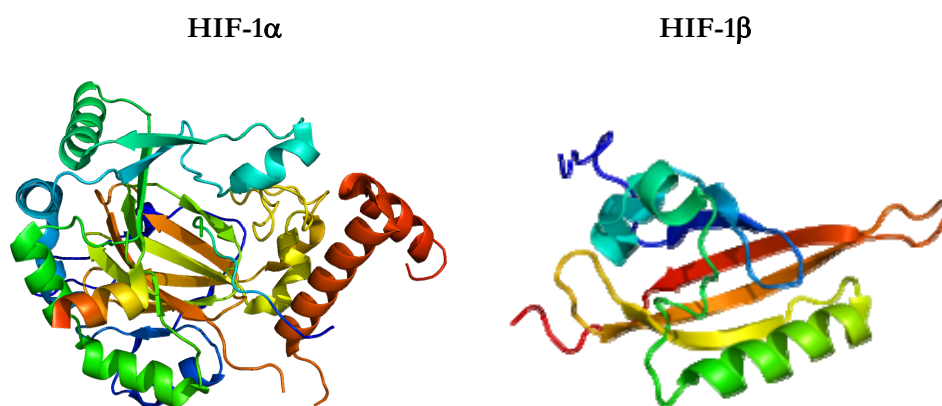


PRODUCTO GÉNICO	FUNCIÓN ESPECÍFICA	REF.
Otras funciones		
Cited2/p35srj	Cofactor transcripcional	104
ID2	Represor transcripcional	105
ETS-1	Factor de transcripción	106
DEC1	Factor de transcripción	107
DEC2	Factor de transcripción	107
CD18 ( <i>ITGFB2</i> )	Adhesión leucocitaria	108
Hsp90 ( <i>GRP94</i> )	Chaperona	109
Furina	Convertasa de pro-proteínas	110
MT1	Metaloproteinasa de la matriz	111
Protil hidroxilasa 2 ( <i>PHD2</i> )	Sensor de O <sub>2</sub>	113
Protil hidroxilasa 3 ( <i>PHD3</i> )	Sensor de O <sub>2</sub>	114
Protil 4 hidroxilasa $\alpha$ de colágeno I ( <i>C-P4H-I</i> )	Metabolismo del colágeno / Sensor de O <sub>2</sub>	112

**Tabla 1.1. Productos génicos dianas de HIF.** Productos génicos más relevantes regulados por HIF, se hace mención a su función fisiológica en la respuesta de adaptación a la disponibilidad de oxígeno <sup>31</sup>.

Se conocen tres tipos distintos de genes para las subunidades  $\alpha$ ; *HIF-1 $\alpha$* , *HIF-2 $\alpha$*  y *HIF-3 $\alpha$* <sup>24;115;116</sup> y tres para las subunidades  $\beta$ , *HIF-1 $\beta$*  o *ARNT1*, *ARNT2* y *ARNT3*. Las tres subunidades  $\alpha$  tienen capacidad para unirse a cualquiera de las subunidades  $\beta$ <sup>27;117</sup>, sin embargo la eficacia del factor de transcripción, para incrementar la expresión de sus genes dianas, varía en función del heterodímero que se forme.

Los mensajeros de *HIF-1 $\alpha$*  y *HIF-1 $\beta$*  y sus productos proteicos se expresan ubicua y constitutivamente a pesar de las variaciones en los niveles de  $O_2$  sin embargo, la regulación de la actividad transcripcional del heterodímero depende de la estabilización proteica de la subunidad  $\alpha$  y de la translocación de ésta al núcleo.



**Figura 1.4. Proteínas *HIF-1 $\alpha$*  y *HIF-1 $\beta$* .** Estructura tridimensional de las subunidades *HIF-1 $\alpha$*  y *HIF-1 $\beta$* .

A continuación describiremos brevemente cada una de estas subunidades.

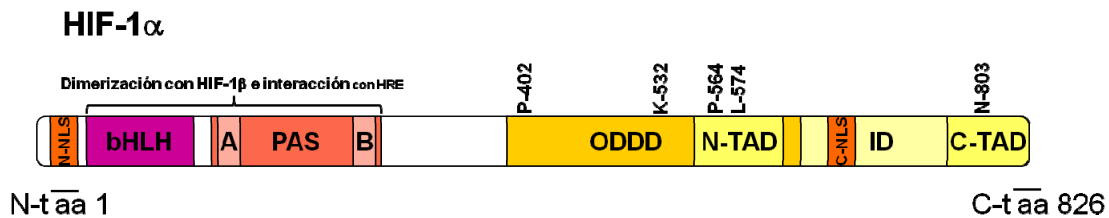
#### 1.4.1.1. *HIF-1 $\alpha$*

*HIF-1 $\alpha$*  tras unirse a la subunidad *HIF-1 $\beta$*  constituye, de entre todos los HIFs, el principal regulador de la expresión de genes con secuencias HREs en su región promotora.

*HIF-1 $\alpha$*  está presente en todos los tipos celulares, tanto en tejidos adultos como embrionarios, de los organismos eucariotas<sup>118</sup>. Se trata de una proteína vital para el desarrollo ya que regula la expresión de genes necesarios para la correcta formación del sistema vascular. Se ha demostrado que los embriones deficientes homocigotos para el gen de *HIF-1 $\alpha$*  fracasan antes del nacimiento<sup>119</sup>. Dada su relevancia continúa siendo el más estudiado de los HIFs.

Posee un dominio bHLH en el extremo N-terminal responsable del reconocimiento de las regiones HREs y, junto con los dominios PAS, de la unión al ADN<sup>28;120</sup>. La región PAS también es responsable de la unión con la subunidad  $\beta$ . La regulación de la

degradación de HIF-1 $\alpha$  en condiciones de normoxia se realiza en el dominio de degradación dependiente de oxígeno u ODDD (*oxygen-dependent degradation domain*) donde se localizan las Pro<sup>402</sup> y Pro<sup>564</sup>, la Lys<sup>532</sup> y la Leu<sup>574</sup> necesarias para iniciar el proceso de degradación de la proteína <sup>121</sup>. HIF-1 $\alpha$  posee también dos dominios de transactivación o TADs (*transactivation domain*). El más cercano al extremo N-terminal se encuentra dentro de la región ODDD y es necesario para la unión con la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau o pVHL (*von Hippel-Lindau tumor supresor protein*) <sup>122,123</sup>. El dominio TAD cercano al extremo C-terminal es necesario para la unión a p300 o a la proteína de unión a CBP (*CREB binding protein*), dos proteínas muy similares que actúan como puente entre algunos factores de transcripción y la maquinaria de transcripción <sup>124</sup>. La secuencia de localización nuclear o NLS (*nuclear localization signal*) en el dominio regulador ID es necesaria para que HIF-1 $\alpha$  pueda ser transportado al interior del núcleo (Figura 1.5).



**Figura 1.5. Estructura de la proteína HIF-1 $\alpha$ .** Principales residuos responsables de la regulación de HIF-1 $\alpha$ : las prolinas P<sup>402</sup> y P<sup>564</sup>, la lisina K<sup>532</sup> y la asparagina N<sup>803</sup>, el dominio hélice-laço-hélice básico bHLH, los dominios PAS A y B, el dominio de degradación dependiente de oxígeno ODDD, los dominios de transactivación N-terminal y C-terminal (TAD), el dominio regulador ID y las secuencias de localización nuclear N-terminal y C-terminal NLS.

#### 1.4.1.2. HIF-2 $\alpha$

Hasta la fecha se sabe que, en aquellos tipos celulares donde se expresa, está subunidad comparte funciones con HIF-1 $\alpha$  y regula los mismos genes. Así, la mayor diferencia con respecto a HIF-1 $\alpha$  es su expresión tisular ya que, al contrario que HIF-1 $\alpha$ , la forma 2 $\alpha$  sólo ha sido detectada en células endoteliales de riñón, en células catecolaminérgicas y en el pulmón durante el desarrollo <sup>118</sup>. Los embriones de ratón HIF-2 $\alpha$  -/- tampoco son viables pero el fracaso en el desarrollo ocurre en fases más avanzadas y se debe a deficiencias en la producción de catecolaminas <sup>125</sup> y no a alteraciones en el desarrollo vascular como ocurre en el caso de HIF-1 $\alpha$ . HIF-2 $\alpha$  comparte una estructura muy similar a HIF-1 $\alpha$  y su expresión también se regula por la concentración de O<sub>2</sub>, pero además, HIF-2 $\alpha$  posee un residuo de cisteína, en la región de unión con la subunidad  $\beta$ , que puede permitir una regulación específica por variaciones del estado redox celular <sup>126</sup>.

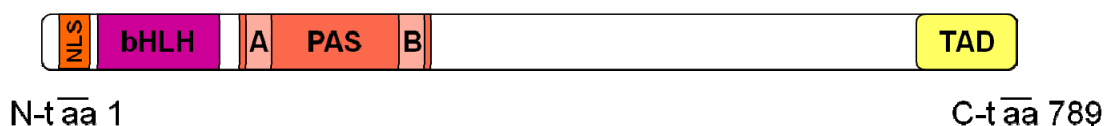
### 1.4.1.3. HIF-3 $\alpha$

Al igual que HIF-1 $\alpha$  o HIF-2 $\alpha$ , la expresión de la proteína HIF-3 $\alpha$  está regulada por la concentración de oxígeno, pero los heterodímeros que forma apenas tienen capacidad para inducir la expresión de los genes regulados por HIFs. Parece que, a través de sus isoformas más comunes, puede actuar como regulador negativo de HIF-1 y HIF-2 impidiendo su acción <sup>127;128</sup>. Aunque existen varias isoformas, la más estudiada es la denominada proteína PAS inhibitoria o IPAS (*inhibitory PAS protein*) que no posee la región TAD en la zona C-terminal y que dimeriza con HIF-1 $\alpha$  formando un complejo sin capacidad transcripcional <sup>129</sup>. El que tanto IPAS como HIF-1 $\alpha$  se induzcan en los mismos tejidos y bajo situaciones hipóxicas continúa siendo tema de estudio y discusión.

### 1.4.1.4. ARNTs

Al igual que las subunidades  $\alpha$ , las distintas subunidades ARNTs se expresan constitutivamente pero difieren en su expresión tisular. HIF-1 $\beta$  o ARNT1, al igual que HIF-1 $\alpha$ , se encuentra presente en todos los tejidos adultos y en desarrollo de humanos y ratones, mientras que ARNT2 sólo se expresa en riñón y cerebro <sup>128;130;131</sup>. En cuanto a la estructura, comparten con las subunidades  $\alpha$  los dominios PAS y bHLH, y poseen una región TAD en el extremo C-terminal implicada en la regulación de la actividad transcripcional (Figura 1.6). A diferencia de las subunidades  $\alpha$ , la secuencia NLS se localiza únicamente en el extremo N-terminal y no posee dominios ODDD, por lo que su degradación no es dependiente de la concentración de oxígeno y permanecen estables en el núcleo durante mucho más tiempo. Los ARNTs también interactúan con el receptor aril hidrocarbónico (AHR, *aryl hydrocarbon receptor*), PER y SIM para constituir otros factores de transcripción que actúan durante el desarrollo del sistema nervioso central <sup>132</sup>.

## HIF-1 $\beta$



**Figura 1.6. Estructura de la proteína HIF-1 $\beta$ .** Dominio hélice-lazo-hélice básico bHLH, los dominios PAS A y B, dominio de transactivación TAD y secuencia de localización nuclear NLS.

### 1.4.2. Regulación de HIF-1 $\alpha$

El mejor y más estudiado estímulo capaz de estabilizar a HIF-1 $\alpha$  es la hipoxia; por debajo de una presión parcial del O<sub>2</sub> del 6% se observa, mediante técnicas de Western blot, un incremento en los niveles de proteína HIF-1 $\alpha$  <sup>27</sup>. Esta estabilidad se alcanza rápidamente y es debida a que la ruta de degradación de HIF-1 $\alpha$ , por déficit de O<sub>2</sub>, queda bloqueada por lo que, mientras HIF-1 $\beta$  se expresa constitutivamente, HIF-1 $\alpha$  se acumula en condiciones hipóxicas.

No obstante existen rutas de degradación alternativas que convierten la degradación de HIF-1 $\alpha$  por proteasoma en un mecanismo complejo, no sólo dependiente de la disponibilidad de oxígeno sino también de las condiciones celulares como los niveles de calcio o la presencia de factores de crecimiento.

#### 1.4.2.1. Regulación dependiente de O<sub>2</sub>

En condiciones de normoxia, HIF-1 $\alpha$  es una proteína muy inestable, con una vida media inferior a 5 minutos. Esto se debe a que los residuos de Pro<sup>402</sup> y Pro<sup>564</sup> localizados dentro de la región ODDD (Figura 1.5) son rápidamente hidroxilados mediante la acción de las enzimas denominadas prolil hidroxilasas (PHD *prolyl-hydroxylase domain*) <sup>121;133;134</sup>. Estas hidroxilaciones constituyen la primera señal para la degradación de HIF-1 $\alpha$  <sup>135</sup> ya que constituyen los sitios de reconocimiento para un complejo multienzimático capaz de ligar la cadena de poliubiquitina que servirá de señal al proteasoma.

A continuación, describiremos brevemente cada una de las proteínas implicadas, y su participación, en esta degradación de HIF-1 $\alpha$  dependiente de O<sub>2</sub> (Figura 1.9).

#### Prolil hidroxilasas (PHDs)

Las prolil hidroxilasas específicas de HIF, denominadas PHDs por poseer dominios prolina-4 hidroxilasas, pertenecen a la superfamilia de dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup>. Poseen una gran homología con la familia de hidroxilasas de residuos de prolina del colágeno y con la gran familia de oxigenasas que requieren de hierro como co-substrato <sup>136</sup>; sin embargo, a diferencia de otras dioxigenasas, el requerimiento de O<sub>2</sub> es absoluto y no puede ser sustituido por una molécula de H<sub>2</sub>O <sup>137;138</sup>. Son consideradas los verdaderos sensores de oxígeno, ya que su Km está ligeramente por encima de la concentración atmosférica de O<sub>2</sub> (Tabla 1.2).

Hasta la fecha se han descrito tres PHDs con capacidad para hidroxilar los residuos Pro<sup>402</sup> y Pro<sup>564</sup> del dominio ODDD de HIF-1 $\alpha$ : PHD1, PHD2 y PHD3 <sup>133;134</sup> (Tabla 1.2). Son proteínas de expresión ubicua aunque su localización en el interior de la célula es principalmente, nuclear para la PHD1, citoplásmica para la PHD2, indistinta para la PHD3.

Mediante el empleo de técnicas de ARN de interferencia se ha inhibido la actividad de las PHDs y demostrado que, la PHD2 es la principal responsable de la hidroxilación de

HIF-1 $\alpha$ <sup>139</sup>. Se cree que las PHD1 y PHD3 tienen la capacidad de regular HIF en condiciones específicas como la hipoxia prolongada o en ciertas células y tejidos.

Nombre del gen	Sinónimos	Localización celular	Aminoácido sustrato en HIF-1 $\alpha$		K <sub>m</sub> ( $\mu$ M)			Ref.
					O <sub>2</sub>	2-oxoglutarato	Ascorbato	
<i>PHD1</i>	<i>HPH-3, EGLN2</i>	Nuclear	Pro <sup>402</sup>	Pro <sup>564</sup>	230	60	170	134
<i>PHD2</i>	<i>HPH-2, EGLN1</i>	Citoplásmica	Pro <sup>402</sup>	Pro <sup>564</sup>	250	60	180	140
<i>PHD3</i>	<i>HPH-1, EGLN3</i>	Nuclear y citoplásmica		Pro <sup>564</sup>	230	55	140	133
<i>FIH-1</i>		Citoplasma	Asn <sup>803</sup>	-	90	25	260	141;142
<i>C-P4H-I</i>		Retículo endoplásmico	-	-	40	20	300	133

**Tabla 1.2. Comparación de las prolil hidroxilasas de HIF-1 $\alpha$  con la hidroxilasa de procolágeno 4 tipo I.** Nombre con el que se mencionan a lo largo de este trabajo las hidroxilasas, otros nombres utilizados en la literatura, los aminoácidos que son hidroxilados dentro de la subunidad HIF-1 $\alpha$ , las K<sub>m</sub> para los diferentes co-sustratos de la reacción de hidroxilación y sus referencias bibliográficas.

Cualquiera de los residuos de prolina descritos en el ODDD tiene capacidad, una vez hidroxilados, para interactuar independientemente con la proteína von Hippel-Lindau<sup>121</sup>, que describiremos más adelante. Sin embargo existen evidencias de una actuación preferencial, por parte de las PHDs, sobre los residuos susceptibles de hidroxilación<sup>134;137</sup> donde la Pro<sup>564</sup> parece fundamental. El residuo de Leu<sup>574</sup> parece mediar en este reconociendo preferencial de la Pro<sup>564</sup> por parte de las prolil hidroxilasas<sup>143</sup>.

## OS-9

La lectina OS-9 es una proteína de 667 aminoácidos que actúa como regulador negativo de HIF-1 $\alpha$ . OS-9 interactúa tanto con HIF-1 $\alpha$  como con las prolil hidroxilasas PHD2 y PHD3 formando un complejo ternario que estimula la hidroxilación de las Pro<sup>402</sup> y Pro<sup>564</sup>. La interacción con HIF-1 $\alpha$  se realiza en un sitio de unión diferente al de la PHD2 sugiriendo una unión cooperativa que asegura la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en condiciones normóxicas<sup>144</sup>.

## ARD1

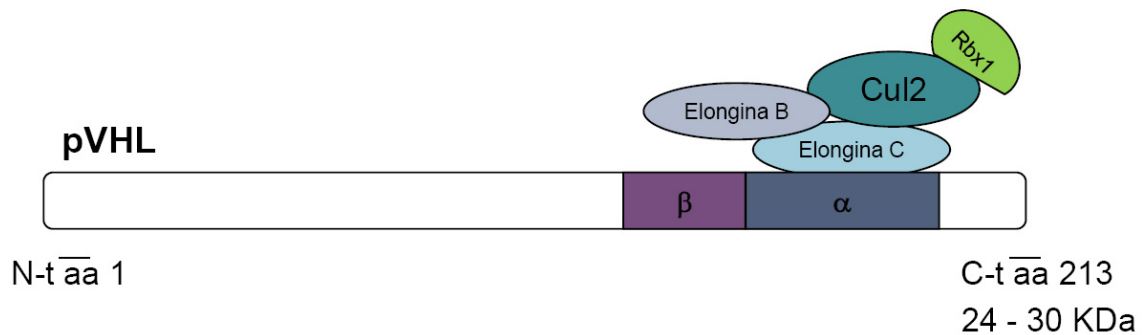
ARD1 es una proteína acetiltransferasa multifuncional que pertenece a la familia de proteínas ARF de 20 kDa y que tiene capacidad para transferir el grupo acetilo de la Acetil Coenzima A al residuo de Lys<sup>532</sup> en el dominio ODDD de HIF-1 $\alpha$ . Esta acetilación es

crítica para la degradación de HIF-1 $\alpha$  ya que incrementa la interacción con pVHL estimulando la ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$  <sup>145</sup>.

### Proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL)

La proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL) es una proteína de 213 aminoácidos que interacciona con la subunidad HIF-1 $\alpha$  a través de dos sitios independientes que contienen el motivo LXXLAP y donde la hidroxilación de los residuos específicos de prolina, la Pro<sup>402</sup> y la Pro<sup>564</sup> en HIF-1 $\alpha$ , son imprescindibles para la interacción <sup>121-123;146-151</sup>.

La pVHL no actúa de forma independiente, si no que actúa como proteína de reconocimiento de un complejo multienzimático citoplasmático denominado ubiquitin ligasa E3 o complejo supresor tumoral. Este complejo une una cadena de poliubiquitina en la Lys<sup>532</sup> de HIF-1 $\alpha$  <sup>123</sup> marcándolo como diana de degradación por el proteasoma. Diversos estudios, llevados a cabo a mediados de los 90, demostraron que la pVHL se unía, en la formación de este complejo, a otras dos proteínas denominadas elonguina B y elonguina C <sup>152;153</sup> y éste a su vez a una cuarta proteína denominada Cul2 <sup>152;154</sup> (Figura 1.7). Ésta última proteína, que pertenece a la familia de las culinas, es la encargada de la ubiquitinación de numerosas proteínas como paso previo a la degradación de éstas por el proteasoma. Por último, el complejo pVHL/elonguinaBC/Cul2 interactúa con una última proteína que es la Rbx1 (también llamada Hrt1 o ROC) que facilita el proceso de ubiquitinación <sup>155</sup>.



**Figura 1.7. Complejo multienzimático ubiquitin ligasa E3 o complejo supresor tumoral.** El subdominio  $\alpha$  de la pVHL se une directamente a la elonguina C. La elonguina B se une a la pVHL a través de la elonguina C. Este complejo se une a la Cul2, que interacciona directamente con Rbx1. El subdominio  $\beta$  de la pVHL se une directamente a HIF-1 $\alpha$  a través del ODDD. En la proteína HIF-1 $\alpha$  se muestran los residuos necesarios para su reconocimiento por pVHL. (Modificada de Kondo K. *Experimental Cell Research* 264, 117-125 (2001) <sup>152</sup>.

## Ubiquitina

La ubiquitina es una pequeña proteína de 76 aminoácidos (8,6 kDa), de secuencia muy conservada, presente en todos los eucariotas. El denominado sistema de la ubiquitina constituye el principal mecanismo de la célula para regular numerosas proteínas mediante un proceso de degradación selectivo<sup>156</sup>, y de su correcto funcionamiento dependen procesos tan importantes como la transducción de señales, el ciclo celular o la apoptosis.

La ubiquitina se une covalentemente a su proteína diana mediante una unión entre el extremo C-terminal de la glicina presente en la ubiquitina y, el grupo ε-amino de una lisina en la proteína diana. De forma similar, esta unión también se forma entre el extremo C-terminal de una ubiquitina con un grupo lisina de otra molécula de ubiquitina permitiendo la formación de largas cadenas de ubiquitina<sup>157-159</sup> que sirven de señal para la degradación mediada por proteasoma.

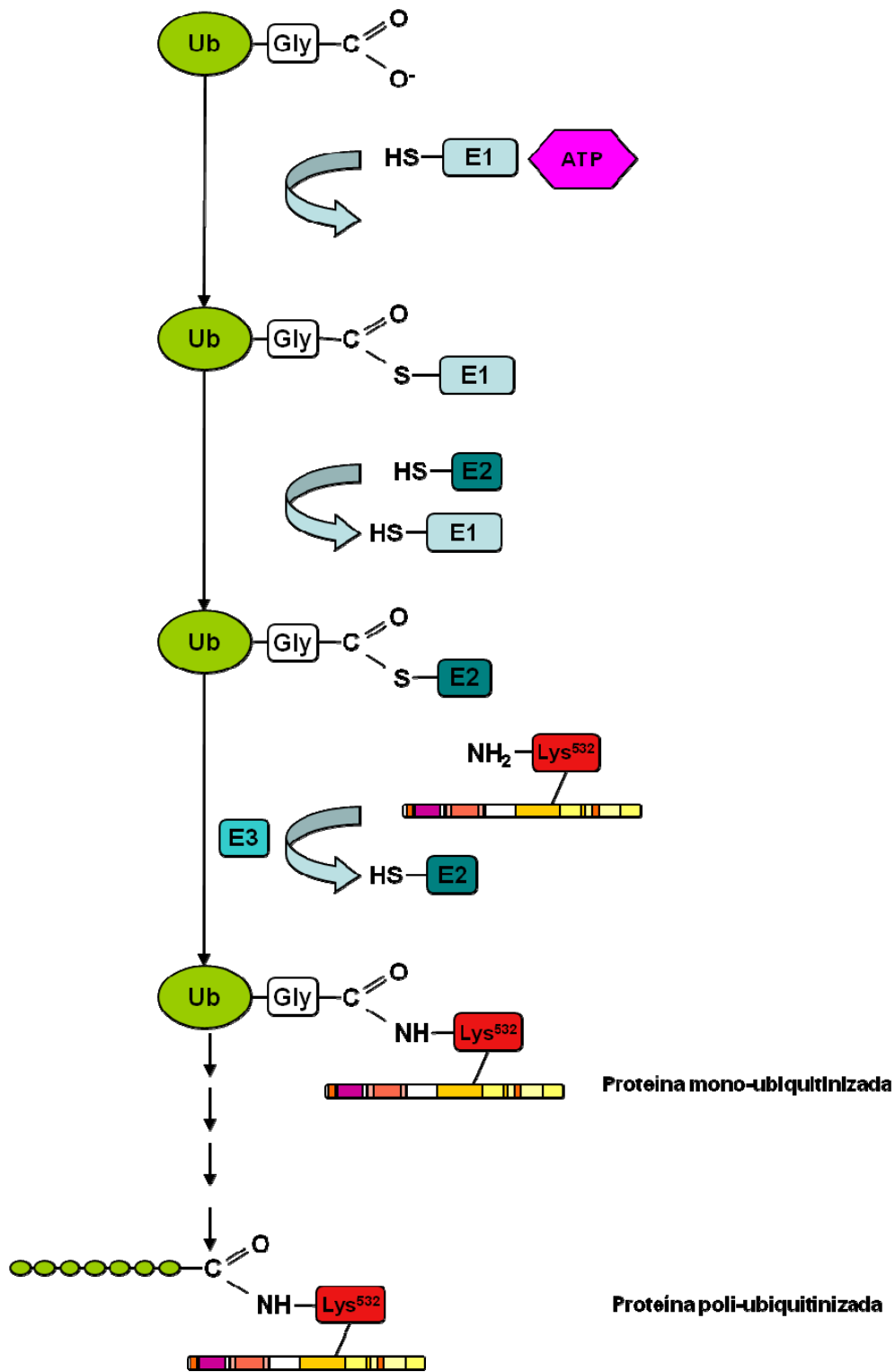
Este proceso de ubiquitinación se resume de forma simple de la siguiente manera (Figura 1.8): una enzima activadora de ubiquitina E1 utiliza ATP para formar un enlace tioéster de alta energía en el extremo C-terminal de la ubiquitina y transfiere esta ubiquitina activada a una enzima transportadora E2, la cual la transfiere de nuevo, al sustrato que va a ser degradado, con la ayuda de una enzima E3. Así, la ubiquitina sufre una activación a través de la acción de las enzimas E1 y E2 para poder formar polímeros una vez ligada a la proteína diana (en nuestro caso HIF-1α) a través de la ligasa E3. Las células de mamífero expresan una única enzima E1 que transfieren ubiquitina a aproximadamente 50 enzimas E2 diferentes<sup>160</sup>. Cada E2 es capaz de interactuar con aproximadamente 1000 enzimas E3 confiriendo especificidad de reconocimiento al sistema de ubiquitinación<sup>161</sup> siendo en este caso para HIF-1α, el complejo supresor tumoral del VHL descrito anteriormente<sup>123</sup>.

El  $\text{Co}^{2+}$ , aún existiendo hidroxilación, puede simular un estado hipóxico al impedir la interacción entre HIF-1α y pVHL, imposibilitando por tanto que continúe el proceso de marcaje con ubiquitina<sup>162</sup> y bloqueando la degradación de HIF-1α. De ahí que el uso de  $\text{CoCl}_2$  constituya una práctica habitual en los estudios sobre regulación de los factores inducibles por hipoxia.

En determinadas condiciones fisiológicas, el complejo supresor de tumores pVHL llega a estar inmovilizado en el núcleo y esta segregación inhibe su función como ligasa de ubiquitinas estabilizadora de HIF-1α<sup>163</sup>. Células deficientes en VHL expresan las subunidades proteicas HIF-1α y HIF-2α de forma constitutiva mientras que la reintroducción de genes *VHL* funcionales restablecen la inestabilidad de las subunidades en condiciones normóxicas<sup>164</sup>.

En el organismo existe también un proceso denominado depoliubiquitinación en el que, el marcaje de poliubiquitinas es eliminado de las proteínas sustrato a través de proteasas específicas, desempeñando un papel esencial en la regulación de la degradación por proteasoma. Hasta la fecha se ha identificado una única proteína con capacidad para deubiquitinar HIF-1α, la VDU2 (*pVHL-interacting de-ubiquitylating enzyme*) o USP20<sup>165</sup>.





**Figura 1.8. Ubiquitinación de proteínas.** La ubiquitina (Ub) es activada por E1 y transferida a la enzima E2 para posteriormente conjugarse a la proteína sustrato a través de la ligasa E3. La poli-ubiquitinación es necesaria para el marcaje de las proteínas para su degradación.

## Proteasoma

El proteasoma es la etapa final en la degradación de HIF-1 $\alpha$  <sup>166</sup>. El complejo del proteasoma reconoce a HIF-1 $\alpha$  ubiquitinizado y procede a su degradación proteolítica.

El proteasoma de mamíferos o proteasoma 26S es un complejo multiproteico compuesto por 4 anillos heptaméricos, apilados en forma de cilindro hueco, conocido como proteasoma 20S, dos “bases” y dos “tapaderas”. Las bases también tiene forma de anillo, pero éstas están constituidas sólo por 9 monómeros cada una. Cada anillo base se localiza en un extremo del proteasoma 20S. Las tapaderas están formadas por 8 monómeros y se localizan sobre las bases. Las tapaderas se encargan del reconocimiento de proteínas ubiquitinadas, es decir, son las responsables de reconocer qué proteínas están marcadas para su degradación, mientras que los anillos bases se encargan de desdoblarse las proteínas reconocidas para la degradación e introducirlas en el proteasoma 20S, que será quien finalmente realice la proteólisis <sup>167</sup>. La eficacia de este sistema de degradación; hidroxilación, reconocimiento por pVHL, marcaje con ubiquitina y proteólisis a través del proteasoma, es tan eficaz, que hace casi indetectable la proteína de HIF-1 $\alpha$  mediante técnicas de Western blot en condiciones de normoxia y asegura que no permanezca activo más tiempo del requerido.

## Factor inhibidor de HIF (FIH)

Del mismo modo que las prolinas, el residuo de asparagina Asn<sup>803</sup> localizado en el dominio C-TAD (Figura 1.5), puede ser hidroxilado por el factor inhibidor de HIF o FIH (*factor inhibiting HIF*) <sup>168</sup>. Como las prolil hidroxilasas, FIH-1 es una dioxigenasa dependiente de O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup> y 2-oxoglutarato que hidroxila en este caso el carbono  $\beta$  de la asparagina. A diferencia de las hidroxilaciones descritas anteriormente, la hidroxilación de este residuo Asn<sup>803</sup> no interviene en la degradación de HIF-1 $\alpha$  sino que actúa impidiendo la asociación necesaria con el co-activador p300 o CBP (*CREBS binding protein*) y por tanto bloqueando la correcta actividad transcripcional <sup>126;169</sup>. Los requerimientos de O<sub>2</sub> para esta hidroxilasa son menores que los de las PHDs, lo que la permite actuar sobre subunidades HIF-1 $\alpha$  estabilizadas por inactivación de PHDs, generándose un rango en la concentración de O<sub>2</sub> que permite la estabilización de una forma de HIF-1 $\alpha$  con actividad transcripcional nula o limitada <sup>170</sup> (Tabla 1.2).

Existe una única forma de FIH capaz de hidroxilar el residuo de Asn<sup>803</sup> <sup>168</sup> (Figura 1.1) y ésta, al igual que la PHD2, se localiza mayoritariamente en el citoplasma <sup>171</sup>.

### 1.4.2.2. Regulación independiente de O<sub>2</sub>

Estudios recientes demuestran la existencia de otros mecanismos que contribuyen al mantenimiento de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en condiciones independientes a la

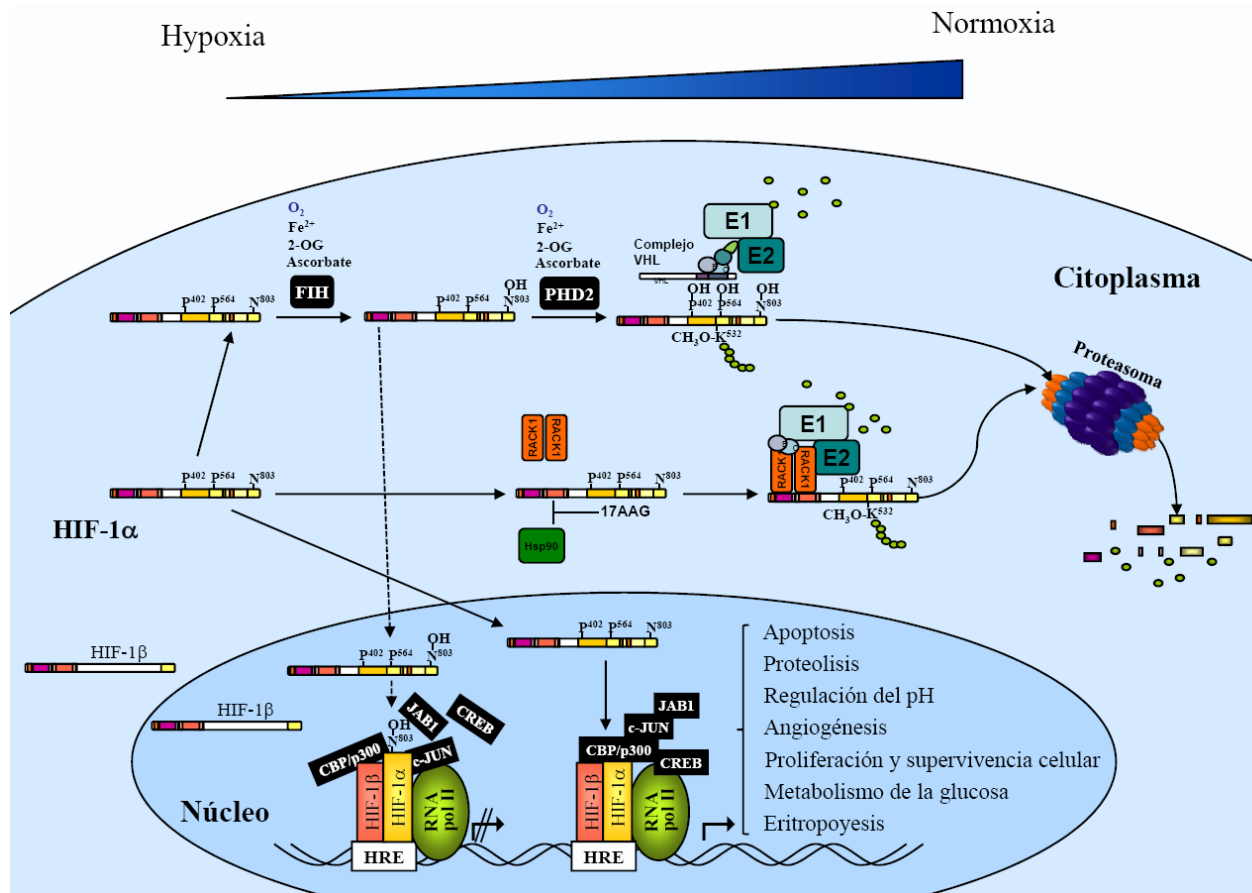
disponibilidad de O<sub>2</sub> pero más dependientes de condiciones específicas de la célula como los niveles de calcio o la presencia de factores de crecimiento.

La proteína GSK-3 (*Glycogen synthase kinase 3*) es una quinasa fosforilada e inactivada por Akt. En 2007 Kietzmann y colaboradores demostraron que GSK-3 era capaz de fosforilar HIF-1 $\alpha$  en tres residuos del dominio TAD N-terminal Ser<sup>551</sup>, Thr<sup>555</sup> y Ser<sup>589</sup>, favoreciendo una ubiquitinación independiente de pVHL, para su posterior degradación por proteasoma. Así, estímulos no hipóxicos como el óxido nítrico, la trombina, la insulina y la heregulina estimulan la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  a través de la vía fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K)/PKB<sup>172</sup>.

La proteína RACK1 (*Receptor of Activated protein Kinase C*), originalmente identificada como una proteína de anclaje para la proteína quinasa C, es actualmente conocida por ser una proteína de anclaje multi-funcional que juega un importante papel en diversos procesos biológicos, incluido la transducción de señales intracelulares<sup>173</sup> y el ensamblaje de las subunidades 40S y 60S del ribosoma<sup>174</sup>. En 2007, el grupo de Semenza demostró, en células humanas, que la proteína RACK1 interactuaba con el subdominio PAS-A de HIF-1 $\alpha$ . También demostraron que RACK1 era capaz de reclutar las elonginas B y C permitiendo la ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$  marcándola así para su degradación por proteasoma, a través de una vía independiente de O<sub>2</sub> y pVHL<sup>175</sup>.

Esta degradación de HIF-1 $\alpha$  está regulada así, de forma independiente a la ruta O<sub>2</sub>/PHD/VHL, por la proteína HSP90 (*Heat Shock Protein 90*), una chaperona molecular que protege la degradación de proteínas gracias a su actividad ATPasa y que se une al dominio PAS-A de HIF-1 $\alpha$  compitiendo con RACK1 e incrementando su estabilidad<sup>175;176</sup>. De la misma manera, la fosfatasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> calcineurina puede impedir la dimerización imprescindible para la interacción de RACK1 con HIF-1 $\alpha$ <sup>177</sup>. La ciclosporina A (CsA) inhibe la actividad de la calcineurina, incrementando la dimerización de RACK1 y la degradación a través de esta vía de HIF-1 $\alpha$ <sup>177</sup> (Figura 1.9).

En 2008, Powis y colaboradores demostraron la existencia de un nuevo regulador de HIF-1 $\alpha$ , el factor asociado a hipoxia HAF (*hipoxia associated factor*)<sup>178</sup>, descrito como una nueva ubiquitina ligasa que se une a HIF-1 $\alpha$  permitiendo la degradación por proteasoma independientemente de la presión parcial del oxígeno. Esta nueva proteína se expresa tan sólo en células en proliferación no en tejidos no proliferativos, pero su sobreexpresión disminuye los niveles de HIF-1 $\alpha$  tanto en normoxia como en hipoxia. A diferencia de otros mecanismos, la degradación a través de esta vía, parece estar limitada a la subunidad 1 $\alpha$ , no la 2 $\alpha$ , es independiente de la hidroxilación de prolinas y de pVHL y permite la ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$  para su degradación por proteasoma<sup>179</sup>.



**Figura 1.9. Regulación de HIF-1α.** Se muestran las principales vías de degradación de HIF-1α. En la degradación dependiente de oxígeno, las prolil hidroxilasas (PHD2 en endotelio) actúan sobre los residuos Pro<sup>402</sup> y Pro<sup>564</sup> facilitando el reconocimiento de HIF-1α por parte del Complejo VHL-E1-E2, permitiendo su ubiquitinación y su degradación por proteasoma. En la degradación independiente de oxígeno la dimerización de RACK1 sobre HIF-1α permite el reconocimiento de las elonginas B y C y la ubiquitinización de HIF-1α por E1-E2 marcándola para la degradación por proteasoma. También se muestra cómo la enzima FIH, en condiciones relativas de falta de oxígeno, puede hidroxilar el residuo de Asn<sup>803</sup> impidiendo en el núcleo la asociación necesaria de HIF-1α con el co-activador p300 o CBP (CREBS binding protein) bloqueando la correcta actividad transcripcional.

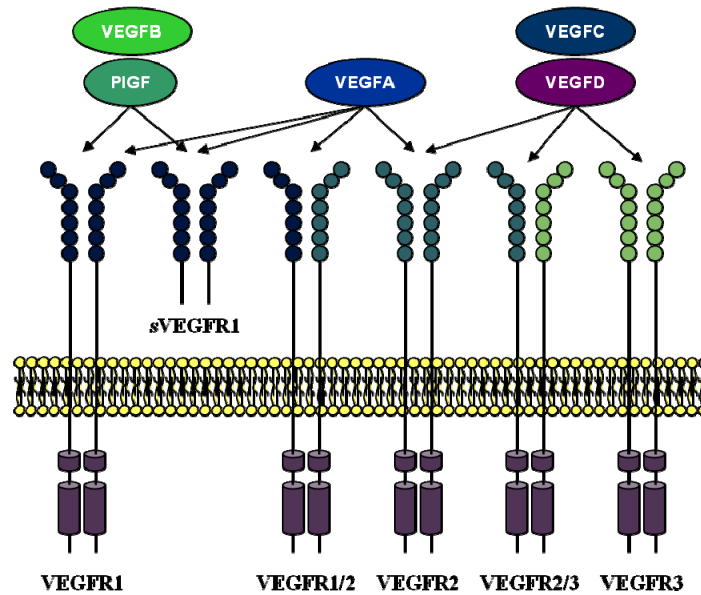
## 1.5. VEGF

El término Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF- *Vascular Endothelial Growth Factor*) hace referencia a una familia de gluocoproteínas homodiméricas de aproximadamente unos 45 KDa que presentan una gran homología con el factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF (*platelet-derived growth factor*)<sup>180;181</sup>. Está constituida por cinco miembros: VEGFA, VEGFB<sup>182</sup>, VEGFC<sup>183;184</sup>, VEGFD<sup>185;186</sup> y el factor de crecimiento placentario PGF (placental growth factor)<sup>187;188</sup>. La familia VEGF constituye el principal factor angiogénico inducido por hipoxia.

El VEGFA, llamado comúnmente VEGF, es el miembro mejor estudiado de la familia. Su gen está constituido por 7 intrones y 8 exones y da lugar hasta a 6 isoformas proteicas distintas por procesamiento alternativo de su ARNm. Estas isoformas se denominan VEGFA<sub>121</sub>, VEGFA<sub>145</sub>, VEGFA<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGFA<sub>189</sub> y VEGFA<sub>206</sub> en función del número de aminoácidos que presentan. Diferentes estudios subrayan la importancia de la isoforma VEGF<sub>165</sub> como el principal efector de la acción del VEGF con propiedades de unión a la matriz extracelular y una difusión intermedia.

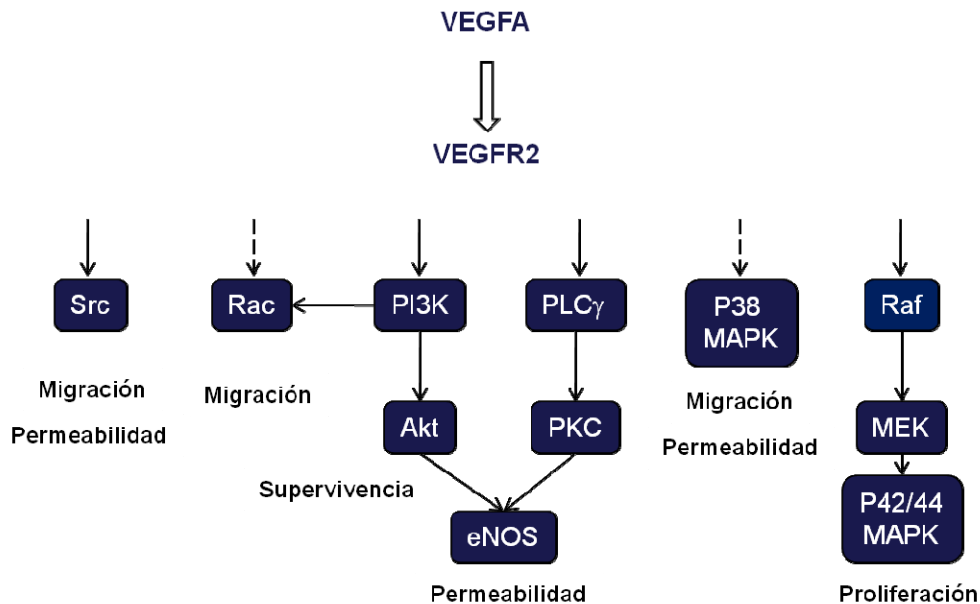
Es un mediador clave de la formación de vasos sanguíneos tanto en la vasculogénesis (formación de vasos en un tejido avascular) como en la angiogénesis<sup>189</sup> (formación de vasos a partir de otros preexistentes) y numerosos trabajos demuestran su capacidad para inducir mitosis de células endoteliales procedentes de arterias, venas y vasos linfáticos. Además de estas funciones proliferativas, el VEGF media en el aumento de la permeabilidad vascular<sup>190;191</sup> y es un conocido factor de supervivencia de la célula endotelial tanto *in vitro* como *in vivo*, previene de la muerte por falta de suero en el medio de cultivo<sup>192</sup> e induce la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2<sup>193</sup> y survivina<sup>194</sup>.

Hasta la fecha se han identificado tres receptores de VEGF: VEGFR1 (o Flt-1), VEGFR2 (o KDR en humanos y Flk-1 en ratón) y VEGFR3 (o Flt4). Los tres poseen una estructura altamente conservada formada por siete dominios extracelulares tipo inmunoglobulina encargados del reconocimiento del VEGF, un dominio transmembrana y dos dominios tirosina quinasa citoplasmáticos (Figura 1.10).



**Figura 1.10. Familia del VEGF y sus receptores.** Se muestran las diferentes formas de dimerización de los receptores y la capacidad para unirse a los distintos miembros de la familia de VEGF (Adaptado de Olsson, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006, pág. 360) <sup>189</sup>.

La expresión de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 se restringe mayoritariamente a las células endoteliales vasculares y células hematopoyéticas mientras que VEGFR3 está presente en células endoteliales linfáticas y sólo tienen capacidad para reconocer VEGFC y VEGFD. La mayoría de los efectos reconocidos del VEGF sobre la célula endotelial están mediados por VEGFR2 <sup>189</sup> (Figura 1.12).



**Figura 1.11. Señalización de VEGF.** Principales proteínas intracelulares activadas por VEGFA en CE a través del VEGFR2 y principales funciones biológicas asociadas a esta activación. Las flechas discontinuas representan conexiones en las que no se conoce con precisión el modo de iniciación de la activación. (Adaptado de Olsson, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006, pág 361) <sup>189</sup>.

Tanto el VEGF como sus receptores VEGFR1 y VEGFR2 presentan secuencias HRE en los promotores de sus genes por lo que la concentración de oxígeno es, a través de HIF-1, la principal reguladora de su expresión <sup>195;196</sup>.

La expresión coordinada del VEGF y de sus receptores durante la formación de los vasos renales sugieren una función fundamental de este ligando en la reparación y regeneración durante y tras el daño renal agudo. En diversos modelos de daño glomerular reversible, las células endoteliales muestran de hecho respuestas proliferativas y rasgos morfológicos de angiogénesis.

## 1.6. Tirfostinas

En la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas nos hemos centrado en las tirfostinas, una creciente familia de compuestos químicos cuyas acciones moleculares no han sido bien caracterizadas.

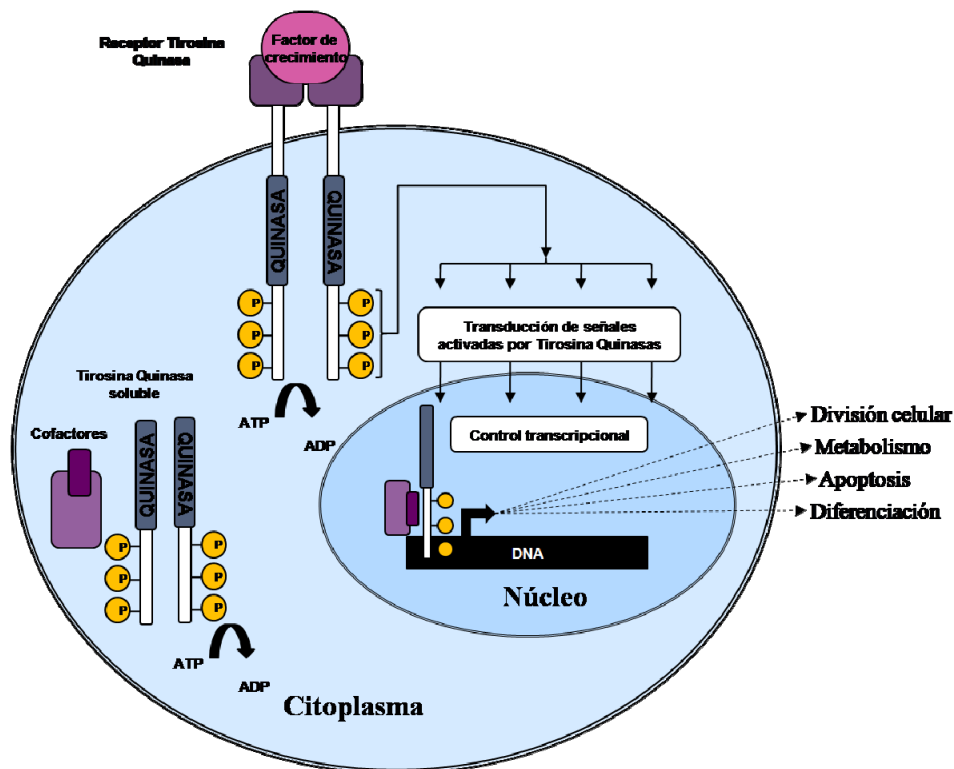
### 1.6.1. Tirfostinas como inhibidores de PTKs

El término tirfostina engloba un gran número de compuestos sintéticos, de bajo peso molecular y relacionados estructuralmente, desarrollados inicialmente para inhibir la fosforilación de proteínas quinasas específicas de tirosina (PTKs).

Estas PTKs catalizan la transferencia del fosfato  $\gamma$  del ATP a residuos tirosina en proteínas sustrato, modulando su actividad enzimática o creando sitios de unión para el reclutamiento de proteínas de señalización. Así, las PTKs juegan un papel clave en la transducción de señales durante la división celular, la diferenciación, el metabolismo y la apoptosis<sup>197-201</sup> (Figura 1.11).

El hecho de que las PTKs participen en estos procesos y de que la actividad aumentada de estas proteínas esté asociada a desórdenes proliferativos como el cáncer<sup>202</sup>, la aterosclerosis<sup>203</sup> y probablemente la psoriasis<sup>204-206</sup> hicieron que la industria farmacéutica centrara esfuerzos en el desarrollo de nuevas moléculas con capacidad para inhibirlas. De hecho la inhibición de quinasas relacionadas con el crecimiento, son actualmente reconocidas como una atractiva estrategia en el desarrollo de nuevas terapias antineoplásicas. Actualmente inhibidores de PTKs como las tirfosinas se ha visto que inhiben tanto el crecimiento de líneas celulares tumorales como el crecimiento de los tumores *in vivo*<sup>200</sup>.





**Figura 1.12. Proteínas Tirosina Quinasas.** Dominios catalíticos quinasa de las Tirosinas Quinasas tipo Receptor y de las solubles y dominios de fosforilación implicados en las rutas de señalización (Modificada de Schlessinger J, *Cell* Octobr 6 2006, pag 46<sup>207</sup>).

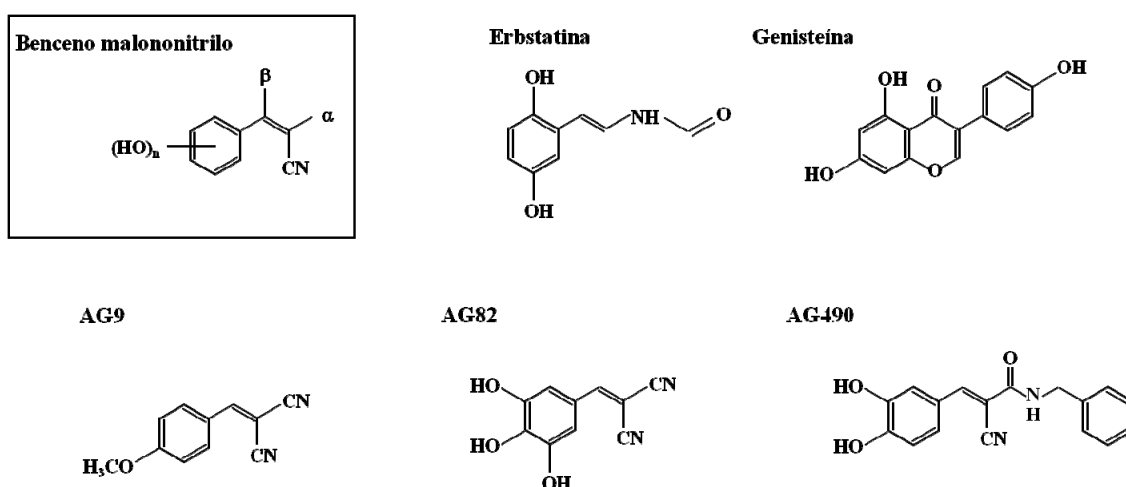
### 1.6.2. Estructura de las tirfostinas

La búsqueda de inhibidores de las PTK se inició tan pronto como se descubrieron los detalles de la reacción de fosforilación. Inicialmente se sintetizaron pequeños péptidos que contenían tirosinas, pero eran inestables a nivel conformacional, tenían propiedades farmacocinéticas inferiores a los sustratos de las PTKs, poca permeabilidad a través de membranas, baja absorción a través del tracto intestinal y eran sensibles a la degradación por enzimas proteolíticas. Estos motivos hicieron que la síntesis se empezara a basar en la estructura de pequeños inhibidores de PTKs presentes en la naturaleza, principalmente la erbstatina<sup>208</sup>.

El gran número de tirfostinas que actualmente se comercializan son consecuencia de un programa inicial desarrollado por Levitzki y colaboradores<sup>209;210</sup>, con el fin de generar potentes y específicos inhibidores de PTKs. Mediante un procedimiento sintético directo, se incorporaban pequeñas modificaciones de forma que se generaban gran cantidad de inhibidores de la misma familia que permitían relacionar actividad y estructura. Estos compuestos debían competir en la PTK por el sitio de unión al sustrato influyendo lo mínimo posible en la unión del ATP, no debían inhibir quinasas que fosforilaran en treoninas ni serinas (ser/thr quinasas), debían ser solubles para que pudieran atravesar la membrana y así poder ser evaluadas en células intactas y animales de experimentación y por

último, los compuestos debían prepararse de forma selectiva para una PTK concreta de estudio. Una de las PTKs seleccionadas inicialmente para la creación de tirfostinas fue la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)<sup>211</sup>.

Así, a una estructura inicial que combinaba elementos de erbstatina y tirosina, el benceno malononitrilo (Figura 1.12), se fueron incorporando, en la síntesis de tirfostinas, diferentes elementos como grupos hidroxilos sobre el anillo aromático y otros radicales cetónicos y amídicos en posiciones  $\alpha$  y  $\beta$ . El grupo ciano en posición cis se conservó durante el proceso por ser relevante para la actividad biológica de las tirfostinas<sup>209;210</sup>.



**Figura 1.13. Estructura de las tirfostinas.** Benceno malononitrilo como compuesto base de la síntesis de tirfostinas, la erbstatina y la genisteína como ejemplo de inhibidores naturales de la fosforilación de tirosinas y una representación de tirfostinas sintéticas, AG9, AG82 y AG490, que son las que se han utilizado durante el desarrollo de este trabajo.

La mayoría de las tirfostinas son más potentes inhibiendo PTKs que otras quinastas no específicas de tirosina<sup>209;210</sup> sin embargo al ser compuestos relativamente nuevos se sabe poco acerca de su especificidad dentro de la familia de las tirosina quinastas.

Por otro lado, a pesar de ser inicialmente diseñadas para competir por el sitio de unión al sustrato y no por el del ATP, los análisis cinéticos posteriores han demostrado no ser todas tan selectivas en este aspecto. De hecho diferentes tirfostinas muestran diferentes modos de inhibir la actividad quinasa del EGFR<sup>210;212</sup>.

Las tirfostinas, como otros inhibidores de PTKs, se han examinado en diversos sistemas biológicos y, a medida que los laboratorios han empezado a utilizarlos en investigación, han emergido no sólo nuevos patrones de especificidad frente a PTKs sino también diferentes efectos biológicos que diversifican sus aplicaciones terapéuticas.

### 1.6.3. Otras funciones de las tirfostinas

#### 1.6.3.1. Tirfostinas como inhibidores de GC

Las guanilato ciclasas son una familia de enzimas que catalizan la conversión de guanosina trifosfato (GTP) citoplasmático en guanosina monofosfato cíclico (GMPc) en respuesta a diversas señales. Se expresan en la mayoría de los tipos celulares y su actividad está regulada por diversos agonistas extracelulares como hormonas peptídicas, neurotransmisores, toxinas bacterianas y radicales libres y/o por moléculas intracelulares como el calcio y nucleótidos adenina. La estimulación de las GC y la acumulación resultante de GMPc regula complejas cascadas de señalización a través de sus efectores inmediatos como son las proteínas quinasas dependientes de GMPc, las fosfodiesterasas reguladas por GMPc y canales iónicos disparados por nucleótidos cíclicos<sup>213</sup>.

En mamíferos se han identificado siete isoformas unidas a membrana (GCp: nombradas desde la GC-A a la GC-G) y múltiples isoformas solubles (GCs).

Las unidas a membranas se encuentran en estado basal formando dímeros u oligómeros de mayor orden. Cada unidad presentan una estructura altamente conservada con un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembrana, un dominio citoplasmático juxtamembrana, un dominio regulador, homólogo al dominio quinasa de las PTK llamado KHD<sup>214</sup> (del inglés *kinase homology domain*), un dominio de plegamiento y un dominio C-terminal catalítico. Mientras las isoformas GC-A y GC-B tienen una expresión algo más generalizada<sup>215-220</sup> el resto parecen tener una expresión más específica de tejido<sup>221-223</sup>.

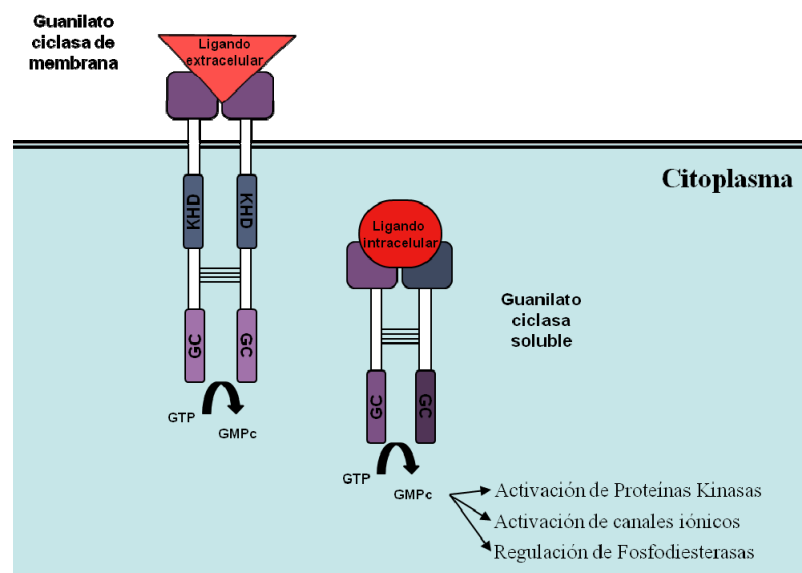
Su dominio juxtamembrana contiene una secuencia consenso de aproximadamente 25 aminoácidos presente en otros receptores transmembrana como el EGFR, el IR y el receptor para el factor de crecimiento tipo insulina<sup>224-227</sup> (IGFR), y que es importante tanto para el acoplamiento y activación de proteínas G heterotriméricas y/o monoméricas como a sus efectores inmediatos.<sup>228-230</sup> Así, las GCp están implicadas no sólo en la síntesis de GMPc sino que pueden participar en la señalización a través de diferentes vías.

Su dominio quinasa, que contiene aproximadamente 250 residuos, presenta una homología cercana al 30% con gran número de proteínas quinasa<sup>231;232</sup>, sin embargo el residuo de aspartato que media la transferencia del grupo fosfato del ATP hasta el sustrato en las PTKs, está remplazado en todas las GCp, comúnmente por Ser, Arg o Asn<sup>233</sup>, prevaleciendo así la hipótesis de que no poseen actividad quinasa.

La actividad ciclasa de las GCp está regulada de diferentes maneras pero todas convergen en la estabilización o desestabilización del centro catalítico activo formado como resultado de la interacción de al menos dos monómeros de GCp<sup>234</sup>. Los mecanismos de activación incluyen: la unión de un ligando extracelular, la fosforilación del dominio KHD y la interacción intracelular a proteínas unidas a calcio. El ATP por otro lado es capaz de potenciar la activación de las GC a través de su interacción con el KHD<sup>231;235;236</sup>.

Aunque todas poseen el dominio extracelular, sólo se conocen ligandos extracelulares para tres de ellas (A, B y C), por lo que al resto se les denomina receptores huérfanos. Estos ligandos son hormonas peptídicas extracelulares, guanilín, uroguanilín y toxinas bacterianas. Entre los ligandos intracelulares que pueden modificar también su actividad destacan el calcio y los nucleótidos adenina.

Las isoformas solubles, se encuentran en el citoplasma de la mayoría de las células de mamífero. Son proteínas heterodiméricas constituidas por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ <sup>237</sup>. Cada subunidad puede dividirse en tres dominios funcionales: un dominio con un grupo prostético hemo requerido para la activación por óxido nítrico (NO) o monóxido de carbono (CO)<sup>238-241</sup>, un dominio regulador y de dimerización N-terminal y un dominio catalítico C-terminal que muestra homología de secuencia con respecto al correspondiente en las GCp y adenilato ciclasas. A pesar de que existen múltiples isotipos con diferente composición de subunidades, las más abundantes y las más ubicuas son las isoformas  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ <sup>242-244</sup> (Figura 1.14).



**Figura 1.14. Estructura de las Guanilato Ciclasas.** Dominios estructurales de las GC y funciones principales del producto catalítico GMPc. GCp: el dominio de unión a ligando extracelular en el dominio N-terminal, el dominio transmembrana, el dominio citoplasmático yustamembrana, el dominio regulador homólogo al de Proteínas Quinasas (KHD), la región visagra y el dominio catalítico C-terminal. GCs: el dominio Hemo de dimerización y unión a ligando intracelular en el extremo N-terminal, la región visagra y el dominio catalítico en el extremo C-terminal. (Adaptado de Lucas KA, *Pharmacological Reviews* 53, pag 381<sup>245</sup>).

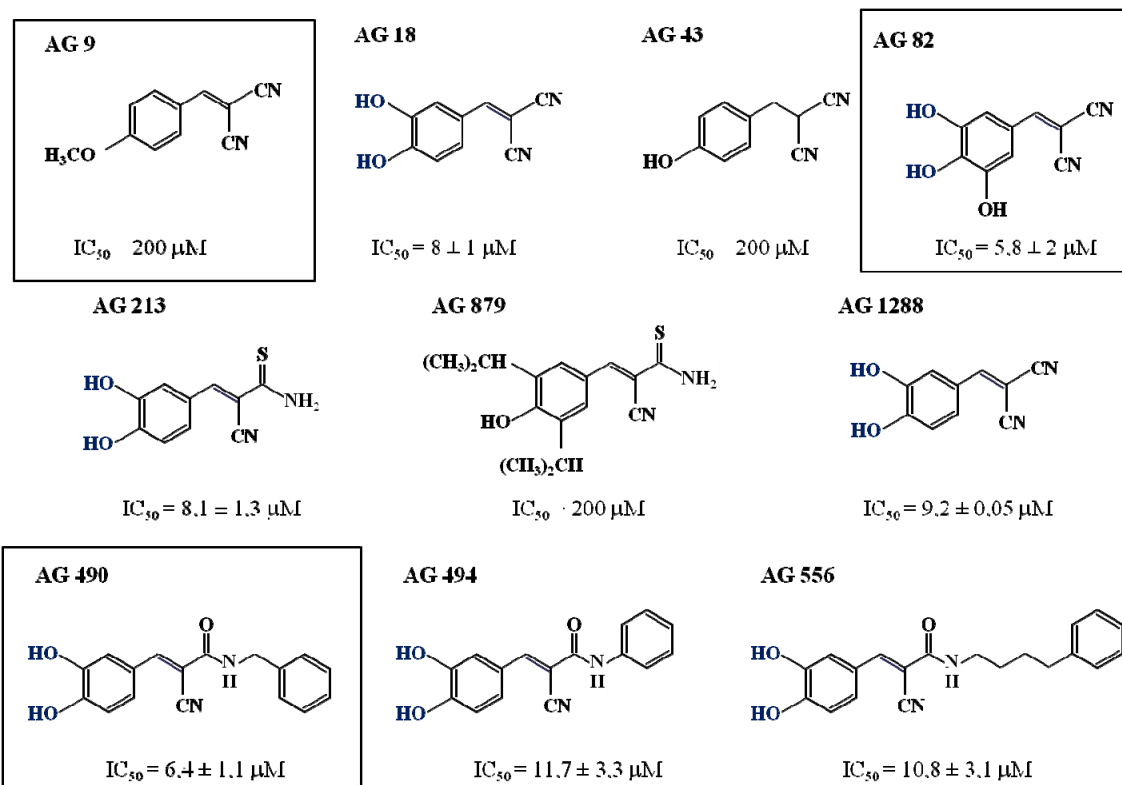
Tanto las GCp como las GCs, para expresar una máxima actividad catalítica, requieren cationes divalentes como cofactores y moduladores alostéricos. De hecho, como también ocurre en las adenilato ciclasas, es necesaria la formación de un quelato con un catión divalente para que el sustrato pueda unirse al dominio catalítico y pueda llevarse a cabo la ciclación. El  $Mg^{2+}$  y el  $Mn^{2+}$  son los cofactores óptimos para esta reacción<sup>246</sup>.

La estimulación de las guanilato ciclasas y la acumulación resultante de GMPc regula complejas cascadas de señalización a través de efectores intermedios tales como proteínas quinasas dependientes de GMPc (PKG), fosfodiesterasas reguladas por GMPc (PDEs) y canales iónicos disparados por nucleótidos cíclicos. Así, las GC y la señalización mediada por GMPc es esencial en la regulación de múltiples procesos tanto fisiológicos como patológicos, en la movilidad del músculo liso vascular y en la homeostasis de electrolitos.

El Ly 83583, un compuesto sintético, permeable a la célula y que actúa como inhibidor competitivo de la guanilato ciclasa soluble (IC = 2  $\mu$ M), disminuye la producción de GMPc en un amplio rango de tejidos al bloquear la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular sin efectos aparentes en los niveles de AMPc. Inhibe la relajación del músculo liso inducida por óxido nítrico y se ha visto que impide la acumulación de GMPc inducida por la IL-1 en células de músculo liso vascular de aorta de rata cultivada<sup>247</sup>.

Debido a la existencia del dominio KHD en las GCp, Jaleel y colaboradores<sup>248</sup> probaron, con el fin de entender los aspectos moleculares de la regulación de las GC, diferentes tirfostinas. Descubrieron que algunas tirfostinas podían inhibir reversiblemente la actividad de la GC-C y de las GCs *in vitro* y que esta inhibición no se debía a la interacción con el dominio KHD de la GC, sino a la interacción a través del dominio catalítico. Esta inhibición era no competitiva con respecto al sustrato y al cofactor metálico, y se reproducía, para la tirfostina AG82, tanto en guanilato ciclasas como en adenilato ciclasas<sup>248</sup>.

La evaluación de diferentes tirfostinas AG9, AG18, AG43, AG82, AG213, AG490, AG494, AG556, AG879 y AG1288 permitió identificar los grupos hidroxilos en posiciones 3 y 4 como necesarios en la efectiva inhibición de la actividad ciclasa<sup>248</sup> (Figura 1.15).



**Figura 1.15. Estructura de las tirfostinas inhibidoras de Guanilato Ciclasas.** Diferentes tirfostinas con capacidad inhibidora de la actividad ciclasa. En azul los sustituyentes hidroxilos en el anillo bencénico indispensables para la inhibición de la actividad guanilato ciclasas y recuadradas las tirfostinas que han sido utilizadas en este trabajo. Así mismo se muestran las concentraciones de inhibición media para cada tirfostina calculadas en células HEK293 (Adaptado de Jaleel M Biochemistry 2004<sup>248</sup>).

### 1.6.3.2. Tirfostinas como inhibidores de la respiración celular

La inhibición de la respiración celular se puede producir de distintas maneras permitiendo clasificar los agentes que la provocan en diferentes grupos:

- si inhiben a nivel de la cadena respiratoria inhibiendo el transporte de electrones, pueden actuar sobre diferentes sitios: sobre la NADH deshidrogenasa, bloqueando la transferencia entre la flavina y la ubiquinona (Inhibidores del sitio I); entre el citocromo b y el citocromo c1 (Inhibidores de sitio III); sobre el hemo a3 de la citocromoxidasa impidiendo la interacción con el oxígeno (Inhibidores de sitio IV).

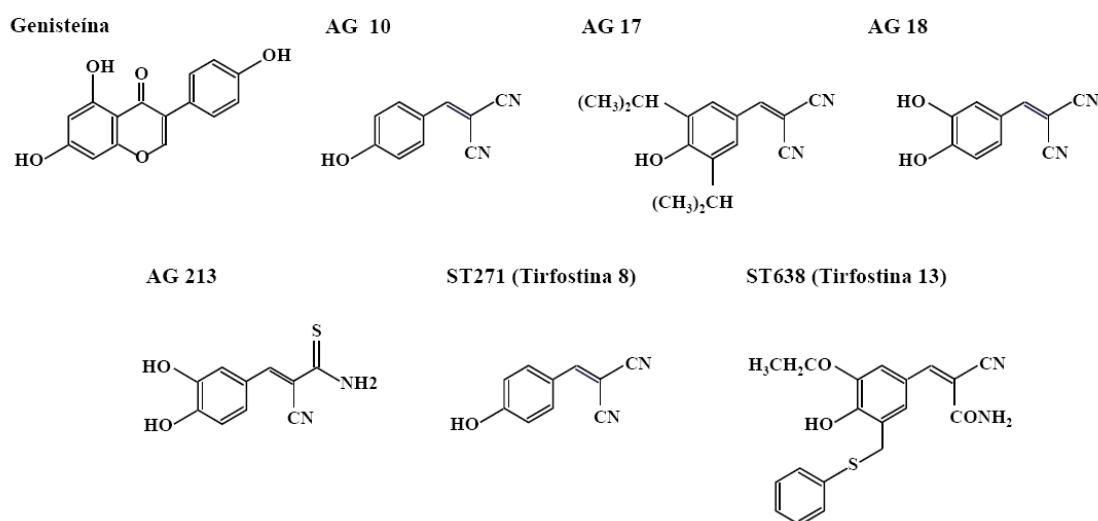
- si inhiben a nivel de la fosforilación oxidativa, actúan en el complejo enzimático (ATPasa) que cataliza la síntesis de ATP bloqueando el paso en el que el ADP se une al fosfato impidiendo que la energía del potencial electroquímico llegue al sistema fosforilante.

- si actúan como desacopladores de la fosforilación, disociando la oxidación en la cadena respiratoria de la fosforilación. Bloquean así la síntesis de ATP al tiempo que

permiten que continúe el transporte electrónico a lo largo de la cadena respiratoria hasta el  $O_2$ . Se caracterizan por ser ácidos débiles solubles en lípidos de forma que al aproximarse a la membrana interna se protonan aumentando su carácter hidrofóbico y difundiendo a través de la membrana. Dentro de la matriz el pH más alto hace que el hidroxilo fenólico desprotona inhibiendo así la síntesis de ATP al ser la entrada de los  $H^+$  de la matriz la que proporciona la energía necesaria para impulsar la síntesis de ATP.

El 3,5-Di-tert-butil-4-hidroxibencilidenomalononitrilo, llamado SF 6847 y cuya estructura coincide con la actual tirfostina AG17 (o tirfostina A9), resultó ser uno de los más potentes desacopladores de la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria en la célula. Era capaz de inhibir el acoplamiento entre la cadena respiratoria de electrones y la ATP sintasa a concentraciones de 10 nM *in vitro*. Los requisitos estructurales para la inducción del desacoplamiento resultaron ser su grupo ácido débil disociable, sus grupos terbutilos en el anillo bencénico como motivo hidrofóbico voluminoso y el anillo bencénico, el doble enlace y los grupos nitrilos conjugados como grupo electrónico retirado <sup>249</sup> (Figura 1.16). Esta actividad desacopladora del AG17 también le permite modificar el transporte de cationes  $H^+$  y  $Na^+$  a través de las membranas lipídicas <sup>250</sup> y proteger de la muerte celular por glutamato o ácido homocisteico (HCA) al inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por despolarización de la membrana mitocondrial <sup>251</sup>.

### TIRFOSTINAS INHIBIDORAS DE LA RESPIRACIÓN CELULAR



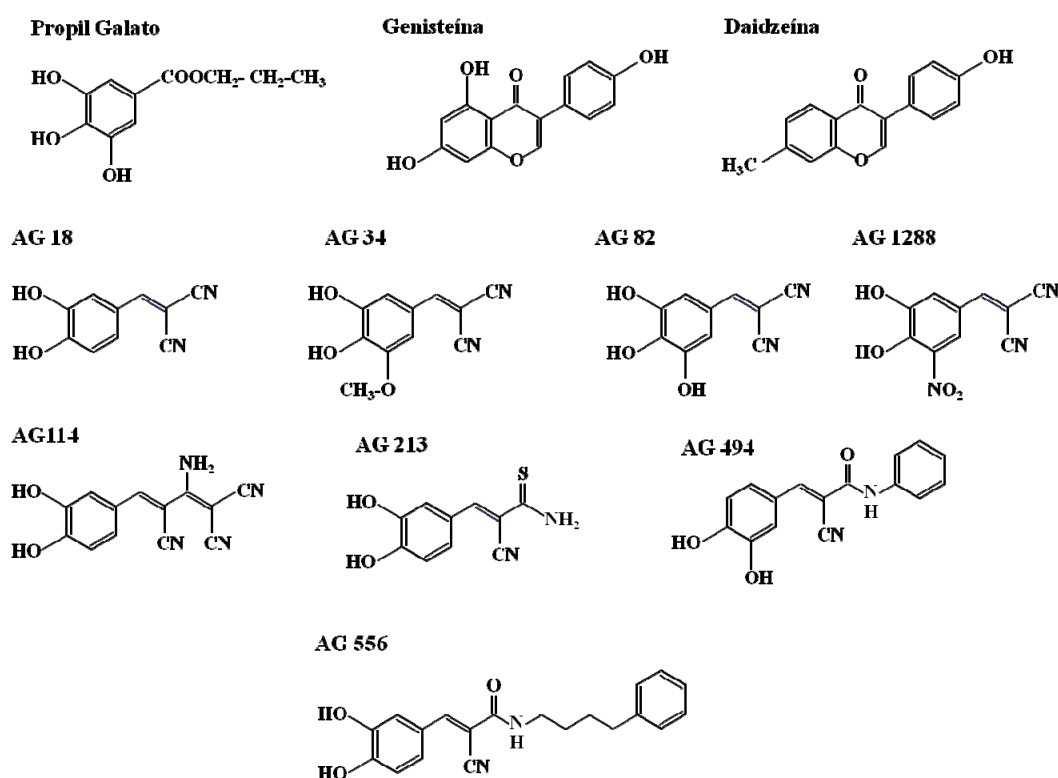
**Figura 1.16. Estructura de tirfostinas inhibidoras de la respiración celular.** Estructura química de la Genisteína y las tirfostinas AG10, AG17, AG18, AG213, ST271 y ST638 como compuestos con capacidad para inhibir la respiración celular.

Posteriormente se han descrito capacidades para inhibir la respiración celular en otras tirfostinas como la tirfostina 8 (ST271), la tirfostina 13 (ST638), AG10, AG18 y

AG213 (RG50864 o tirfostina 47) <sup>252;253</sup>. Estas tirfostinas y la genistéina resultaron ser desacopladores de la fosforilación oxidativa aunque en menor medida que el SF6847. A concentraciones mayores de 200  $\mu\text{M}$  vieron incluso que estas tirfostinas podían actuar como inhibidores de la cadena respiratoria inhibiendo en mayor o menor medida el porcentaje de consumo de  $\text{O}_2$ .

### 1.6.3.3. Tirfostinas antioxidantes

Las tirfostinas tienen una estructura química similar a otros antioxidantes fenólicos naturales como la vitamina E y el propil galato que protegen de la muerte celular inducida por estrés oxidativo (Figura 1.17). Así, Sagara y colaboradores demostraron en células del sistema nervioso, que algunas de estas tirfostinas, como el AG18, el AG24, el AG82, el AG114, el AG213, el AG494 y el AG1288 y la genistéina y la daidzeína tenían la capacidad de eliminar ROS protegiendo de la muerte celular por glutamato y otros pro-oxidantes como el ácido homocistéico o HCA (del inglés *homocysteic acid*), la butionina sulfoxamina o BSO y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  <sup>251</sup>. La protección de tirfostinas como AG17 y AG126 frente a la muerte celular en este mismo sistema, no se debía a una capacidad antioxidante si no a la depolarización de la membrana mitocondrial descrita anteriormente que restablece la hiperpolarización provocada por la presencia de glutamato.

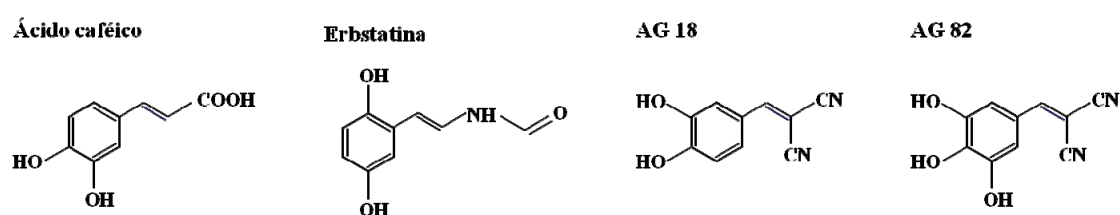


**Figura 1.17. Estructura de tirfostinas que actúan como antioxidantes.** Estructura química de las tirfostinas AG18, AG24, AG82, AG114, AG213, AG494 y AG1288, y la de los compuestos Propil Galato, Genistéina y Daidzeína con capacidad para interaccionar con metales.



### 1.6.3.4. Tirfostinas que interaccionan con metales

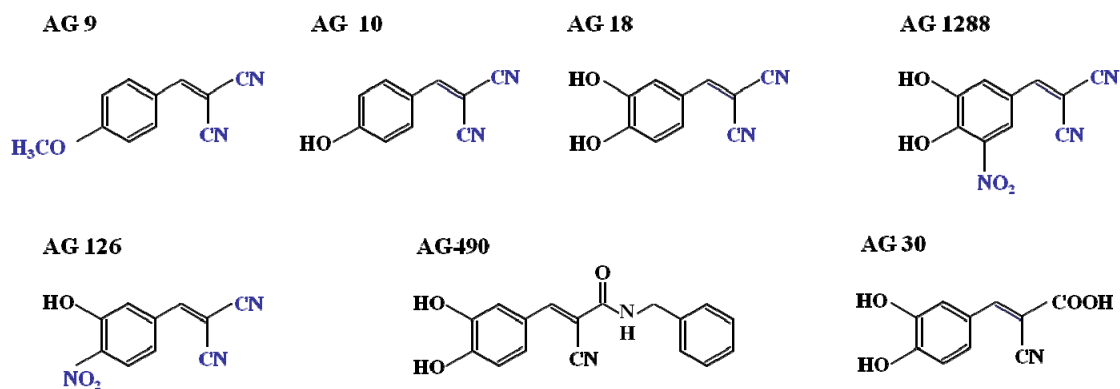
En 1994 Budde y colaboradores describieron que el AG18 y el AG82 poseían la capacidad de oxidarse en presencia de iones magnesio ( $Mn^{+2}$ ) en forma de  $MnCl_2$  o hierro ( $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$ ) en forma de  $FeSO_4$  y  $FeCl_3$  respectivamente. Esta reacción había sido previamente descrita en otros compuestos con un anillo bencénico polihidroxilado como el ácido caféico y la erbstatina<sup>254</sup> (Figura 1.18). Los productos resultantes de la reacción de oxidación resultaron ser más potentes a la hora de inhibir la actividad quinasa de receptores como el EGFR y  $pp60^{c-src}$  que la tirfostina de la que procedían y sugirieron que el retraso, con el que las tirfostinas inhibían receptores tirosin quinasa (RTKs) en ocasiones, podía ser debida a la necesaria formación de estos subproductos<sup>255</sup>.



**Figura 1.18. Estructura de las tirfostinas que interaccionan con metales.** Estructuras químicas del ácido caféico y la erbstatina como compuestos naturales con anillo bencénico polihidroxilado y las de las tirfostinas AG18 y AG82 por su capacidad de interaccionar con metales.

### 1.6.3.5. Tirfostinas que estimulan la expresión de genes

Recientemente se ha demostrado que algunas tirfostinas como AG9, AG10, AG18, AG1288 y mayoritariamente AG126, actúan como potentes activadores de la expresión de genes regulados por NO y por actividad redox como el gen de la hemo-oxigenasa 1 (HO-1), la H-ferritina, interleuquina 8 (*IL-8*) o el factor activador de la transcripción 3 (*ATF3*). Esta estimulación es independiente de su actividad inhibidora de TK y se produce a través de la activación de sistemas de señalización como p38 MAPK o factores de transcripción como AP-1 y Nrf2. La comparación de la estructura química de estos compuestos con la de otras tirfostinas, ineficaces a la hora de estimular la expresión de estos genes, como AG30 y AG490, parece indicar que la presencia de los grupos nitrilos del malonitrilo son esenciales en esta activación y que los grupos nitro o 4-metoxi en el anillo bencénico la potencian<sup>256</sup> (Figura 1.19).

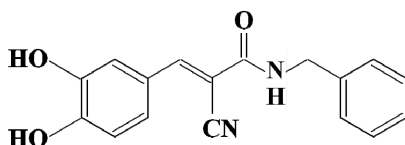


**Figura 1.19. Estructura de las tirfostinas que estimulan la expresión de genes regulados por NO y actividad redox.** Estructura química de las tirfostinas AG9, AG10, AG18, AG1288 y la más potente AG126, con capacidad de estimular la expresión de genes regulados por NO y actividad redox. En azul los sustituyentes nitro y 4-metoxi en el anillo bencénico y los grupos nitrilos indispensables para la activación. Así mismo se muestran las estructuras de otras dos tirfostinas, AG490 y el AG30, que no muestran esta actividad y que son relevantes para el estudio de este trabajo ya que el AG490 es nuestra tirfostina de estudio.

## 1.7. AG490

La incorporación de dos grupos hidroxilos en las posiciones 3 y 4 del anillo bencénico y del grupo N-bencil acetamida en la posición  $\alpha$  del núcleo estructural de las tirfostinas, generó el compuesto denominado AG490, tirfostina B42 o (E)-N-bencil-2-ciano-3-(3,4-dihidroxyfenil) acrilamide <sup>257</sup> (Figura 1.20).

### AG 490



*Figura 1.20. Estructura química del AG490. Grupos hidroxilos en las posiciones 3 y 4 del anillo bencénico y grupo N-bencil acetamida en la posición  $\alpha$  del núcleo estructural de la tirfostina.*

En uno de los primeros trabajos publicados en los que se utilizó AG490 como inhibidor de la actividad tirosina quinasa se tenía como objetivo determinar las fosforilaciones que tenían lugar en el proceso de activación de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) por la interleuquina 7 (IL-7). El bloqueo con AG490 de la fosforilación sobre la subunidad p85 de PI3K estableció la implicación de la tirosina quinasa JAK3 y caracterizó al AG490 como inhibidor de esta tirosina quinasa <sup>258;259</sup>.

Poco después, Meydan y colaboradores utilizaron el AG490 como inhibidor general de PTKs, en la búsqueda de tirosina quinasas relacionadas con el crecimiento celular en la leucemia linfoblástica aguda. El AG490 tuvo un efecto citotóxico sobre este tipo celular y fue por primera vez caracterizado como un potente inhibidor de JAK2 <sup>260</sup>.

### 1.7.1. Acciones descritas del AG490

#### 1.7.1.1. AG490 inhibe EGFR

Como ya se mencionó las tirfostinas fueron sintetizadas inicialmente como inhibidores del PTKs. Así, ya Gazit y colaboradores demostraron que los grupos hidroxilos sobre el anillo aromático incrementaban el potencial de las tirfostinas para inhibir la actividad del receptor de EGFR y disminuir la proliferación dependiente de EGF en líneas celulares de carcinoma epidérmico humano. Un exhaustivo estudio enzimático catalogó este compuesto como inhibidor competitivo reversible del ATP y no competitivo con el sustrato en el EGFR. <sup>209;210;257</sup>.

### 1.7.1.2. AG490 inhibe JAKs

A raíz de los trabajos de Dadi, Sharfe y Meydan, el AG490 se ha convertido en una poderosa herramienta bioquímica con la que definir la implicación de la ruta JAK/STAT en los procesos de señalización celular. Además, el hecho de que la fosforilación de JAK2, con gran actividad tirosina quinasa, sea constitutiva en múltiples mielomas y linfomas ha determinado el creciente interés de este compuesto y sus derivados como inhibidores de la progresión neoplásica. De hecho, la mayor parte de las publicaciones a día de hoy relacionadas con la tirfostina AG490 hace referencia a la inhibición específica de esta ruta (Tabla 1.3).

*Tabla 1.3. Principales acciones de AG490 sobre la ruta JAK/STAT. Trabajos más relevantes relacionados con la inhibición de la fosforilación de JAK/STAT por AG490, el tipo de estímulo bloqueado en la ruta, su efecto biológico y el sistema en el que ha sido estudiado.*

Fosforilación inhibida	PTK implicada	Estímulo	Efecto biológico	Sistema estudiado	Ref
ND	ND	Ionóforo de calcio A223187 y PMA	Inhibe la proliferación de los timocitos.	Timocitos	261
Tirosinas de PLC $\gamma$	ND	FC $\epsilon$ R1 acoplados	Inhibe la hidrólisis de fosfatidil inosítidos y la respuesta secretora en mastocitos.	Mastocitos	262
ND	ND	CD40	Inhibe el rescate de las células B apoptóticas	Células B	263
ND	ND	Factor de crecimiento de mastocitos	Muerte celular activa	Células hematopoyéticas progenitoras	264
p85 de PI3K	JAK3	IL-7	Inhibe la proliferación	Timocitos y linfocitos	258;259
JAK2		NO	Bloquea el crecimiento induciendo la muerte celular programada	Línea celular de leucemia linfoblástica aguda	260
	ND	EGF	Bloquea la activación de Cdk2	DHER-14	265
NO	NO	Endotoxina y LPS	Inhibe la formación de NO / Disminuye el fallo circulatorio / Atenúa el daño hepático y pancreático, la hipoglucemia y la acidosis láctica / Disminuye TNF- $\alpha$ sérica	Macrófagos cultivados ratas	266
STAT3	JAK3	NO/IL-2	Inhibe la proliferación de líneas celulares tumorales de micosis fúngica	Linfoma de células T	267
JAK3	STAT5	IL-2	Inhibe la proliferación de células T activadas por antígeno	Células T humanas	268
JAK2	STAT3 ERK2	IL-6	Suprime la proliferación celular y la apoptosis	Líneas celulares de mieloma	269
STAT3	JAK3	NO y Síndrome Sezary	Impide la activación de STAT3	Células T de Linfoma cutáneo	270
	JAK2		Inhibe la proliferación	Líneas celulares leucémicas de linfoma humano: precursor B y células T	271
STAT3			Disminuye JAK2 constitutiva pero no la fosforilada Suprime la proliferación celular	Células de cáncer de ovario OV1063	272
JAK2	Epo			Bloquea la ubiquitinación del Receptor de Epo	273
STAT3	ND		Inhibe la fosforilación de STAT3		274
JAK2	STAT1 y STAT3	I/R	Mejora la función renal, las lesiones histológicas y reduce la apoptosis.	Células epiteliales renales <i>in vivo</i>	275
STAT1 y STAT3	JAK2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , INF $\gamma$ e IL-6	Previene la muerte celular	Astroцитos de rata	276

## Janus quinasas

Los receptores de citoquinas se distinguen de otros RTKs en que no poseen en sí mismos la actividad catalítica sino que ésta es proporcionada por otras proteínas que permanecen asociadas al dominio citoplasmático de dichos receptores. Estas proteínas son las que poseen la actividad quinasa y son conocidas como las Janus quinasas. La familia de JAKs fue descubierta en la década de los 90<sup>216;277-279</sup> como una familia de quinasas citoplásmicas relativamente grandes, de aproximadamente 1150 aminoácidos y unos pesos moleculares de 120-130 kDa, compuesta por cuatro miembros diferentes: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 de expresión ubicua.

Lo más distintivo en la estructura de estas quinasas es la existencia de dominios quinasa y pseudoquinasas en tándem y la existencia de siete regiones de homología a Jak (JH) de función todavía no identificada. El dominio JH1 tiene todas las características de un dominio tirosina quinasa típico y la mutación de un residuo conservado de Lys, en el que se une el ATP, inactiva la función quinasa.

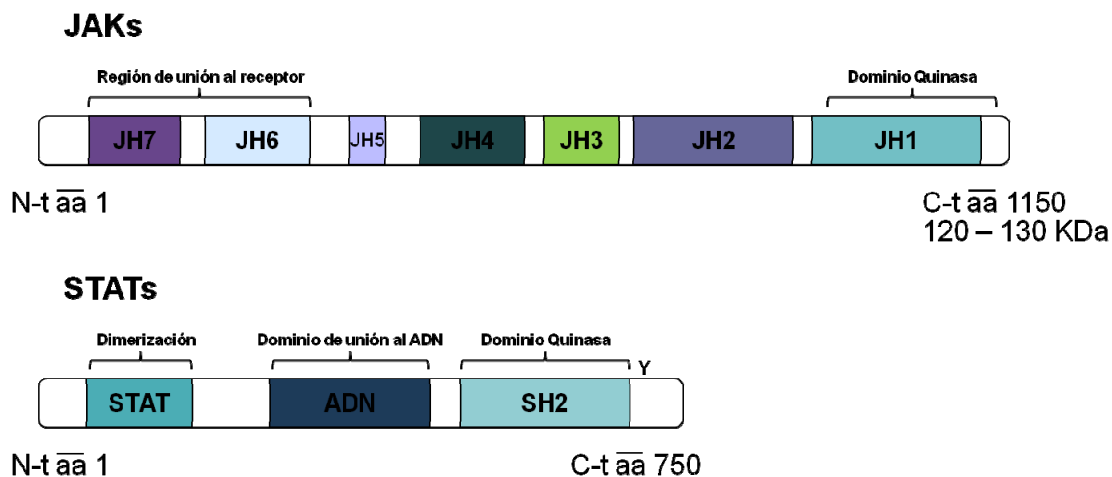
Se han identificado múltiples residuos de autofosforilación cuya sustitución mutacional pueden bloquear tanto la actividad quinasa, y por tanto la capacidad de transmitir la señalización mediada por citoquinas, como la fosforilación de tirosinas dependiente de ligando sin abolir su propia actividad quinasa<sup>280</sup>.

La unión del ligando al receptor de citoquinas provoca la dimerización de éste y acerca entre sí a las JAKs asociadas. Se produce entonces una fosforilación cruzada entre JAKs incrementando la actividad quinasa de éstas y permitiendo el anclaje y la fosforilación y dimerización de otras proteínas denominadas STATs (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) que actúan, una vez activadas, como factores de transcripción. Estos factores son reclutados por el receptor a través de dominios SH2 donde son fosforiladas en tirosinas por las proteínas JAKs.

Estas fosforilaciones permiten una dimerización, a través de las interacciones intermoleculares de los dominios SH2 y las tirosinas fosforiladas, imprescindible para su traslado al núcleo celular y para la unión al ADN. La especificidad de la activación de STATs en respuesta a citoquinas está controlada por la capacidad del receptor de reclutar STATs específicas (Figura 1.21).

Las JAKs son cruciales en las vías de transducción de señales implicadas en la supervivencia, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis ya que, además de permitir la activación de STATs, son capaces de integrar diversas cascadas de señalización como la cascadas Src-quinasa, la vía Ras-MAP quinasa y la vía PI3K-AKT<sup>279</sup>.

Sin embargo, y a pesar de la gran variedad de resultados, nuevos trabajos demuestran que el AG490 no es tan específico para las JAKs.



**Figura 1.21. Estructura de JAKs y STATs.** Dominios tipo quinasa en tándem y dominio catalítico C-terminal. El extremo N-terminal de las JAKs es importante para la asociación con los receptores de citoquinas. En la estructura de las proteínas STATs se muestra el residuo conservado de tirosina cuya fosforilación permite la dimerización de las STAT, el dominio de homología SH2 que media la dimerización, el dominio de unión al ADN y la región N-terminal imprescindible en la dimerización. (Adaptado de Leonard WJ, *Annual Review of Immunology* 1998. 16:293-322, pag 296<sup>280</sup>).

### 1.7.1.3. AG490 inhibe otros receptores con actividad tirosina quinasa

AG490 ha demostrado ser diez veces más potente que otras tirfostinas (AG494, AG555 y AG556) en la inhibición de la vía de señalización del receptor c-Kit, esencial en el desarrollo y la supervivencia de las células madre hematopoyéticas in vivo<sup>264</sup>; o en la inhibición de la fosforilación del receptor de interleucina 7 (IL-7R) en timocitos y linfocitos<sup>258</sup>.

### 1.7.1.4. AG490 inhibe GCs y ACs

Como ya se mencionó, en 2004 Jaleel y colaboradores testaron el efecto de diversos inhibidores de proteínas quinasas sobre la actividad de las guanilil y adenil ciclasas. Encontraron que las tirfostinas, AG490 y AG82, tenían una gran capacidad para inhibir GCs y ACs a nivel del dominio catalítico. La evaluación de diversas tirfostinas permitió identificar los grupos hidroxilos 3, 4 y 5 como el motivo clave para la efectiva inhibición de la actividad ciclasa. Sólo las tirfostinas con dos o tres grupos hidroxilos poseían la capacidad de interactuar con el dominio catalítico de las ciclasas. La posición de los grupos hidroxilos parece ser clave en esta inhibición gracias al establecimiento de enlaces coordinados entre la tirfostina y los átomos metálicos que actúan como cofactor de las ciclasas<sup>248</sup>.

### 1.7.1.5. Acciones descartadas del AG490

La incorporación de nuevas moléculas a la práctica clínica requiere de una profunda comprensión de sus métodos de actuación. La ausencia de eficacia a su vez amplía este conocimiento y previene de acciones no deseadas o inesperadas. Recientes estudios revelaron la capacidad de algunas tirfostinas (AG126, AG9, AG10, AG18) de estimular, en células monocíticas U-937, la expresión de genes como *hemooxigenasa 1*, *H-ferretina*, *ATF3* o *IL-8*, dependientes de óxido nítrico. La ausencia de grupos 4 nitro o 4 metoxi en el anillo benzénico y la de dos grupos ciano en el residuo malonitrilo del AG490, lo convierten en un regulador ineficaz de estos genes <sup>256</sup>.

### 1.7.2. AG490 en el daño renal agudo

Los inhibidores de PTK son efectivos en el tratamiento de diversas patologías humanas. Al imatinib, primer inhibidor de PTKs introducido en la práctica clínica, le siguieron compuestos como el gefitinib, erlotinib, sorafenib, sunitinib y el dasatinib. Todos estos compuestos compartían el mismo mecanismo de acción, una inhibición competitiva con el ATP en el sitio catalítico de la PTK, pero diferían en el espectro de quinasas diana y en el modelo farmacocinético <sup>281</sup>. Otro inhibidor de EGFR, el inhibidor oral gefitinib (Iressa) está disponible clínicamente desde 2002 para el tratamiento de pacientes portadores de mutaciones en *EGFR* que han desarrollado cáncer de pulmón. Las tirfostinas son inhibidores de PTKs mucho más específicos que los inhibidores no tirosina quinasa. La familia de las tirfostinas, y otros inhibidores de PTKs, han sido evaluados en diversos sistemas biológicos. Estas aplicaciones han permitido descubrir diferentes patrones de especificidad y acciones biológicas.

Las PTKs tienen un importante papel en múltiples vías de señalización activadas en el daño renal agudo, apoptóticas, inflamatorias y de supervivencia, que implican a receptores PTKs como EGFR, PDGFR y JAK. Como estas proteínas se encuentran en el inicio de las cascadas de señalización regulan complejas vías y su bloqueo podría modular la expresión y actividad de múltiples e importantes mediadores de señalización. Esto hace de las tirfostinas unas moléculas atractivas no sólo para el estudio de la patofisiología del daño renal agudo sino también como agentes terapéuticos. Adicionalmente algunos de los factores de crecimiento capaces de ser bloqueados por las tirfostinas modulan la regeneración renal y protegen a las células tubulares del daño. Se han publicado de forma aislada casos de fracaso renal agudo en pacientes oncológicos tratados con los inhibidores gefitinib e imatinib (Gleevec) <sup>282-284</sup>.

En la práctica clínica la etiología del daño renal agudo es multifactorial. No obstante la utilización de modelos animales permite un estudio más dirigido a diferentes agentes



## *1. Introducción*

---

etiología. Las tirfostinas han sido utilizadas para modular el daño experimental por isquemia/reperfusión (I/R), por sepsis o el inducido por nefrotoxinas<sup>266,275,285-288</sup>.

Cinco tirfostinas han sido exploradas como agentes terapéuticos del daño renal agudo experimental: AG9, AG126, AG490, AG556 y AG1714. En la tabla 1.4 se resumen las principales acciones descritas para estas tirfostinas (Tabla 1.4 y Tabla 1.5).

Tirfostina	Acciones	Ref.
AG9	Sobreexpresa el gen de la hemoxigenasa 1 en células monocíticas U-937 (no relacionada con la inhibición de PTKs)	256
	Inhibe la fosforilación de Tyk-2 (miembro de las JAK) en células T activadas	289
	Previene la activación de STAT inducida por LPS en pulmón y disminuye la producción de proteínas proinflamatorias TNF $\alpha$ e IL6	290
AG126	Potente activador de la expresión de HO-1, H-ferritina, ATF3, IL8 y varios genes regulados por NO y redox en células monocíticas U-937 (no relacionada con la inhibición de PTKs)	256
	Inhibe la producción de TNF $\alpha$ inducida por LPS en macrófagos <i>in vitro</i>	288
	Inhibe la producción de NO en células cultivadas y la citotoxicidad de TNF $\alpha$	288
	Reduce la nitrotirosina, la poli ADP-ribosa, iNOS y COX2 en tejidos de rata tratados con zymosan y reduce significativamente la producción de peroxinitritos y citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ )	291
AG490	Potente inhibidor específico de JAK2, de EGFR, de la síntesis de ADN e induce la apoptosis	210;292
	Inhibe el crecimiento de células leucémicas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	260
	Bloquea la activación constitutiva de STAT3 e inhibe tanto la liberación de IL1 como el crecimiento espontáneo de funjoides	267
	Suprime el crecimiento de líneas tumorales celulares de cáncer ovárico y de pecho a través de la inhibición de JAK/STAT3	268;269; 293
	Reduce la formación de ROS y la oxidación protéica inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , FeSO <sub>4</sub> y NP en células gliales (efecto independiente de JAK2)	294
	Inhibidor de Guanilato ciclasas	248
AG556	Inhibidor de EGFR ErbB2	210;295
	Inhibidor de Guanilato ciclasas	248
AG1478	Potente inhibidor específico de EGFR	257;295
	Débil inhibidor de PDGFR y Her2/neu	257
	Inhibe la activación de ErbB4 por radiación en células cancerígenas	296
	Suprime la activación de MPAK e inhibe fuertemente la expresión de genes y la síntesis de ADN	297
AG1714	Reduce la apoptosis mediada por TNF $\alpha$ en fibroblastos murinos en cultivo	298
	Induce la desestructuración de microtúbulos	299

**Tabla 1.4. Principales acciones de las tirfostinas estudiadas en daño renal agudo.** Resumen las acciones más relevantes de las tirfostinas estudiadas en daño renal agudo y la bibliografía de referencia.

## 1. Introducción

Tirfostina	Acción	Daño renal agudo por		
		I/R	Sepsis	Nefrotoxicidad
AG9	Profiláctica		Mejora la función renal y los cambios hemodinámicos <sup>266</sup>	
AG126	Profiláctica	Mejora la función renal, reduce NAG y de FENa; reduce los signos histológicos de daño renal, inhibe la expresión de COX2 e iNOS en el riñón; reduce el estrés nitrosativo y la formación de PAR <sup>300</sup>		
	Profiláctica	Reduce significativamente los niveles de urea pero no los de creatinina <sup>286</sup>		
	Profiláctica		Mejora la función renal y los cambios hemodinámicos <sup>266</sup>	
	Terapéutica (2h después)		No mejora la función renal ni los cambios hemodinámicos <sup>266</sup>	
AG490	Profiláctica	Mejora la función renal y reduce las lesiones histológicas, la infiltración de macrófagos y la expresión de MCP-1 e ICAM-1. Reduce la apoptosis de células del epitelio tubular <sup>275</sup>		
	Profiláctica	Mejora la función renal, reduce el daño tubular y endotelial y la infiltración de leucocitos. Atenúa el estrés oxidativo <sup>285</sup>		
	Terapéutica (3h después)	No mejora la función renal <sup>275</sup>		
	Profiláctica		Mejora la supervivencia y la función renal. Disminuye el daño tubular, la infiltración y las lesiones glomerulares. Inhibe la expresión de STAT1, STAT3 y C5aR en riñón <sup>287</sup>	
	Profiláctica			Disminuye el daño capilar peritubular y el tubular por ciclosporina <sup>285</sup>
AG556	Profiláctica		Mejora la función renal y los cambios hemodinámicos <sup>266</sup>	
AG1714	Profiláctica			Reduce la nefrotoxicidad por cisplatino sin afectar a su efecto antitumoral y reduce la mortalidad general <sup>301</sup>
	Terapéutica (2h después)			Menor efecto que en la administración profiláctica <sup>301</sup>

**Tabla 1.5. Principales tirfostinas estudiadas en daño renal agudo in vivo.** Resumen las acciones más relevantes de las tirfostinas estudiadas en daño renal agudo in vivo. Se entiende por profiláctica toda droga administrada antes o inmediatamente después del daño.

De estas cinco tirfostina, la más ampliamente estudiada ha sido AG490.

### 1.7.2.1. AG490 en el daño renal agudo por isquemia reperusión

La hipoperfusión de los riñones, incluidos los riñones manipulados para trasplante renal, puede provocar daño renal isquémico. La patogenia del daño renal agudo isquémico es multifactorial e incluye alteraciones en la hemodinámica renal, el metabolismo de las células renales, la apoptosis de células renales, la respuesta inflamatoria, los cambios en el calcio intracelular y el estrés oxidativo <sup>17</sup>.

El receptor EGFR activa señales extracelulares reguladas por quinasas ERK y elementos de respuesta a adenosina monofosfato cíclica (CREB) <sup>302;303</sup> liberando una señal de supervivencia a las células tubulares renales expuestas a un moderado daño oxidante. En estas circunstancias el bloqueo de la inhibición de EGFR disminuye la supervivencia celular <sup>304</sup>. Por otro lado, las células tubulares necróticas expresan dicho receptor tras el daño renal por I/R. Esto sugiere una doble función para este receptor, pro-supervivencia o pro-mortalidad <sup>305</sup>. De hecho, en el daño por I/R, las células del túbulo proximal necróticas fallan al activar ERK y otras vías de supervivencia a pesar de la activación de EGFR <sup>306;307</sup>. La activación de la vía JAK/STAT podría contribuir a esta inhibición de la señalización para la supervivencia EGFR/CREB. Por otro lado las especies reactivas de oxígeno (ROS) provocan la activación de JAK/STAT durante la I/R <sup>308</sup>. También lo hacen las citoquinas inflamatorias que se liberan <sup>13</sup> lo que a su vez contribuye a amplificar la respuesta inflamatoria incrementando el daño renal. La activación de STAT3 en respuesta al estrés oxidativo severo interrumpe la vía de señalización de supervivencia mediada por EGFR y ERK tanto en células de túbulo proximal en ratones <sup>304</sup> como en modelos de daño renal agudo por I/R *in vivo* <sup>304</sup>.

Estos hechos ofrecen una oportunidad terapéutica para el AG490. Esta tirfostina desminuye la fosforilación de STAT3 y reduce la muerte celular a través del restablecimiento de la activación de ERK en células de túbulo proximal cultivadas y expuestas a estrés oxidativo severo <sup>304</sup>. Sin embargo hay que tener en cuenta las acciones tanto proapoptóticas como antiapoptóticas asignadas a la actividad tirosina quinasa de JAK2 en diversos sistemas celulares <sup>309-314</sup>. Los factores que determinan estas diferentes actividades son poco entendidas por el momento ya que dependen del tipo celular o de los estímulos específicos. Como se comentó con anterioridad AG490 podría perjudicar la acción pro-supervivencia de ciertas citoquinas. Así los resultados en células cultivadas no pueden ser extrapolados a situaciones *in vivo* y estudios que abarquen la compleja variedad de tipos celulares y mediadores en el daño renal agudo *in vivo*, son necesarios para confirmar cualquier hipótesis con respecto al efecto protector de las tirfostinas.

Los posibles beneficios terapéuticos del AG490 han sido así explorados *in vivo* en modelos animales de I/R. El tratamiento diario con AG490 iniciado antes o

inmediatamente después de la I/R inhibió significativamente la fosforilación de JAK2, STAT1 y STAT3 en daño renal por I/R en ratas y la expresión de moléculas de adhesión intercelular ICAM-1<sup>275</sup>. Estas moléculas promueven las interacciones leucocito-endotelio, están asociadas con la disfunción endotelial y sobreexpresadas en modelos de daño renal agudo por I/R<sup>315</sup>. Las ICAM-1 están relacionadas con la activación de JAK/STAT<sup>316</sup> y tienen un papel nocivo en el daño por I/R<sup>317;318</sup>.

*In vivo* el tratamiento con AG490 también disminuye la infiltración renal de macrófagos y la expresión de la proteína quimiotáctica MCP-1 tras la isquemia sugiriendo un efecto antiinflamatorio de la tirfostina. AG490 mejoró así la función renal, atenuando las lesiones histológicas y reduciendo la apoptosis de las células de epitelio renal otorgando un potencial beneficio terapéutico para el tratamiento del daño renal agudo por isquemia con AG490 en humanos<sup>275</sup>.

Diversos investigadores han demostrado también la eficacia profiláctica del AG490 en la función renal, en la reducción del estrés oxidativo y en la disminución del daño histológico tubular y renal<sup>285</sup>. No obstante el tratamiento 3 horas después de la I/R inducida falló a la hora de mejorar la función renal<sup>275</sup> demostrando que la intervención temprana en el tratamiento renal de una I/R es crítica<sup>275</sup>.

Aunque todos estos estudios sostienen que AG490 podría ser utilizado en la profilaxis del daño renal por I/R son necesarios estudios adicionales que permitan establecer consistentemente su potencial como agentes terapéuticos, sobre todo en situaciones críticas como la donación de riñones y la cirugía cardiovascular.

### 1.7.2.2. AG490 en el daño renal agudo inducido por sepsis

La administración de endotoxinas lipopolisacárido (LPS) o de zymosan a animales de experimentación es un método frecuentemente utilizado para simular un modelo humano de sepsis. Un estudio inicial en el que se trataron ratones con la tirfostina AG126 redujo la toxicidad letal inducida por LPS. El efecto protector de esta tirfostina se relacionó con la inhibición de la producción de TNF $\alpha$  y NO y la disminución de la fosforilación proteica. AG126 confería una protección casi total cuando se inyectaba antes del tratamiento con LPS<sup>288</sup>.

AG126 también se ha visto que atenúa el daño intestinal, pulmonar y hepático inducido por zymosan<sup>291</sup>. Aunque los efectos renales no se han descrito específicamente en estos estudios, investigaciones posteriores han demostrado que la administración simultánea de AG126 con LPS atenúa significativamente el incremento de creatinina sérica en un modelo de sepsis en rata. También las tirfostinas AG556 y AG9 mejoraron significativamente la función renal en este modelo. En este caso también el momento de administración parece tener relevancia ya que el tratamiento posterior a la administración de endotoxina hizo perder esta mejoría<sup>266</sup>.

AG490 también ha demostrado tener acciones beneficiosas en sepsis inducida por zymosan en hígado, pulmón y riñones de ratones. Disminuyó la fosforilación de STAT1 y STAT3, atenúo la fase inicial del shock inducido por zymosan, redujo los niveles plasmáticos de citoquinas inflamatorias (TNF $\alpha$  e IL-6) y de factores quimiotácticos como la proteína inflamatoria de macrófagos MIP1 $\alpha$ , RANTES y C5aR e incrementó los niveles plasmáticos de la citoquina antiinflamatoria IL-10. AG490 también mejoró parámetros morfológicos como el daño tubular, la infiltración celular y las lesiones glomerulares o funcionales disminuyendo los niveles de creatinina sérica o la secreción protéica urinaria <sup>287</sup>.

### 1.7.2.3. AG490 en el daño renal agudo asociado a ciclosporina

La ciclosporina es una droga inmunosupresora usada en el trasplante renal y en los desórdenes inmunosupresores. La nefrotoxicidad crónica y aguda es su principal efecto adverso <sup>266</sup>. El estrés oxidativo promueve el daño celular en el endotelio y el epitelio tubular proximal renal durante una nefrotoxicidad por ciclosporina o una I/R <sup>319-322</sup>. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el estrés oxidativo y la ciclosporina inducían la fosforilación de JAK2 y STAT3 en este tipo celular <sup>285</sup>. En células en cultivo la administración del AG490 previno la fosforilación de STAT3 e incrementó significativamente la relación Bcl2/Bax, previniendo la disminución de Bcl2, y promoviendo de esta forma la supervivencia celular. Además AG490 disminuyó la actividad de caspasa 3 inducida por especies reactivas de oxígeno y la muerte celular. *In vivo* AG490 tuvo efectos profilácticos disminuyendo el daño tubular y capilar peritubular en un modelo murino <sup>285</sup>.

### 1.7.2.4. AG490 en el daño renal agudo inducido por cisplatino

El cisplatino es un medicamento basado en el platino usado en quimioterapia para el tratamiento de varios tipos de cáncer, entre los que se incluyen sarcomas, algunos carcinomas (p.ej. cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de ovario), linfomas y tumores de células germinales. El efecto deletéreo sobre la función renal requiere la reducción de las dosis administradas que limitan su eficacia antineoplásica. La nefrotoxicidad por cisplatino provoca la acumulación de la droga en las células tubulares provocando la muerte celular tanto *in vitro* como *in vivo*.

Un reciente estudio investigó el papel de las tirfostinas y de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en la muerte celular inducida por cisplatino <sup>323</sup>. Este compuesto indujo la apoptosis de células de túbulo proximal murino y activó diversos miembros de la familia de las MAPKs como ERK, JNK y p38, tanto *in vivo* como *in vitro*. En este modelo de daño renal la inhibición de ERK, pero no de JNK o p38, abolieron la activación de caspasa 3 y la muerte apoptótica sugiriendo un papel inductor de ERK en la muerte celular. Esto contrasta con el papel de ERK en el daño por oxidación, donde actúa favoreciendo la supervivencia celular y donde el pretratamiento de células de túbulo

proximal cultivadas tratadas con AG1478 disminuyó la activación de ERK inducida por cisplatino y la apoptosis. Adicionalmente AG1478 favorece el efecto antitumoral del cisplatino<sup>324;325</sup>. Esto sugiere que la inhibición de EGFR con AG1478 podría proporcionar una oportunidad para disminuir la nefrotoxicidad, mientras mantiene la actividad antitumoral, en pacientes tratados con cisplatino. No obstante la acción nefroprotectora *in vivo* no ha sido todavía evaluada.

*In vivo* otra tirfostina, la AG1714, redujo la nefrotoxicidad por cisplatino en ratones mejorando su efecto antitumoral. Este efecto terapéutico era máximo cuando se administraba 2 horas antes del cisplatino. La administración 7 días ó 24 horas antes, e incluso 2 horas después de la inyección con cisplatino la hizo menos efectiva. Esta tirfostina también protegió del daño intestinal inducido por cisplatino o del daño tisular inducido por doxorubicina. El AG1714 también se ha visto implicado en la desestructuración de los microtúbulos<sup>299</sup> y es clave por ello en la progresión del ciclo celular. De hecho está claro que durante la nefrotoxicidad por cisplatino las células renales quiescentes entran al ciclo celular, como muestran las tinciones con antígenos nucleares y la incorporación de 5'-bromodeoxiuridina en el núcleo<sup>325</sup>.

En relación a esto es interesante destacar el papel que tuvo AG490 en la atenuación de la activación de JAK2 y STAT5 inducida por eritropoyetina en células tubulares de riñón humanas en cultivo y tratadas con cisplatino<sup>326</sup>. La activación incrementada de ERK en este contexto podría estar contribuyendo a la disminución de la supervivencia promovida por AG490. No obstante ERK y su activación no fueron evaluadas en este estudio y no existen estudios *in vivo* que nos permitan cerciorarnos del papel del AG490 en el daño renal agudo inducido por cisplatino.

### 1.7.3. Posibles implicaciones biológicas y fisiopatológicas de la acción del AG490 sobre HIF-1 $\alpha$

A continuación, revisaremos los posibles efectos de la activación de HIF-1 por efecto del AG490 en otras situaciones patológicas diferentes.

#### 1.7.3.1. Anemia y eritropoyesis

HIF-1 es esencial en la inducción fisiológica del gen de la eritropoyetina (EPO) y actúa al menos, sobre tres genes relevantes en el efecto de eritropoietina sobre el organismo: el de la transferrina, necesaria para la aportación de hierro a células eritroides, el del VEGF, cofactor en la estimulación de estas mismas células y el de la eNOS, necesaria para la producción de NO y el mantenimiento de la presión arterial durante la actuación de la EPO. Este último efecto es de tal importancia que en ratones transgénicos para la EPO humana y con una eNOS inhibida se llega a producir la muerte por numerosas

complicaciones cardiovasculares<sup>327</sup>. Como patología asociada, personas con mutaciones estimuladoras de HIF-1, como son las mutaciones del gen para pVHL, presentan policitemia familiar o eritrocitosis paraneoplásica<sup>328</sup>. La EPO no sólo tiene funciones como regulador de la eritropoyesis. También participa en diferentes mecanismos como la vascularización retiniana y de la glándula mamaria, la diferenciación de adipocitos, la maduración embrionaria de la cresta neural, la citoprotección de las neuronas, los miocardiocitos y los túbulos renales en situaciones de I/R<sup>329</sup>. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que aumenta la EPO en la anemia humana no ha sido satisfactoriamente descrito, y por ejemplo, pacientes en Unidades de Cuidados Intensivos pueden tener niveles de EPO demasiado bajos para el grado de anemia que presentan; las causas de este efecto no se conocen suficientemente, y quizás estudios acerca del grado de actividad de HIF-1 en estos pacientes podría ayudar a entender este fenómeno<sup>330</sup>.

### 1.7.3.2. Enfermedad cardiaca

En la isquemia miocárdica se han detectado aumentos de VEGF relacionados con estimulación hipóxica<sup>331</sup> y los niveles de este factor de crecimiento en leucocitos expuestos a hipoxia se correlacionan con el grado de formación de colaterales inducida por isquemia coronaria *in vivo*<sup>332</sup>. En este sentido, es de prever que los desarrollos terapéuticos se dirigirán progresivamente a drogas que aumenten la activación de HIF-1 o inhiban su degradación, como por ejemplo el PR39, un péptido derivado de los macrófagos que induce angiogénesis miocárdica<sup>333</sup>. Un segundo aspecto de interés es el del papel de HIF-1 en el pre-condicionamiento cardíaco ante la isquemia, en el que la síntesis de nuevas proteínas en las primeras 24 h tras un episodio agudo tiene un papel relevante, con particular referencia a la eNOS en miocardiocitos y células endoteliales<sup>47</sup>. Por otro lado, la anemia es un factor patogénico relevante en la insuficiencia cardiaca aunque su origen es aún discutido<sup>334</sup>. La presencia de niveles elevados de EPO en pacientes con insuficiencia cardiaca hace probable que HIF-1 esté previamente estimulado, pero no se dispone aún de datos publicados en este sentido.

### 1.7.3.3. Ictus

En modelos de oclusión vascular en ratas, se ha visto un incremento de la expresión de ARNm de HIF-1 en la zona de penumbra o tejido viable circundante al infarto<sup>335</sup>. Esto coincide con la expresión de mensajeros de otros genes transactivados por HIF-1, como enzimas glucolíticas y VEGF, que promueven la supervivencia neuronal<sup>336</sup>. El desarrollo de fármacos que potencien la acción de HIF-1 podría significar una mejor recuperación del tejido afectado por el infarto o una disminución de la zona dañada.



### 1.7.3.4. Patología tumoral

El rápido crecimiento de los tumores hace que el desarrollo vascular en el tumor sea insuficiente y se generen zonas de hipoxia en el interior de la masa tumoral. Esta hipoxia activa HIF-1 y éste a su vez pone en marcha toda la familia de genes angiogénicos importantes para el tumor, entre ellos VEGF<sup>337</sup>. HIF-1 aumenta así la densidad y permeabilidad vascular dentro de los tumores facilitando su crecimiento y la indeseada metástasis ya que los vasos actúan como vía de salida para células cancerosa con capacidad para colonizar otros tejidos.

Independientemente de la hipoxia, en algunos tumores, como hemangioblastomas y carcinomas renales, la activación de HIF-1 está relacionada con la inactivación funcional del gen supresor para pVHL, lo que disminuye la degradación y aumenta el HIF-1 total de la célula aún en normoxia<sup>338;339</sup>. Aunque el incremento de HIF-1 en tumores es un hecho demostrado no se han desarrollado aún muchos abordajes terapéuticos basados en su bloqueo específico<sup>340</sup>. De hecho las causas de por qué, dentro de todos los genes dependientes de HIF-1 sólo se expresan con mayor intensidad algunos, son desconocidas y aunque se relacionan con la presencia de sitios co-reguladores de la unión HIF-1-HRE, este efecto debe estudiarse en mayor profundidad.

### 1.7.3.5. Patología retiniana

En modelos animales, se ha observado que la exposición a hiperoxia en el periodo neonatal, determina regresión vascular e isquemia, fenómenos similares a los descritos en la retinopatía de prematuros y que se relacionan con alteraciones de la expresión génica. Del mismo modo, se considera crucial el papel de factores como el VEGF en la neovascularización retiniana de la diabetes mellitus y otras retinopatías proliferativas<sup>341-343</sup>. Éste es uno de los campos en los que el progreso terapéutico puede ser más acelerado, ya sea mediante incremento o inhibición de HIF-1 y sus genes dependientes.

### 1.7.3.6. Preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado

En la preeclampsia, existe un fallo primario del trofoblasto a la hora de invadir el miometrio e inducir la remodelación de las arterias espirales uterinas durante la placentación. Esto provoca una disminución de la perfusión de la placenta y una situación de hipoxia que activa HIF-1, promueve la expresión de TGFβ3 y la síntesis del receptor soluble del VEGF<sup>344</sup>, que bloquean al propio VEGF y empeoran la perfusión de la placenta. En este contexto, son posibles las terapias dirigidas a la inhibición de HIF-1/TGFβ3 con oligonucleótidos antisentido, o la administración de VEGF. Por otro lado, existe una disminución de la perfusión placentaria e hipoxia en el crecimiento intrauterino retardado que quizás explique el aumento de la proteína de unión al factor de crecimiento insulínico o IGFBP-1 (*insulin growth factor binding protein-1*) en sangre de cordón umbilical de

neonatos con retraso de crecimiento <sup>79</sup>. El IGFBP-1, cuyo gen está regulado transcripcionalmente por HIF-1 de forma positiva, es a su vez un regulador negativo del propio factor de crecimiento insulínico IGF.

#### 1.7.3.7. Tabaco/Humo

Algunos de los mecanismos de carcinogénesis mediada por los hidrocarburos aromáticos policíclicos encontrados en el humo del tabaco y en la contaminación urbana, dependen de su unión a AhR y su dimerización con ARNT, proteína que también dimeriza con HIF-1 $\alpha$  para constituir HIF-1 <sup>24</sup>. Por otra parte, la exposición al humo del tabaco reduce la angiogénesis inducida por hipoxia, disminuyendo la expresión de VEGF y HIF-1 $\alpha$ , a través de una desestabilización de HIF-1 $\alpha$  por el monóxido de carbono producido en la combustión del cigarrillo. Esta supresión de genes angiogénicos es determinante en los efectos del tabaco sobre la microcirculación, habiéndose propuesto terapias basadas en la administración de vectores portadores de VEGF <sup>345</sup>. Sin embargo, recientemente se ha descrito cómo el CO puede ejercer un efecto citoprotector al ser capaz de inducir rápidamente HIF-1 $\alpha$  en macrófagos <sup>346</sup>.

#### 1.7.3.8. Heridas

El VEGF aumenta localmente durante la curación de heridas involucrando un mecanismo mediado por ROS <sup>347</sup>. En este contexto, la sobreactivación de la vía de HIF-1 puede ser útil para incrementar la vascularización, la permeabilidad vascular y la cicatrización en heridas donde el VEGF no haya aumentado suficientemente.



## ***OBJETIVOS***



## 2.1. Objetivo general

Las células endoteliales, las de músculo liso vascular y las de epitelio tubular renal son células fisiopatológicamente relevantes en el daño por isquemia/hipoxia. En el transcurso de diversos estudios sobre posibles agentes citoprotectores llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Carlos Caramelo (Fundación Jiménez Díaz, Madrid), se observó que la tirfostina AG490 inducía la expresión de HIF-1 $\alpha$  en células endoteliales. Sucesivos experimentos no sólo confirmaron este resultado sino que además constataron efectos similares en células de músculo liso vascular así como de epitelio tubular renal. Es entonces cuando desarrollamos la hipótesis de que la inducción de la expresión de HIF-1 $\alpha$  constituye una nueva acción del AG490, no descrita anteriormente y de gran potencial terapéutico. Para validar nuestra hipótesis, decidimos caracterizar experimentalmente los mecanismos moleculares implicados en la inducción de HIF-1 $\alpha$  por parte del AG490 así como validar su potencial uso terapéutico durante la lesión renal por isquemia-reperfusión. El diseño de estos experimentos, sus resultados y la interpretación de los mismos constituyen la presente Tesis Doctoral.

## 2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos fueron:

1. Estudiar las acciones del AG490 sobre la expresión de HIF-1 $\alpha$  en células relevantes para la lesión renal por isquemia-reperfusión.
2. Describir los mecanismos moleculares de este efecto.
3. Determinar la relevancia funcional de este efecto en modelos *in vitro*.
4. Abordar el potencial terapéutico de AG490 en modelos de isquemia-reperfusión *in vivo*.



## ***MATERIALES Y MÉTODOS***





## 3.1. Cultivos Celulares

### 3.1.1. Obtención y cultivo primario de células endoteliales de aorta bovina

Las células endoteliales de aorta bovina (CE), empleadas en cultivo primario, se aislaron a partir de fragmentos de aorta donados por el matadero Nombela (Coslada, Madrid). El método de obtención y cultivo es una modificación del protocolo descrito por Jaffe y colaboradores<sup>348</sup>. Se recogieron las aortas en DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) (Tabla 3.1) suplementado con los siguientes antibióticos: penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 µg/mL), anfotericina B (6,7 µg/mL), fluconazol (4 µg/mL) y vancomicina (6,4 µg/mL) (Tabla 3.2). Ya en el laboratorio y en condiciones de esterilidad, las aortas se limpiaron de tejido conectivo, se ligaron los vasos colaterales con hilo y se lavó su interior con DPBS para eliminar coágulos y restos de sangre. A continuación, con uno de los extremos sellados, se llenaron las aortas con colagenasa tipo II (0,5 mg/mL) (Tabla 3.2) disuelta en DPBS, se selló el otro extremo y se incubaron a 37 °C durante 20 minutos. La colagenasa tipo II digiere el colágeno de la matriz basal provocando la liberación de las CE que forman la capa superficial interna del vaso. Transcurrido el tiempo de incubación se añadió RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Tabla 3.2) para parar la acción de la colagenasa, se recogió el contenido de las aortas y éste se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, los pellets celulares se resuspendieron y homogenizaron en RPMI-1640 (Tabla 3.3), se sembraron en frascos de cultivo y se dejaron crecer en incubador en atmósfera controlada; 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humidificado. Alcanzada la confluencia, se eliminó el medio de crecimiento, se realizó un lavado con suero salino y las células se disgregaron con tripsina-EDTA (Tabla 3.2) para resembrar en nuevos frascos y ampliar el cultivo. Tras este primer pase las CE se dejaron crecer en MEM D-valina (Tabla 3.3) como medio selectivo para este tipo celular ya que otras células como los fibroblastos, que hubieran podido arrastrarse durante la digestión con colagenasa, son incapaces de metabolizar la D-valina<sup>349</sup>. Una vez que las CE llegaron a confluencia, se levantaron con tripsina-EDTA y se sembraron en placas a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup>. Los cultivos de CE se usaron entre los pases 2 y 5 para los diferentes experimentos.

Las células se caracterizaron como endoteliales por su fenotipo característico de crecimiento en monocapa y apariencia en "pavimento". Con anterioridad nuestro laboratorio realizó una caracterización exhaustiva de estas células incluyendo tinción para factor VIII<sup>350</sup>, F-actina y filamentos intermedios específicos del endotelio (desmina y vimentina).



*Figura 3.1. Obtención de células endoteliales de aorta bovina. Pasos de la obtención de células endoteliales de aorta bovina a partir de fragmentos donados.*

#### 3.1.2. Obtención y cultivo primario de células de músculo liso vascular de aorta bovina (CMLV)

Las células de músculo liso vascular de aorta bovina (CMLV), empleadas en cultivo primario, se aislaron tras la obtención de las CE de aorta bovina descrita anteriormente. El método de obtención y cultivo es el descrito por Campell y colaboradores<sup>351</sup>. Tras la extracción de las CE se abrió longitudinalmente la aorta y se raspó su cara interna con la hoja de un bisturí para garantizar la completa eliminación del endotelio. Para acceder a la capa interna se separaron mecánicamente la adventicia y la capa media. La capa interna se pasó a una placa de cultivo limpia y tras añadir unas gotas de medio DMEM al 1% de SFB se trocó con un bisturí en fragmentos de 1-3 mm<sup>2</sup> que se trasladaron a una nueva placa de cultivo. Para adherir los fragmentos a la placa y permitir la multiplicación y liberación de las células musculares se dejó evaporar el medio durante 15-20 minutos en la campana de flujo laminar y una vez fijados se añadió medio DMEM al 10% de SFB y se dejó cultivando a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en un incubador humidificado durante 15 días (Tabla 3.3). Una vez que las CMLV llegaron a confluencia, se levantaron con tripsina-EDTA y se sembraron en placas a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup>. Las células se usaron entre los pases 2 y 8 para los diferentes experimentos.

Todas las CMLV utilizadas en esta tesis proceden de un banco de trabajo del laboratorio y fueron caracterizadas como musculares por su fenotipo característico y apariencia en “haces”, su crecimiento en multicapa y su identificación con anti- $\alpha$ -Actina<sup>352</sup>.

### 3.1.3. Cultivo de células epiteliales de túbulo renal porcino (PTEC)

Las células epiteliales de túbulo renal porcino (PTEC), empleadas en cultivo primario, fueron aisladas y donadas por el laboratorio del Dr. Tejedor (Hospital Gregorio Marañón, Madrid)<sup>353;354</sup>.

Las células se resuspendieron y homogenizaron en una dilución 1:1 de HAM'S F12/DMEM (Tabla 3.3), se sembraron en frascos de cultivo y se dejaron crecer en incubador en atmósfera controlada; 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humidificado. Las células se usaron entre los pases 2 y 4.

### 3.1.4. Cultivo de células tubulares proximales murinas (MCT)

La línea de células tubulares proximales murinas (MCT) se obtuvo del laboratorio del Dr. Egido (Fundación Jiménez Díaz, Madrid) y se generaron por Eric Neilson en la Universidad de Pennsylvania<sup>355</sup>.

Las células se resuspendieron y homogenizaron en medio RPMI 1640 (Tabla 3.3), se sembraron en frascos de cultivo y se dejaron crecer en incubador en atmósfera controlada; 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humidificada.

### 3.1.5. Cultivo de células claras de carcinoma renal (RCC4)

La línea de células claras de carcinoma renal humano deficientes en VHL (RCC4-VHL-) y su control positivo, obtenido mediante la reintroducción de un gen *VHL* (Gene ID: 7428) funcional (RCC4-VHL+), se obtuvieron del laboratorio del Dr. Landázuri (Hospital de la Princesa, Madrid)<sup>147;356</sup>.

Las células se resuspendieron y homogenizaron en medio RPMI 1640 (Tabla 3.3), se sembraron en frascos de cultivo y se dejaron crecer en incubador en atmósfera controlada; 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humidificado.

#### 3.1.6. Procedimiento experimental general con células

En todos los tipos celulares, salvo en las PTEC por su incapacidad para sobrevivir en ausencia de suero, el medio de crecimiento fue sustituido por medio sin suero para provocar una parada del ciclo celular. En el caso de las PTEC se utilizó un medio carente de insulina-transferrina-selenio (ITS) e hidrocortisona (Tabla 3.2) pero al 1% de SFB inactivado.

En todos los experimentos con CE éstas se encontraban en confluencia para reproducir las condiciones del endotelio en situación fisiológica normal dentro de los organismos.

De modo general, tras 24 horas de incubación con el medio de depleción, los estímulos se añadieron directamente sobre el medio. En el caso de los ensayos con combinación de estímulos éstos se añadieron de forma simultánea (Tabla 3.4).

Para la exposición de las células a una situación de hipoxia se utilizó una cámara hipóxica en la que, tras añadir los estímulos celulares, el aire fue remplazado por una mezcla de gases 5% CO<sub>2</sub> y 95% N<sub>2</sub> durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo la cámara se selló y se introdujo en un incubador a 37 °C durante un tiempo de incubación de 4 horas.

#### 3.1.7. Plásmidos, silenciadores y método de transfección de CE

##### Método de transfección de CE

Para las transfecciones de CE se utilizó como agente transfectante el reactivo FuGene (Tabla 3.4) y se siguieron las instrucciones del fabricante usando una relación ADN - *FuGene* de 1:3.

El día anterior a la transfección se sembraron las CE a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> para asegurar una confluencia del 80% aproximadamente. En condiciones de esterilidad se mezclaron el medio de cultivo, sin ningún tipo de aditivo, con el FuGene y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Después se añadieron 10 µg del ADN plasmídico o del siRNA que queríamos incorporar en la célula, según el ensayo a realizar, y se dejó incubar la mezcla durante 45 minutos a TA. Trascurrido este tiempo se remplazó el medio de crecimiento de las CE por nuevo medio sin aditivos, se incorporó la mezcla de transfección y se incubó durante 6 horas en incubador en atmósfera controlada; 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humidificado, tiempo tras el cual se añadió suero adulto bovino o DCS (Donor Calf Serum) (Tabla 3.2) hasta una concentración del 20%. Al día siguiente se remplazó este medio y se añadió el medio habitual de crecimiento con antibióticos hasta

que las células alcanzaron la confluencia y pudo iniciarse el procedimiento experimental general.

Para comprobar que las transfecciones no alteraban ni la expresión proteica ni de la de ARNm se utilizaron células control sometidas al mismo procedimiento con agente transfectante pero sin el ADN ni el siARN.

### Plásmidos de expresión

Para evaluar el posible bloqueo de la proteína JAK2 en la inducción de HIF-1 $\alpha$  por AG490 se utilizaron plásmidos, donados por el Dr. Dwayne L Barber (Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá), que expresaban una forma “wild-type” de JAK2 o dos formas dominantes deficientes en el dominio quinasa de JAK2<sup>357,358</sup>.

Para asegurar y monitorizar una eficacia de las transfecciones superior al 50% se utilizó como control el plásmido pEGFP-N1 (Clontech) (Tabla 3.4). Este vector expresa la GFP (*Green Fluorescent Protein*) de forma constitutiva y permite visualizar las células transfectadas mediante microscopía de fluorescencia. Desde este momento se procedió con las células siguiendo el método de experimentación general.

### Silenciadores (siARN)

Para evaluar si la inducción del mensajero de VEGF se debía al incremento de la proteína HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 se silenciaron los mensajeros de HIF-1 $\alpha$  antes de la adición del estímulo. La utilidad de los silenciadores radica en que además de poseer la capacidad de bloquear la síntesis proteica por impedimento estérico facilita la posterior degradación del ARNm blanco. Para nuestros experimentos utilizamos un siARN sintético que correspondía a la posición 1254-1274 del gen para HIF-1 $\alpha$  bovino (Ambion) cuya secuencia había sido descrita y su eficacia comprobada en CMLV bovinas<sup>359</sup>.

Para asegurar que la disminución de mensajero era específica del silenciador para HIF-1 $\alpha$  se utilizó como control negativo una secuencia diferente de nucleótidos de ARN que no interfería con nuestros mensajeros de interés y que, al estar modificada con un fluorocromo, nos permitió visualizar las células transfectadas mediante microscopía de fluorescencia.

## 3.2. Estudios *in vivo*

Los estudios *in vivo* se realizaron en ratones macho adultos de la cepa C57Bl/6 de 9 a 12 semanas de vida y con 35-40 gr de peso (Harlan Interfauna). Todo el procedimiento se desarrolló conforme a las normativas reguladas por la Unión Europea y el Gobierno Español [RD 223/1988] y con la aceptación del Comité Ético de Investigación Científica institucional.

### 3.2.1. Isquemia/Reperfusión

Los ratones se dividieron en 3 grupos de 4 ratones cada uno. Mediante una inyección intraperitoneal se le administró: vehículo al grupo “DMSO I/R” y AG490 (1,5 mg/Kg) al grupo “AG490 I/R”. Media hora después los ratones se anestesiaron con cloroformo, se les realizó una incisión abdominal, se localizaron los riñones y sus pedículos vasculares fueron obliterados totalmente durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se eliminaron las pinzas y se suturaron por planos el peritoneo y la piel. A las 24 horas los animales fueron sacrificados y tras infundir los riñones con tampón Ringer Lactato (Tabla 1.1) desde el ventrículo izquierdo del corazón realizando una punción de escape en la vena cava inferior, se extrajeron sus riñones para su posterior análisis. El grupo “Basal” se les sometió a la misma operación que a los tratados pero no se les sometió a I/R.

### 3.3. Análisis de proteínas

#### 3.3.1. Extracción de proteínas

Después de los distintos tratamientos, las células, recogidas mediante raspado en 1 mL de PBS (Tabla 3.1) a 4 °C, y los tejidos se lisaron con diferentes tampones de extracción en función de las fracciones celulares que se querían obtener.

Para la extracción diferencial de proteínas citoplasmáticas y nucleares y su posterior estudio mediante técnicas de Western blot, se empleó el método descrito por Schreiber et al.<sup>360</sup>. Para ello, las células raspadas y recogidas en PBS se centrifugaron a 2000 rpm durante 3 minutos a 4 °C, los precipitados se resuspendieron en el tampón de extracción de proteínas citoplasmáticas (Tabla 3.5) y tras incubarlos durante 10 minutos, se les añadió Igepal a una concentración final del 0,5%, para garantizar la lisis total de las células. Se centrifugaron inmediatamente después a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y los sobrenadantes, que contenían las proteínas citoplasmáticas, se guardaron a -80 °C. Los pellets resultantes se resuspendieron en tampón de extracción de proteínas nucleares y se incubaron durante 45 minutos en hielo. Las proteínas nucleares se obtuvieron en el sobrenadante resultante de una nueva centrifugación a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se guardaron a -80 °C.

Para la extracción total de proteínas las células precipitadas tras la centrifugación a 2000 rpm durante 3 minutos a 4 °C se resuspendieron en el tampón de extracción total de proteínas (Tabla 3.5) y tras incubarlos durante 45 minutos en hielo se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y los sobrenadantes que contenían las proteínas totales se guardaron a -80 °C.

Tras la extracción, las proteínas se cuantificaron mediante el kit comercial *Coomassie Plus Protein Assay Reagent* (Pierce) según las recomendaciones del fabricante.

#### 3.3.2. Western blot

Los extractos proteicos se calentaron a 95 °C durante 5 minutos en condiciones reductoras con  $\beta$ -mercaptoetanol al 10%, se separaron en geles de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. El porcentaje de los geles se seleccionó en función del tamaño de las proteínas que querían estudiarse y las transferencias se realizaron en un sistema de transferencia semihúmedo a 1 mA/cm<sup>2</sup> durante 90 minutos. Las membranas se tiñeron con rojo ponceau para comprobar la eficacia de la transferencia y como control de carga de las proteínas. Tras un bloqueo de 60 minutos con TBT al 5% de leche descremada en polvo a TA se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario (Tabla 3.6) y al día siguiente, tras tres lavados de 10 minutos, se incubaron con el



anticuerpo secundario correspondiente durante 60 minutos y a TA (Tabla 3.6). Las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL). Para normalizar la cantidad de proteínas citoplasmáticas o totales cargadas en los geles se utilizó la proteína constitutiva  $\alpha$ -Tubulina y para normalizar la cantidad de proteína nuclear la Histona 1. La intensidad de las bandas se cuantificó mediante el programa informático ImageJ (NIH, Bethesda).

## 3.4. Análisis de la expresión génica

### 3.4.1. Extracción de ARN

Para extraer el ARN total de las células se empleó el kit comercial *Tripure Isolation Reagent* siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche).

### 3.4.2. PCR en tiempo real

Se retrotranscribieron en un termociclador convencional 1,5  $\mu$ g de ARN por muestra utilizando el kit comercial *High Capacity cDNA Rev. Transcriptase* (Applied Biosystem). Se amplificaron 2  $\mu$ l de cada muestra de ADNc por duplicado mediante el kit comercial *FastStart TaqMan* usando un *Real-Time PCR System* modelo 7500 (Applied Biosystem). Los datos se analizaron con el programa informático *7500 System SDS Software* v1.2b1c3 y se normalizaron con la expresión del gen constitutivo  $\beta$ -actina.

Los cebadores y sondas empleados se diseñaron a partir de las secuencias para los genes bovinos de  $\alpha$ -actina (GI: 75832053), VEGF (GI: 163006) y HIF-1 $\alpha$  (GI: 5019611) que aparecen registrados en el GenBank.

## 3.5. Medida de creatinina sérica

Como indicador de la función renal se utilizó la medida de la creatinina sérica. Para ello se tomaron muestras de sangre de la cola de los animales antes del sacrificio y se llevaron al laboratorio de análisis bioquímico (Unilabs).

## 3.6. Análisis histoquímico

### 3.6.1. Inmunofluorescencia y microscopía confocal en CE

Las CE se crecieron hasta confluencia sobre cubres de cristal tratados previamente durante una hora con poli L-lisina para favorecer la adherencia celular. Tras el procedimiento experimental general se añadieron los estímulos y se dejaron actuar durante 4 horas. Posteriormente se retiró el medio de experimentación, se lavaron con PBS (Phosphate Buffer Saline) a 4 °C y las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBS, se permeabilizaron las CE durante 15 minutos con TBS (Tris HCl Buffer Saline) al 0,5% de Tritón y tras 4 lavados con tampón de lavado (TBS al 0,25% de Tritón) se incubaron las células durante 30 minutos con tampón de bloqueo (MEM D-Val al 5% de Albúmina de Suero Bovino o BSA). Posteriormente, se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario para HIF-1 $\alpha$  en dilución 1/500 en tampón de bloqueo. Al día siguiente tras 4 lavados de 10 minutos en agitación con el tampón de lavado se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con FITC en dilución 1:100 en tampón de bloqueo durante 1 hora a TA. Para visualizar los núcleos, tras la incubación del anticuerpo secundario, las CE se incubaron con ioduro de propidio (0,05  $\mu$ g/mL) diluido en tampón de bloqueo durante 10 minutos en ausencia de luz. Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron con un microscopio modelo TCS SP20 (Leica).

### 3.6.2. Inmunohistoquímica y microscopía óptica en tejidos

Una vez extraídas, las muestras renales destinadas a la inmunohistoquímica se fijaron inmediatamente en formol al 10% y se mantuvieron en estas condiciones hasta el procedimiento habitual de inclusión en parafina. Para el estudio microscópico se realizaron cortes longitudinales de 0,5  $\mu$ m de grosor.

Para la microscopía de contraste, las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina de forma que la hematoxilina tiñera los núcleos de azul y la eosina los citoplasmas en rosa.

Para la tinción de los capilares peritubulares las secciones se desparafinaron y se hidrataron para posteriormente incubarse a 4 °C durante toda la noche con 12,5  $\mu$ g/mL de la lectina de *Bandeiraea simplicifolia* BS-1 asociada a peroxidasa (Sigma-Aldrich) disuelta en PBS al 0,1 mM de CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> y MnCl<sub>2</sub> y al 0,1% de Tritón X-100<sup>361</sup>. Esta lectina tiene mayor afinidad de unión por la superficie de las CE dañadas<sup>362</sup>. Las CE se detectaron mediante la actividad peroxidasa empleando HRP-3'3'diaminobenzidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB) (Sigma-Aldrich).

Para evaluar el estrés oxidativo y poder cuantificar el daño tisular por peroxidación lipídica las secciones se bloquearon con TBS al 10% de suero de conejo y al 1% de BSA

durante 2 horas, a TA y en ambiente humidificado. Posteriormente se incubaron a 4 °C durante la noche con el anticuerpo primario anti-Malondialdehído (MDA) en TBS al 0,025% de Tritón (Tabla 3.6). Al día siguiente, tras dos lavados de 5 minutos, las secciones se incubaron durante 10 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en TBS y se revelaron por exposición a DAB durante 5 minutos a TA. Para el contraste se utilizó hematoxilina al 10% durante 1 minuto.

Dos observadores independientes, desconocedores de la identidad de las muestras, se encargaron de la clasificación del daño de los capilares peritubulares y de la peroxidación lipídica, de acuerdo con la intensidad de la señal de la lectina y del MDA, en una escala (4 grados) de intensidad de color. Las CE se fotografiaron con una cámara digital Nikon Coolpix 995 acoplada a un microscopio.

### 3.7. Estadística

Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media. Excepto indicación específica, cada valor de los experimentos *in vitro* corresponde a un mínimo de 3 experimentos hechos por triplicado. Las comparaciones se hicieron mediante el test de ANOVA o la prueba de t de Student, emparejada o no emparejada. Se utilizaron los test de Fisher y Scheffé para comparaciones múltiples para determinar el nivel de significación p, que se consideró significativo a valores  $< 0,05$ . Las comparaciones entre cada condición de los experimentos y con el basal se hicieron con estos cálculos. Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 13.0 para Windows (SPSS Inc.).

### 3.8. Relación de productos y casa comerciales

Soluciones tamponadas	Composición
DPBS ( <i>Dulbecco's Phosphate Buffer Saline</i> )	8 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,5 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl y 5,6 mM glucosa. pH 7,4. Autoclavado
PBS ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )	8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,14 mM NaCl, 2,7 mM KCl. pH 7,6. Filtrado
TBS ( <i>Tris Buffer Saline</i> )	20 mM Tris-HCl y 137 mM NaCl. pH 7,6.
TBT ( <i>Tris Buffer Saline Tween</i> )	TBS al 0,05% Tween 20
Tampón Ringer Lactato	130 mM NaCl, 5mM KCl, 2,5 M CaCl <sub>2</sub> , 26 mM Lactato.

**Tabla 3.1. Soluciones tamponadas.** Siglas utilizadas a lo largo del este texto para las soluciones tamponadas, significado de las siglas y composición de las mismas.

Suplementos	Casa Comercial	Ref. Comercial
Aminoácidos no esenciales	Invitrogen	11140-035
Penicilina	Invitrogen	15140-122
Estreptomicina	Invitrogen	15140-122
Anfotericina B	Bristo-Myers Squibb	760645.1
Fluconazol	GES	600609.2
Vancomicina	Laboratorios Normon	618694.7
Colagenasa tipo II	Sigma-Aldrich	C-6885
SFB	Invitrogen	10270098
Tripsina-EDTA	Invitrogen	25300-062
Insulina-transferrina-selenio (ITS)	Invitrogen	41400-045
Hidrocortisona	Sigma-Aldrich	H-0888
Donor Calf Serum (DCS)	Invitrogen	10371029
Bicarbonato sódico	Sigma-Aldrich	C-6885
Glutamax	Invitrogen	35050038
L-Glutamina	Sigma-Aldrich	G-2150
Hepes	Sigma-Aldrich	H-7523

**Tabla 3.2. Suplementos de los medios de cultivo.** Relación de los suplementos añadidos a los medios de cultivo para el crecimiento de las células y reactivos utilizados para el mantenimiento de la línea celular. Casa y referencia comercial.

Células	Medio	Suplementos	[ ] <sub>f</sub>	Casa Comercial	Ref
CE	RPMI 1640	Penicilina	100 U/ mL	Lonza Biowhitaker	BE12.167F
		Estreptomicina	100 µg/mL		
		Glutamax	1x		
		SFB	10%		
	MEM D-Val	Penicilina	100 U/mL	Invitrogen	04195236M
		Estreptomicina	100 µg/mL		
		Glutamax	1x		
		DCS	20%		
		Aminoácidos no esenciales	1x		
CMLV	DMEM	Penicilina	100 U/ mL	Lonza Biowhitaker	BE12-707F
		Estreptomicina	100 µg/mL		
		Glutamax	1x		
		SFB	10%		
PTEC	HAM'S F12/DMEM	Penicilina	100 U/ mL	Lonza Biowhitaker	BE12- 615F/ BE12-707F
		Estreptomicina	100 µg/mL		
		L-Glutamina	2,5 mM		
		Bicarbonato Sódico	20 mM		
		Hepes	12,5 mM		
		Aminoácidos no esenciales	1x		
		Hidrocortisona	5x10 <sup>-8</sup> M		
		ITS	0,01x		
SFB inactivado	10%				
MCT	RPMI 1640	Penicilina	100 U/ mL	Lonza Biowhitaker	BE12.167F
		Estreptomicina	100 µg/mL		
		Glutamax	1x		
		SFB inactivado	10%		
RCC4	RPMI 1640	Penicilina	100 U/ mL	Lonza Biowhitaker	BE12.167F
		Estreptomicina	100 µg/mL		
		Glutamax	1x		
		SFB inactivado	10%		

**Tabla 3.3. Medios de cultivo.** Relación de los medios de cultivo utilizados con cada tipo celular, los suplementos necesarios para su crecimiento y su concentración final. Casas comerciales y referencia comercial de los medios de cultivo.

Reactivos	Casa Comercial	Ref.
FuGENE HD Transfection Reagent	Roche	04 709 705 001
Plásmido pEGFP-N1	Clontech	#6085-1
$\beta$ -mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	M-7154
Archilamida-Bisacrilamida (29:1)	Serva	10680
Dodecil Sulfato Sódico (SDS)	Serva	20760-02
Membranas de Nitrocelulosa (0.45 mm)	Bio-Rad	162.0094
Ponceau	Sigma-Aldrich	P-7170
Lecha descremada	Nestlé	
Kit de quimioluminiscencia (ECL Western blotting)	Amersham	RPN 2106
Tripure Isolation Reagent	Roche	1667165
High Capacity cDNA Rev	Applied Biosystems	4374966G
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Pierce	23236
Tritón X-100	Sigma-Aldrich	9002-93-1
BSA	Sigma-Aldrich	A-7906
Poli L-lisina	Sigma-Aldrich	P-8920
Tripsina EDTA	Invitrogen	25300-062
Tween 20	Sigma-Aldrich	P-5927

**Tabla 3.4. Reactivos empleados.** Relación de reactivos utilizados, casa y referencia comercial.

Estímulos	Casa Comercial	Ref.
AG490	Calbiochem	658401-5
AG82	Calbiochem	658400-5
AG9	Calbiochem	658390-5
Cloruro de cobalto (II)	Sigma-Aldrich	60818
Cicloheximida	Sigma-Aldrich	D-4859
Dibutiril cGMP	Sigma-Aldrich	D-3510
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	D-2650
Erbstatina	Sigma-Aldrich	D2667
Genisteína	Sigma-Aldrich	G-6649
Ly83583	Biomol	CN-200
MG132	Sigma-Aldrich	C-2211
Tweak	Alexis	ALX-522-138
8pCPT-cGMP	Sigma-Aldrich	C-5438

**Tabla 3.5. Estímulos empleados durante la experimentación.** Relación de los reactivos utilizados como estímulos, casas comerciales y referencias comerciales.

Tampón	Composición	Ref.
T Extracción Total de Proteínas	50 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0,5% Deoxycholate, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 10 µg/ml Leupeptina, 5 µg/ml Aprotinina, 1 mM PMSF	363
T extracción de proteínas citoplasmáticas	10 mM Hepes pH 7,6, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,5 % Igepal, 0,5 mM PMSF, 3 mM DTT, 2,5 µg/ml Aprotinina, 2,5 µg/ml Pepstatina A, 2,5 µg/ml Leupeptina.	360
T extracción de proteínas nucleares	20 mM Hepes pH 7,6, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5 mM PMSF, 3 mM DTT, 2,5 µg/ml Aprotinina, 2,5 µg/ml Pepstatina A, 2,5 µg/ml Leupeptina.	360

**Tabla 3.6. Tampones empleados para la extracción de proteínas.** Composición y bibliografía de referencia



Proteína Diana		Anticuerpo primario		Anticuerpo secundario		
Nombre	KDa	Dilución	Casa comercial	Especificidad	Dilución	Casa comercial
$\alpha$ -tubulina	50	1/2000 (1)	Sigma-Aldrich	Ratón	1/6000 (1)	Bio-Rad
HIF-1 $\alpha$	120	1/1000 (1)	Transduction Laboratories-BD	Ratón	1/6000 (1)	Bio-Rad
HIF-1 $\alpha$ -OH	120	1/1000 (1)	Rockland	Conejo	1/6000 (1)	Cell Signaling
HIF-1 $\beta$	120	1/000 (1)	Transduction Laboratories-BD	Ratón	1/6000 (1)	Bio-Rad
Histona-H1	30	1/500	Santa Cruz	Conejo	1/6000 (1)	Cell Signaling
JAK2	130	1/1000 (2)	Cell Signaling	Conejo	1/6000 (2)	Cell Signaling
JAK2-P	130	1/1000 (2)	Biosource	Conejo	1/6000 (2)	Cell Signaling
Malondialdehído (MDA)	NA	1/500	ABCAM	Conejo	1/200	Cell Signaling
Mono/Poli-ubiquitina	NA	1/1000 (1)	Biomol	Ratón	1/6000 (1)	Bio-Rad
p100 I $\kappa$ B	100	1/250	Santa Cruz	Ratón	1/6000 (1)	Bio-Rad

**Tabla 3.7: Listado de anticuerpos empleados.** Proteína diana contra el que está dirigido el anticuerpo primario y peso molecular de la misma y condiciones de incubación y casa comercial tanto del anticuerpo primario como del secundario. (1) en TBT al 5% de leche. (2) en TBT al 5% de BSA.

## ***RESULTADOS***



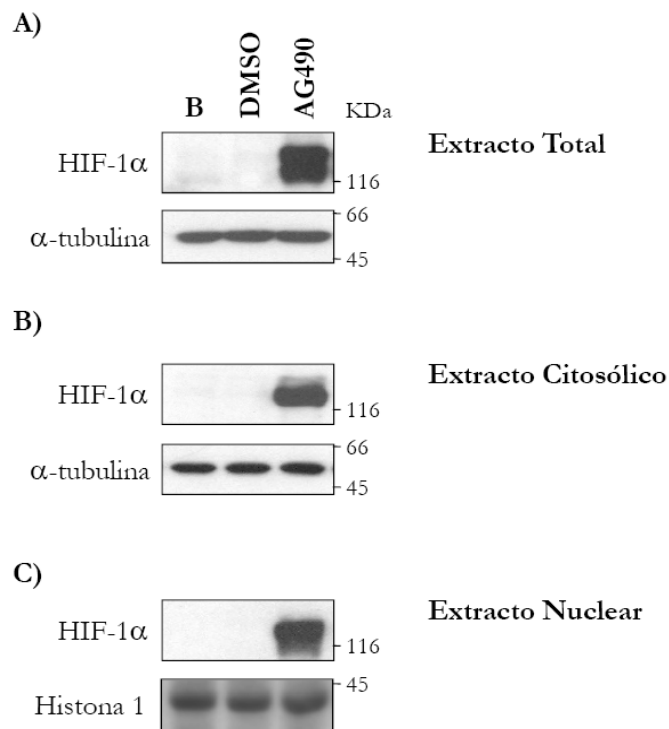
## 4.1. Efecto del AG490 en los niveles de las proteínas HIF-1 $\alpha$ y HIF-1 $\beta$

### 4.1.1. El AG490 incrementa los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$

El tratamiento de CE durante 4 horas con la tirfostina AG490 (50  $\mu$ M), incrementó significativamente los niveles de la subunidad  $\alpha$  de HIF-1 en los extractos proteicos analizados por Western blot (Figura 4.1).

Dado que la función de HIF-1 es ejercer como factor de transcripción, quisimos analizar si el incremento de la subunidad  $\alpha$  en presencia de AG490 conllevaba su translocación al núcleo como lo haría en situación de hipoxia. Para ello se realizó una extracción diferencial de proteínas y se cargaron los extractos nucleares y citoplasmáticos en Western blots independientes. Pudimos comprobar que efectivamente el incremento de la proteína HIF-1 $\alpha$  era observable también en el extracto nuclear (Figura 4.1.C) aunque seguía conservando parte de su localización citoplasmática (Figura 4.1.B).

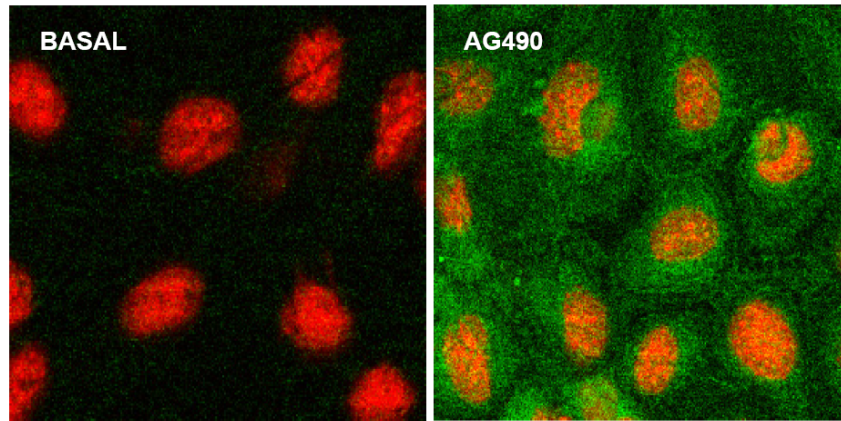
La ausencia de incremento en presencia de DMSO en los extractos proteicos analizados (Figura 4.1) nos permitió descartar la implicación del vehículo del AG490 en el aumento observado y centrar la atención en el efecto de la tirfostina sobre la expresión de la subunidad HIF-1 $\alpha$ .



**Figura 4.1. AG490 aumenta los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  en núcleo y citoplasma.** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en CE estimuladas durante 4 horas con AG490 (50  $\mu$ M) y su vehículo DMSO. A) Extracto proteico total (60  $\mu$ g), B) extracto proteico citoplasmático (30  $\mu$ g) y C) extracto proteico nuclear (30  $\mu$ g). La  $\alpha$ -tubulina y la Histona 1 se usaron como control de carga.

#### 4. Resultados

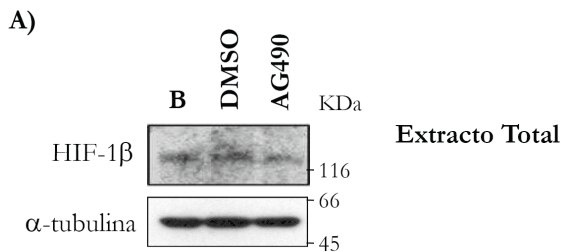
La localización nuclear de HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 se confirmó mediante microscopía confocal con técnicas de inmunofluorescencia en CE tratadas con AG490 (50  $\mu$ M) durante 4 horas. Su presencia en el núcleo corroboró la capacidad de translocarse al núcleo en presencia de la tirfostina.



**Figura 4.2.** AG490 aumenta los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  en el citoplasma y en el núcleo. Microfotografías confocales (400X) de CE estimuladas con AG490 (50  $\mu$ M) durante 4 horas. El basal corresponde a células sin tratar. La subunidad HIF-1 $\alpha$  (verde), ausente en estado basal, se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo en presencia de AG490. La tinción con Ioduro de propidio permite la visualización de los núcleos (rojo).

#### 4.1.2. El AG490 no modifica los niveles de la proteína HIF-1 $\beta$

A pesar de la estabilidad de los niveles de la subunidad  $\beta$  de HIF-1 ante situaciones de hipoxia quisimos comprobar si el AG490 también podía modificar su expresión proteica. Los resultados en CE demostraron la ausencia de efecto del AG490, en los niveles de expresión de la proteína HIF-1 $\beta$  (Figura 4.3).



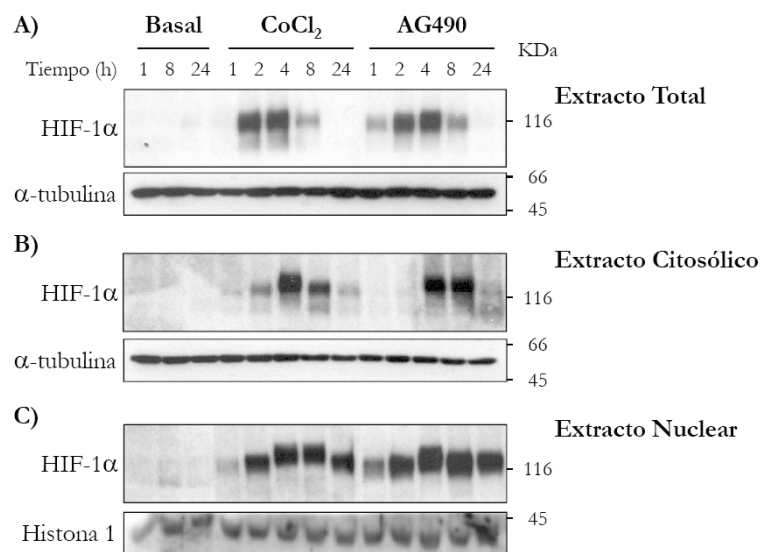
**Figura 4.3.** El AG490 no modifica los niveles de la proteína HIF-1 $\beta$ . Western blot de HIF-1 $\beta$  en CE estimuladas durante 6 horas con AG490 (50  $\mu$ M) y su vehículo DMSO. Western blot realizado con 60  $\mu$ g de extracto proteico total. La  $\alpha$ -tubulina se usó como control de carga.

### 4.1.3. El incremento en los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$ es dependiente del tiempo

Para evaluar la dependencia del tiempo en el incremento de la expresión de la subunidad  $\alpha$  de HIF-1, se obtuvieron extractos proteicos de CE incubadas con AG490 (50  $\mu$ M) durante distintos tiempos y se analizaron mediante Western blot. Como control positivo se usó el  $\text{CoCl}_2$  por su capacidad para simular una situación de hipoxia e inhibir la degradación de la subunidad HIF-1 $\alpha$ <sup>162</sup>.

Los resultados mostraron la dependencia temporal del incremento en la subunidad  $\alpha$  de HIF-1 inducido por AG490, de forma similar al obtenido con el  $\text{CoCl}_2$ . Este incremento era consistente desde las primeras horas de estímulo, observándose niveles máximos a las 4 y 8 horas (Figura 4.4). El mayor aumento observado en los extractos nucleares durante la primera hora, en comparación con el obtenido al mismo tiempo en los extractos citoplasmáticos, ponen de manifiesto la rapidez con la que la subunidad HIF-1 $\alpha$  se transloca al núcleo en presencia de AG490 o de  $\text{CoCl}_2$  (Figura 4.4.B y C).

Como era de esperar, y puesto que la degradación de HIF-1 $\alpha$  en normoxia tiene lugar en el citoplasma, la disminución del incremento a las 24 horas era más relevante en los extractos citoplasmáticos que en los nucleares (Figura 4.4.B y C).

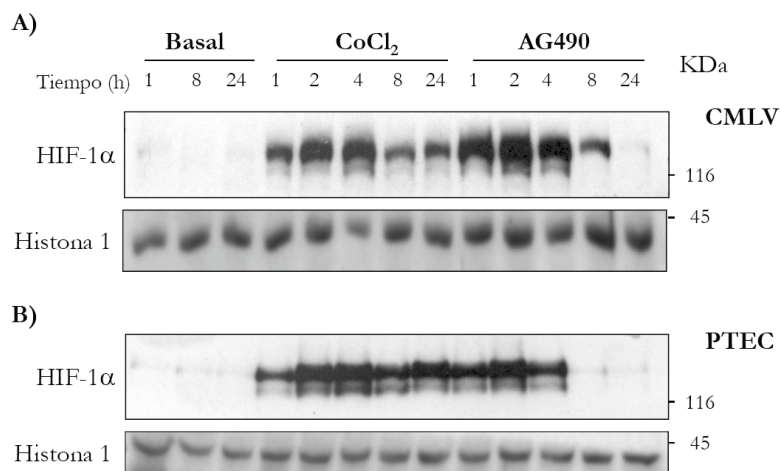


**Figura 4.4. El AG490 aumenta los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  en CE de forma dependiente del tiempo.** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en CE estimuladas con AG490 (50  $\mu$ M) o  $\text{CoCl}_2$  (100  $\mu$ M) a diferentes tiempos (horas). El basal corresponde a células sin tratar. A) Extracto proteico total (60  $\mu$ g), B) extracto proteico citoplasmático (30  $\mu$ g) y C) extracto proteico nuclear (30  $\mu$ g). La  $\alpha$ -tubulina y la Histona 1 se usaron como controles de carga.

La capacidad del AG490 para incrementar los niveles de la subunidad HIF-1 $\alpha$  en CE nos planteó la posible reproducibilidad de este efecto en otros tipos celulares. El

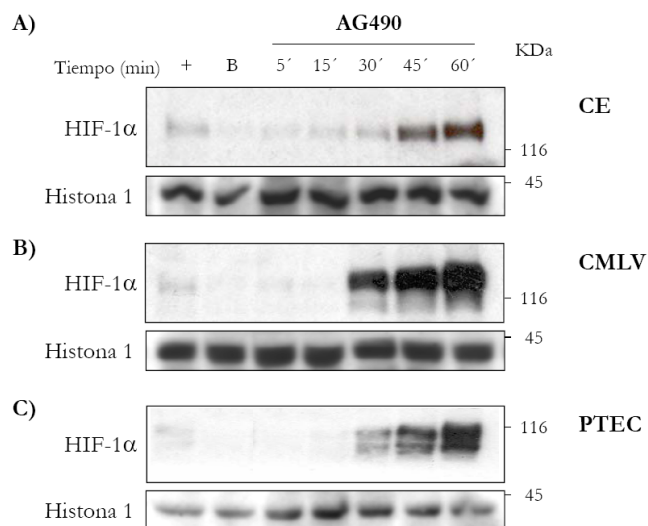
#### 4. Resultados

incremento en los niveles nucleares de la proteína HIF-1 $\alpha$  se produce, también de forma dependiente del tiempo, en CMLV (Figura 4.5.A) y PTEC (Figura 4.5.B).



**Figura 4.5. El AG490 aumenta los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  en CMLV y PTEC de forma dependiente del tiempo.** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en A) CMLV y B) PTEC, estimuladas con AG490 (50  $\mu$ M) o CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) a diferentes tiempos (horas). El basal corresponde a células sin tratar. Western blot realizados con 30  $\mu$ g de extracto proteico nuclear. La Histona 1 se usó como control de carga.

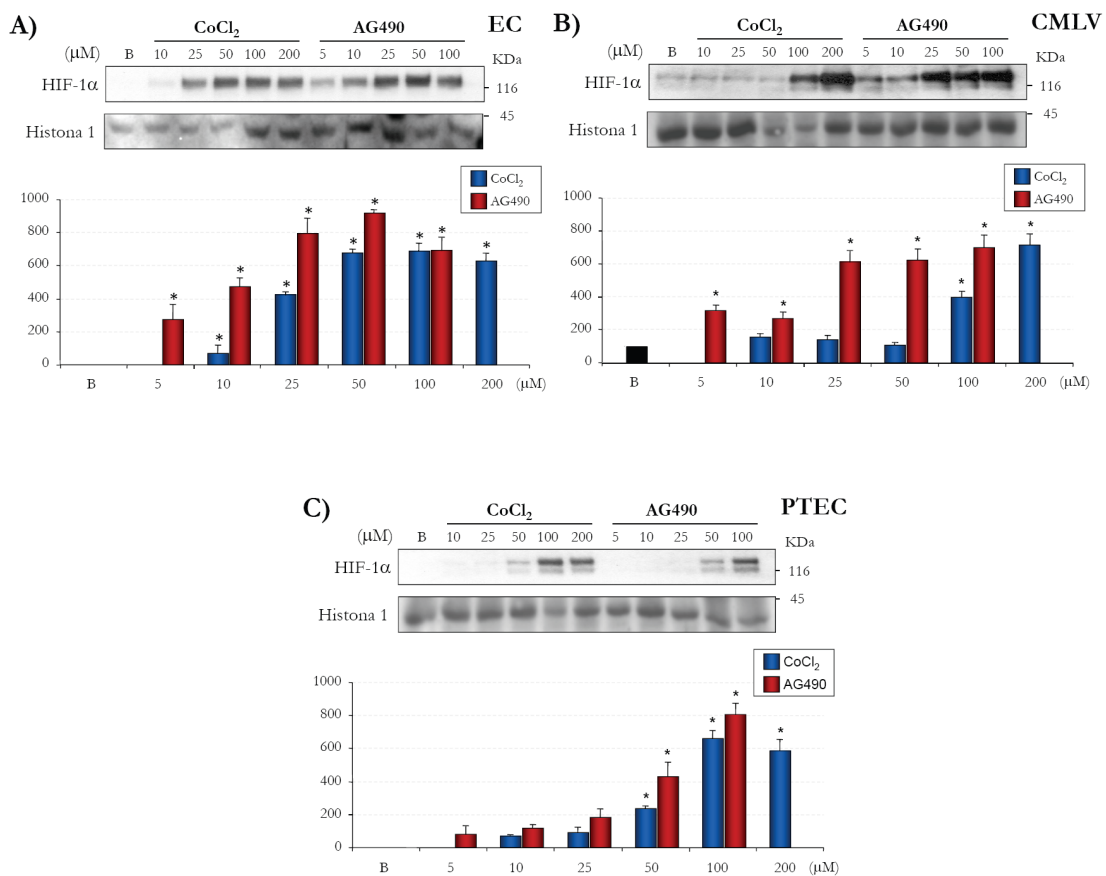
La rapidez con la que responden las células al AG490 nos hizo evaluar tiempos más cortos de estimulación y los resultados demostraron un incremento del HIF-1 $\alpha$  nuclear a tiempos menores de 45 minutos en los tres tipos celulares estudiados (Figura 4.6).



**Figura 4.6. El AG490 incrementa precozmente los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$ .** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en A) CE, B) CMLV y C) PTEC estimuladas con AG490 (50  $\mu$ M) a diferentes tiempos (minutos). El primer carril (+) corresponde al control de células tratadas durante 30 minutos con CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) y el basal B a células sin estimular. Western blot realizados con 30  $\mu$ g de extracto proteico nuclear. La Histona 1 se usó como control de carga.

#### 4.1.4. El incremento en los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$ es dependiente de la concentración de AG490

Para evaluar el efecto de la concentración de AG490 sobre el incremento de los niveles de HIF-1 $\alpha$  se estimularon CE, CMLV y PTEC con diferentes concentraciones de AG490 y de CoCl<sub>2</sub>. Para impedir la posible saturación durante el revelado de las concentraciones más elevadas el estímulo se mantuvo tan sólo durante dos horas. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la dependencia del incremento de HIF-1 $\alpha$  de la concentración del AG490 en los tres tipos celulares estudiados (Figura 4.7).



**Figura 4.7. El AG490 incrementa los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  en CE, CMLV y PTEC de forma dependiente de la concentración.** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en A) CE, B) CMLV y C) PTEC estimuladas durante 2 horas con CoCl<sub>2</sub> y AG490 a diferentes concentraciones (μM). El basal corresponde a células sin tratar. Western blot realizados con 30 μg de extracto proteico nuclear. \*  $p > 0,05$ . La Histona 1 se usó como control de carga. En las gráficas se muestra la cuantificación de las bandas en unidades arbitrarias relativizadas con respecto al basal.

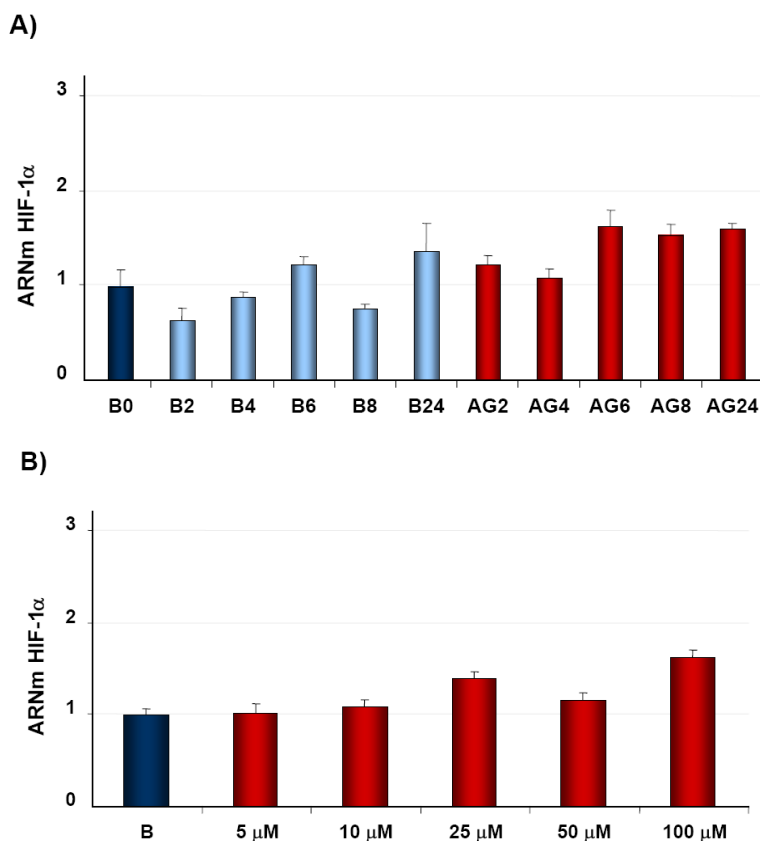


## 4.2. Mecanismos de acción del AG490 sobre los niveles de HIF-1 $\alpha$

Una vez demostrada la capacidad del AG490 para aumentar los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  en diferentes tipos celulares el siguiente objetivo fue examinar los mecanismos implicados en dicho incremento. Para ello nos centramos exclusivamente en las CE por ser el tipo celular frente al que estaban puestas a punto la mayor parte de las técnicas en nuestro laboratorio.

### 4.2.1. El AG490 no modifica la expresión del ARN mensajero de HIF-1 $\alpha$

La primera hipótesis fue suponer que el AG490 incrementaba la cantidad de proteína HIF-1 $\alpha$  sintetizada por la célula al aumentar los niveles de ARNm. Para evaluar esta posibilidad se incubaron CE con una concentración fija de AG490 (50  $\mu$ M) durante distintos tiempos (2, 4, 6, 8 y 24 horas) (Figura 4.8.A) o con diferentes concentraciones de AG490 durante 6 horas (Figura 4.8.B), y se analizó en ambos casos la expresión del ARNm de HIF-1 $\alpha$  mediante PCR en tiempo real. Como controles se utilizaron extractos de ARN obtenidos a los mismos tiempos de CE sin estimular. Los resultados obtenidos (Figura 4.8) mostraron que el AG490 no modifica la expresión del ARNm de HIF-1 $\alpha$ .



**Figura 4.8.** El AG490 no modifica la expresión del ARN mensajero de HIF-1 $\alpha$  medido mediante PCR en tiempo real. A) CE estimuladas con AG490 (50  $\mu$ M) durante diferentes tiempos (horas). Valores normalizados con respecto al basal extraído a tiempo 0. B) CE estimuladas durante 6 horas con diferentes concentraciones de AG490. Valores normalizados con respecto al basal.

#### 4.2.2. El AG490 impide la degradación de la proteína HIF-1 $\alpha$

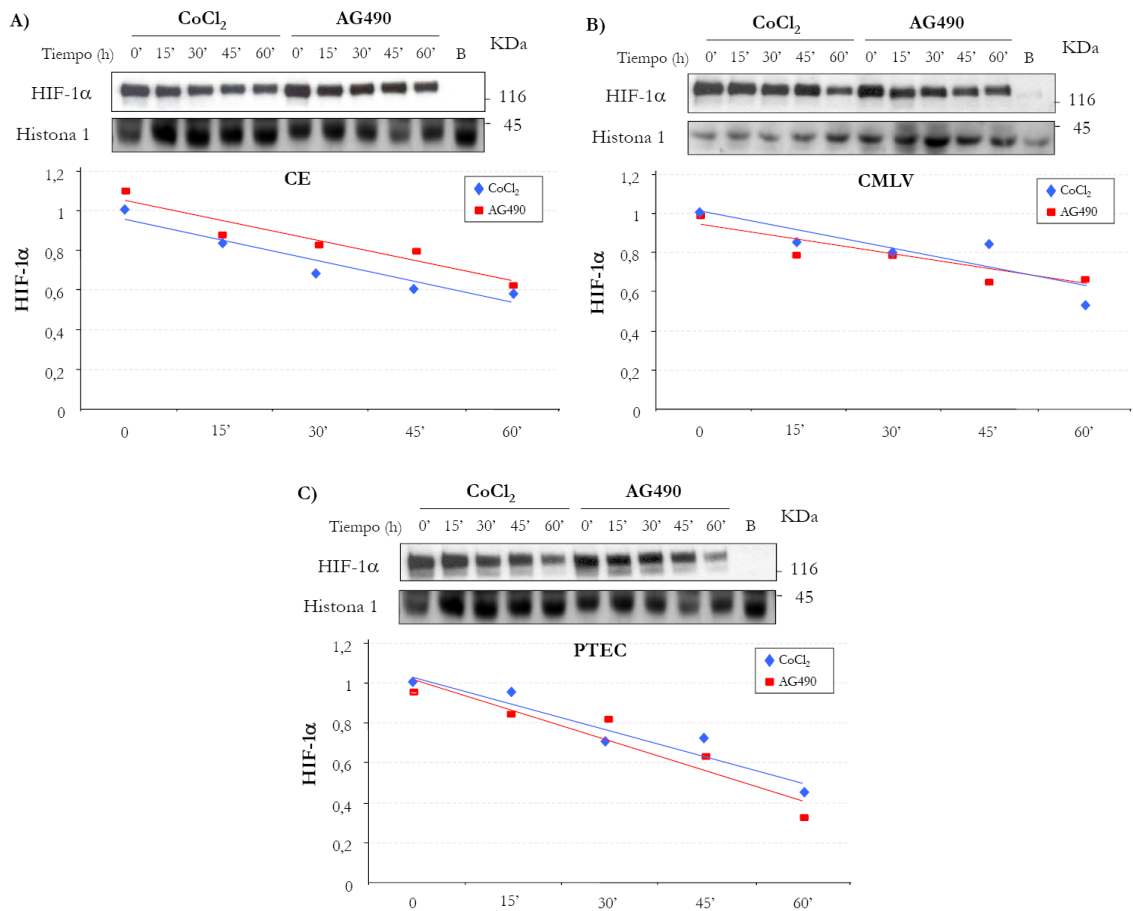
Ya que el incremento de la proteína HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 no se debía a un aumento en la expresión de su mensajero sólo nos quedaban dos opciones capaces de explicar dicho incremento, que el AG490 aumentara la tasa de traducción de su ARNm y/o que impidiera que la proteína ya sintetizada se degradara instantáneamente como ocurre en condiciones de normoxia.

Para comprobar cuál de estas opciones era la correcta se diseñó el siguiente experimento. Se estimularon diferentes tipos celulares durante 2 horas con AG490. Este tiempo de incubación, como vimos en experimentos previos (Figura 4.7), era suficiente para que se observara un incremento significativo en los niveles de HIF-1 $\alpha$ .

A continuación se añadió cicloheximida (10  $\mu$ g/mL)<sup>364</sup> al medio de cultivo. Este reactivo inhibe la función del factor de elongación 2 (EF2) y por tanto impide la traducción de los mensajeros y la síntesis de proteínas, incluida la subunidad  $\alpha$  de HIF-1. Tras la incorporación de la cicloheximida se obtuvieron extractos proteicos cada 15 minutos hasta un máximo de 60 minutos. Los resultados obtenidos se compararon con los de un estímulo conocido que impide la degradación de HIF-1 $\alpha$ , el CoCl<sub>2</sub>.

Como puede verse en la Figura 4.9, el incremento de HIF-1 $\alpha$  inducido por AG490, al igual que el inducido por CoCl<sub>2</sub>, se mantuvo tras la inhibición de la síntesis proteica con cicloheximida, concluyéndose que al menos se había producido un aumento en la estabilidad de las subunidades de HIF-1 $\alpha$  sintetizadas con anterioridad.

Por otro lado la permanencia en el tiempo de las subunidades sintetizadas y la similitud de los resultados con los obtenidos en presencia del CoCl<sub>2</sub> confirmaron que la tirfostina AG490 actuaba bloqueando la degradación de HIF-1 $\alpha$  permitiendo que ésta se acumulara y se translocara al núcleo como haría en situaciones de hipoxia.

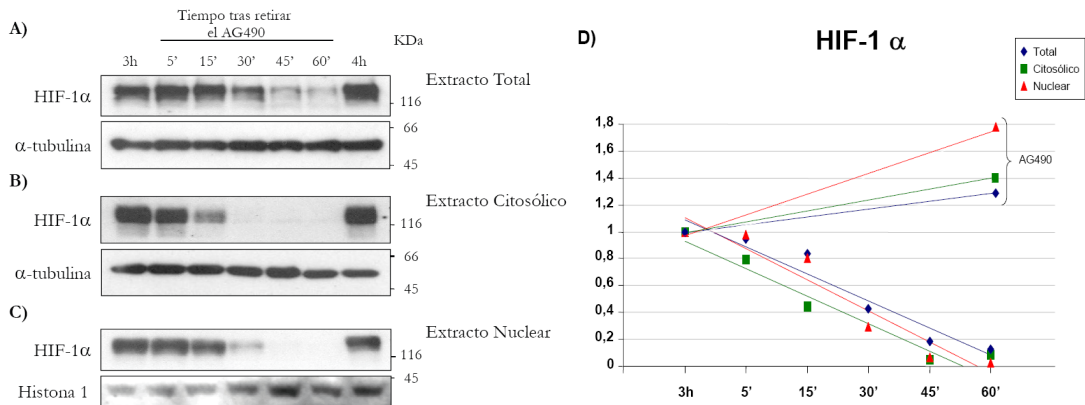


**Figura 4.9. El bloqueo de la síntesis proteica con cicloheximida no impide el incremento de HIF-1 $\alpha$  inducido por el AG490.** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en extractos nucleares (30  $\mu$ g) A) CE (25  $\mu$ M de AG490 y 100  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub>). B) CMLV (25 $\mu$ M de AG490 y 100  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub>). C) PTEC (100  $\mu$ M de AG490 y 100  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub>). Todas las células fueron estimuladas durante 2 horas con CoCl<sub>2</sub> y AG490 antes de la adición de cicloheximida. Desde este momento se fueron extrayendo los puntos a diferentes tiempos (0-60 minutos). Como control negativo se utilizaron células sin estimular extraídas a las 3 horas (B). La Histona 1 se usó como control de carga. Las gráficas representan la tendencia lineal de 3 experimentos independientes para cada tipo celular.

### 4.2.3. Degradación de la proteína HIF-1 $\alpha$ tras la eliminación del AG490

Una vez demostrada la capacidad del AG490 para inhibir la degradación de HIF-1 $\alpha$ , nuestro siguiente objetivo fue valorar la reversibilidad de esta inhibición. Para ello se estimularon CE con AG490 (50  $\mu$ M) durante 3 horas y a continuación se reemplazó el medio de incubación por medio nuevo sin la tirfostina. Los niveles de HIF-1 $\alpha$  se analizaron mediante Western blot de extractos proteicos obtenidos a distintos tiempos tras la eliminación del estímulo. Como controles positivos se usaron CE estimuladas durante 3 y 4 horas con AG490.

La eliminación del AG490 del medio de incubación se asoció a una disminución dependiente del tiempo de los niveles de HIF-1 $\alpha$  hasta el nivel basal, en los que apenas es posible detectar la proteína mediante técnicas de Western blot (Figura 4.10). Por tanto el efecto producido por AG490 sobre HIF-1 $\alpha$  es reversible.



**Figura 4.10. Degradación de HIF-1 $\alpha$  tras la eliminación de AG490.** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en CE recogidas a distintos tiempos (5, 15, 30, 45 y 60 minutos) tras eliminar el AG490 (50  $\mu$ M) con el que habían sido previamente estimuladas durante 3 horas. A) Extracto proteico total (60  $\mu$ g), B) extracto proteico citoplasmático (30  $\mu$ g) y C) extracto proteico nuclear (30  $\mu$ g). Como control positivo se utilizaron CE estimuladas durante 3 y 4 horas con AG490. La  $\alpha$ -tubulina se usó como control de carga. D) Representación gráfica de la bandas cuantificadas en unidades arbitrarias, relativizadas con respecto a las células estimuladas con AG490 durante 3 horas y normalizadas con la  $\alpha$ -tubulina o la Histona 1.

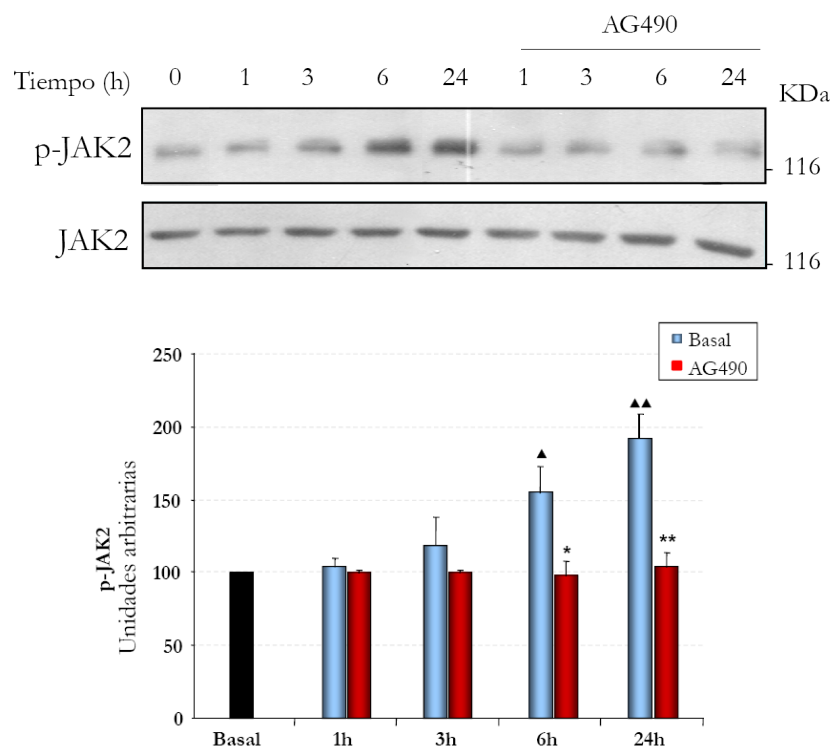
### 4.3. Mecanismo de acción del AG490 como inhibidor de la degradación de HIF-1 $\alpha$

A continuación exploramos las distintas vías por las que el AG490 podría inhibir la degradación de HIF-1 $\alpha$ .

#### 4.3.1. El efecto del AG490 sobre el incremento de la proteína HIF-1 $\alpha$ no está mediado por la inhibición de la ruta JAK2/STAT

Ya que el AG490 es el inhibidor más empleado para bloquear la ruta JAK2/STAT, nuestro siguiente objetivo fue averiguar si el bloqueo de esta ruta era responsable de los incrementos de HIF-1 $\alpha$ .

En primer lugar se comprobó la inhibición de esta ruta en nuestro tipo celular. Para ello en células endoteliales previamente depletadas, tal y como se describe en materiales y métodos, se sustituyó el medio de depleción por medio fresco. Este cambio sería capaz de generar los estímulos necesarios para la fosforilación de JAK2. Posteriormente las células se incubaron tanto en presencia como en ausencia de AG490 (50  $\mu$ M) durante distintos tiempos.



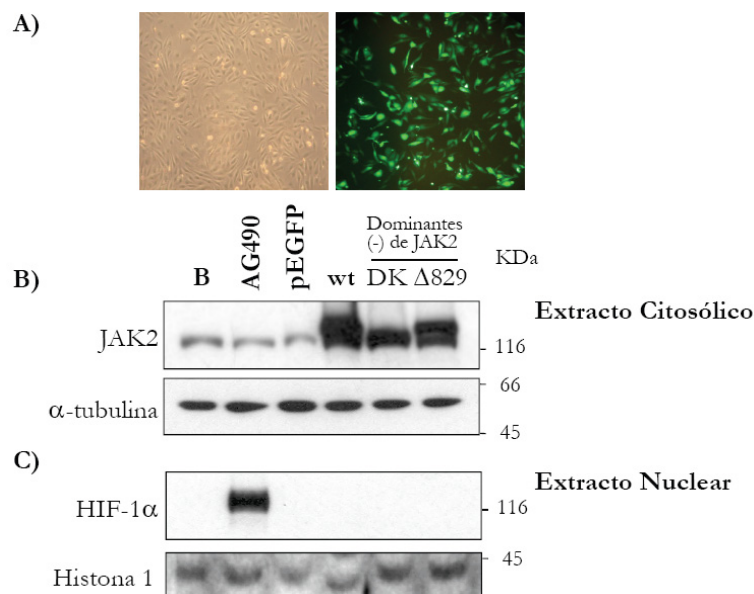
**Figura 4.11. Efectos del AG490 sobre la fosforilación de JAK2.** Western blot de JAK2 fosforilado en CE tratadas con medio fresco y recogidas a distintos tiempos (0, 1, 3, 6 y 24 horas) tanto en presencia como en ausencia de AG490 (50  $\mu$ M). Western blot realizados con 60  $\mu$ g de extracto proteico total. La proteína JAK2 se utilizó como control de carga. <sup>▲</sup>  $p < 0,05$  y <sup>▲▲</sup>  $p < 0,01$  con respecto al Basal y <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  y <sup>\*\*</sup>  $p < 0,01$  con respecto a su basal correspondiente en tiempo.

Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de AG490 de inhibir la fosforilación de la proteína JAK2 frente a un cambio de medio de cultivo en nuestras células (Figura 4.11).

Para comprobar la posibilidad de que esta inhibición de la fosforilación de JAK2 fuera responsable del incremento de HIF-1 $\alpha$  bloqueamos esta ruta transfectando CE con plásmidos que expresaban formas deficientes en el dominio quinasa de JAK2, DK y  $\Delta$ 829. Estas formas tienen un efecto dominante negativo sobre la activación de JAK2.

La transfección con el plásmido pEGFP permitió usar la expresión de la proteína fluorescente verde o GFP (*Green Fluorescent Protein*) para visualizar las células transfectadas y comprobar la eficacia de la transfección en un microscopio invertido de fluorescencia (Figura 4.12.A).

La expresión de las formas dominantes negativas de JAK2 y de una forma JAK2 nativa o wt (*wild-type*), que actuaba como control de la transfección en los extractos citoplasmáticos, mostró mediante Western blot la eficiente expresión de los plásmidos (Figura 4.12.B). Los resultados demostraron que el bloqueo de la ruta JAK2/STAT con los dominantes negativos de JAK2, no produjo incremento alguno en los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  (Figura 4.12.C) descartando así la participación de dicha ruta en el efecto del AG490 sobre HIF-1 $\alpha$ .



**Figura 4.12. El efecto de AG490 sobre HIF-1 $\alpha$  no está mediado por la inhibición de JAK2.**

A) Microfotografía de la fluorescencia emitida por la proteína GFP demostrando la eficacia de la transfección. B y C) Western blot de CE transfectadas con los dominantes negativos de JAK2 (DK y  $\Delta$ 829) B) JAK2 en extracto proteico citoplasmático (30  $\mu$ g) y C) HIF-1 $\alpha$  en extracto proteico nuclear (30  $\mu$ g) Como controles positivos de la transfección se utilizaron los plásmidos pEGFP y JAK2 wt. La  $\alpha$ -tubulina y la Histona 1 se usaron como controles de carga.

### 4.3.2. El efecto del AG490 sobre el incremento de la proteína HIF-1 $\alpha$ no está mediado por el receptor del EGF

Ya que la inhibición específica, por parte del AG490, de la proteína JAK2 no está relacionada con el incremento de HIF-1 $\alpha$  nos dispusimos a evaluar otro efecto que, aunque más general para las tirfostinas, también había sido descrito para el AG490 y que consistía en la inhibición de la actividad tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) ( $IC_{50} = 100 \text{ nM}$  <sup>210</sup>).

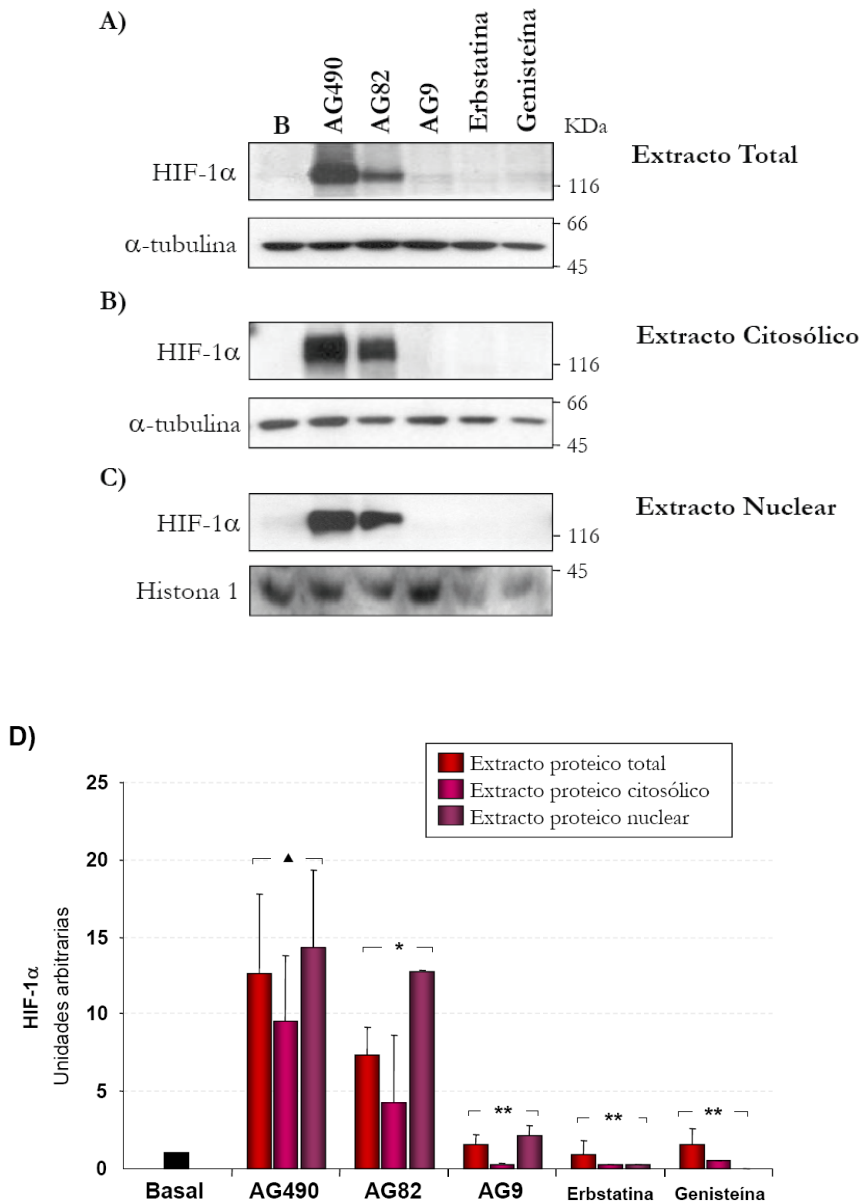
Para ello comparamos el efecto del AG490 (50  $\mu\text{M}$ ) sobre HIF-1 $\alpha$  con el de otras moléculas cuya capacidad inhibitoria del EGFR está bien caracterizada: la erbstatina <sup>208;365</sup> (10  $\mu\text{M}$ ) y la genisteína <sup>366;367</sup> (200  $\mu\text{M}$ ). Las concentraciones elegidas de erbstatina y genisteína son las descritas para ejercer su potencial como inhibidores de la fosforilación del EGFR en células endoteliales.

Con el fin de incorporar un inhibidor de EGFR, de naturaleza más similar al AG490, seleccionamos otra tirfostina con capacidad para inhibir este receptor, el AG82 <sup>211</sup>. La concentración empleada fue la misma que la del AG490 a pesar de estar también por encima de su concentración media de inhibición para EGFR ( $IC_{50} = 3 \mu\text{M}$ ) <sup>257</sup>.

Como control negativo de la inhibición del EGFR por tirfostinas se utilizó la tirfostina AG9 (50  $\mu\text{M}$ ). La capacidad de AG9 para inhibir este receptor se considera nula frente al resto de moléculas de su familia por ejercer inhibición sobre EGFR a concentraciones superiores a 1250  $\mu\text{M}$  <sup>209</sup>.

La ausencia de efecto de la genisteína y la erbstatina sobre los niveles de HIF-1 $\alpha$  (Figura 4.13) mostró que la inhibición de la actividad tirosina quinasa de EGFR no guardaba relación con el efecto del AG490 sobre el factor de hipoxia HIF-1 $\alpha$ .

Sin embargo el AG82 consiguió incrementar los niveles de HIF-1 $\alpha$  en valores próximos, aunque inferiores, al AG490. Este resultado sugirió que el mecanismo por el que AG490 y AG82 incrementan la expresión de HIF-1 $\alpha$  podría ser común.



**Figura 4.13. Ausencia de efecto de otros inhibidores de tirosina quinasas sobre el incremento de HIF-1 $\alpha$ .** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en CE estimuladas durante 4 horas con AG490 (50  $\mu$ M), AG82 (50  $\mu$ M), AG9 (50  $\mu$ M), erbstatina (10  $\mu$ M) y genisteína (200  $\mu$ M). A) Extracto proteico total (60  $\mu$ g), B) extracto proteico citosólico (30  $\mu$ g) y C) extracto proteico nuclear (30  $\mu$ g). El basal corresponde a células sin tratar. La  $\alpha$ -tubulina y la Histona 1 se usaron como controles de carga. D) Representación gráfica de las bandas cuantificadas y normalizadas con la  $\alpha$ -tubulina. \* p < 0,05 y  $\blacktriangle$  p < 0,01 con respecto al Basal y \*\* p < 0,01 con respecto a AG490.

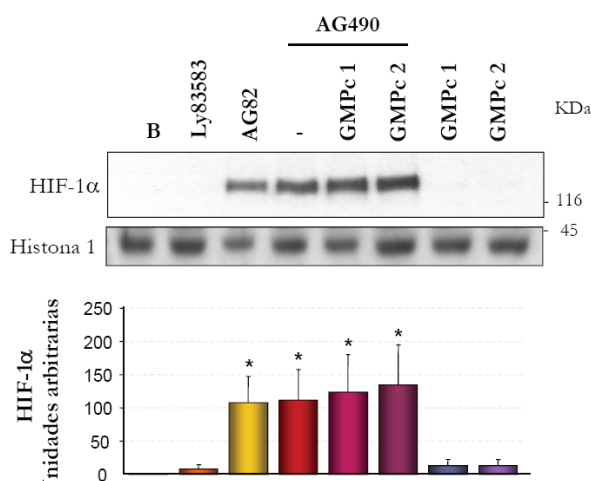


### 4.3.3. El efecto del AG490 sobre el incremento de la proteína HIF-1 $\alpha$ no está mediado por la inhibición de la GC

Aunque hay bastante información general acerca de los inhibidores tirosina quinasas se sabe relativamente poco acerca de su especificidad y, como hemos mencionado anteriormente, a medida que están siendo empleados se descubren nuevas dianas. En el caso del AG490, una de estas dianas es la guanilato ciclasa (GC). Para valorar si el incremento de HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 se debía a la inhibición de la actividad GC o a la consecuente disminución en los niveles de GMPc<sup>248</sup>, se incubaron CE durante 2 horas en presencia de AG490 (50  $\mu$ M), el inhibidor de GC soluble (GCs) Ly83583 (10  $\mu$ M)<sup>247</sup>, y el AG82 (50  $\mu$ M), que actúa como inhibidor no competitivo de Guanilato ciclasa C (GC-C) y GCs<sup>248</sup>. Las concentraciones utilizadas superaban las IC<sub>50</sub> para guanilato ciclasa.

Además, como segunda comprobación incorporamos dos análogos del GMPc, el dibutiril GMPc y el 8pCPT-GMPc (500  $\mu$ M)<sup>368</sup>, tanto en ausencia como en presencia de AG490. El tiempo seleccionado para este experimento garantizaba tanto el incremento de HIF-1 $\alpha$  como la inhibición de GC. Los análogos de GMPc difunden a través de membrana fácilmente por lo que son de rápida actuación.

Los resultados mostraron que la inhibición de la GCs por Ly83583 no tiene efecto sobre los niveles de HIF-1 $\alpha$  (Figura 4.14) y que los análogos de GMPc tampoco reducen el incremento de HIF-1 $\alpha$  producido por el AG490. Estos datos descartan la contribución de la inhibición sobre la actividad de la GC al incremento de HIF-1 $\alpha$  inducido por AG490.



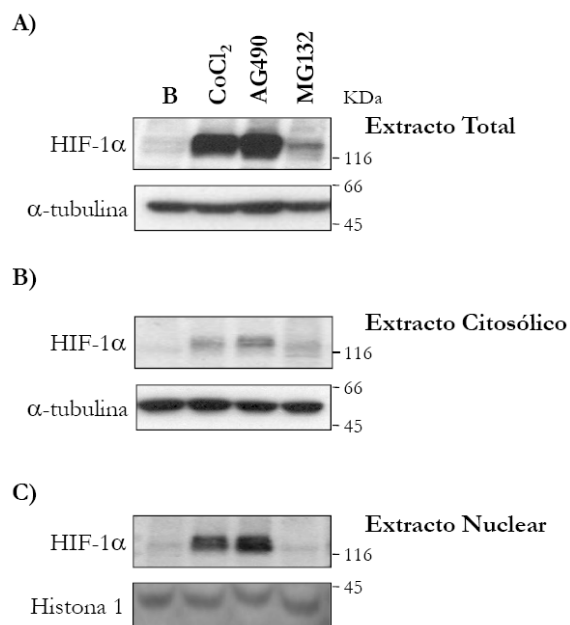
**Figura 4.14. Ausencia de efecto de inhibidores de GC y de análogos de GMPc sobre el incremento de HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490.** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en extractos nucleares (30  $\mu$ g) de CE estimuladas con Ly83583 (10  $\mu$ M), AG490 y AG82 (50  $\mu$ M), y los análogos de GMPc (GMPc1 = dibutiril cGMP, GMPc2 = 8pCPT-cGMP) (500  $\mu$ M) durante 2 horas. El basal corresponde a células sin tratar. La Histona 1 se usó como control de carga. \*  $p < 0,001$  con respecto al basal.

#### 4.3.4. El efecto del AG490 sobre el incremento de la proteína HIF-1 $\alpha$ no está mediado por la inhibición del proteasoma

Puesto que el incremento observado en la subunidad HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 no guardaba relación con las acciones descritas hasta la fecha para esta tirfostina, nuestro siguiente objetivo fue valorar la implicación directa del AG490 en la ruta de degradación de HIF-1 $\alpha$ . A pesar de existir otros mecanismos no dependientes del O<sub>2</sub> implicados en la degradación, debido a la rapidez y significancia del incremento observado (Figura 4.6) los siguientes experimentos se orientaron a evaluar la ruta de degradación clásica “hidroxilación, ubiquitinación y degradación por proteasoma”.

Para ver si el AG490 podría estar impidiendo la degradación por proteasoma, se comparó el efecto que tenía el AG490 (50  $\mu$ M) sobre la subunidad HIF-1 $\alpha$  con el del MG132 (10  $\mu$ M) un potente inhibidor de proteasoma, capaz de reducir la degradación de proteínas conjugadas a ubiquitina en células de mamífero y cuya capacidad para incrementar HIF-1 $\alpha$  había sido previamente descrita <sup>165</sup>. La concentración utilizada era suficiente para ejercer su efecto como inhibidor del proteasoma. Para este experimento las CE se incubaron de forma independiente con los reactivos durante 4 horas.

Los resultados demostraron, como era de esperar, que en presencia del MG132, la subunidad HIF-1 $\alpha$  se incrementaba significativamente tanto en los extractos totales como en los citoplasmáticos pero no en los nucleares. El grado del incremento sin embargo era mucho menor que el observado en presencia de AG490 (Figura 4.15).



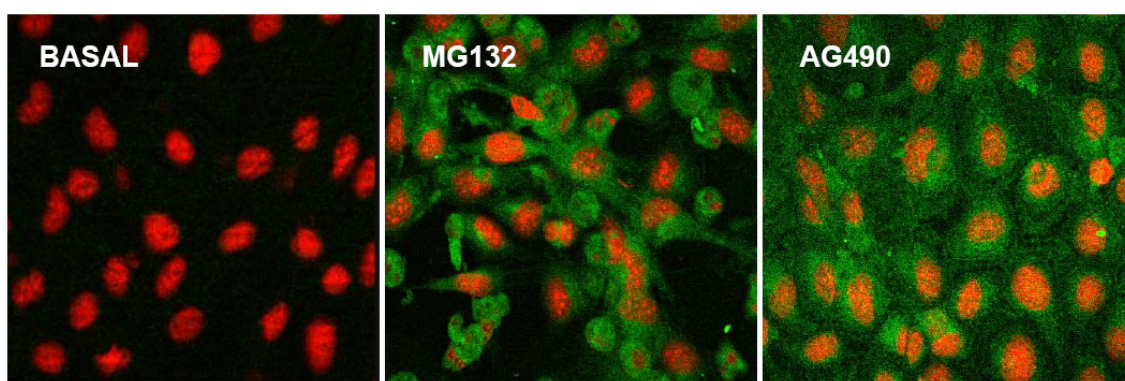
**Figura 4.15. El MG132 incrementa los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  en el citoplasma pero no en el núcleo.** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en CE estimuladas con AG490 (50  $\mu$ M), y el inhibidor del proteasoma MG132 (10  $\mu$ M) durante 4 horas. El basal corresponde a células sin tratar. A) Extracto proteico total (60  $\mu$ g), B) extracto proteico citoplasmático (30  $\mu$ g) y C) extracto proteico nuclear (30  $\mu$ g). El CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) se usó como control positivo. La  $\alpha$ -tubulina y la Histona 1 se usaron como controles de carga.

La ausencia de banda en los extractos nucleares, en presencia del inhibidor del proteasoma MG132 (Figura 4.15C), demostró la incapacidad de la subunidad HIF-1 $\alpha$  acumulada en presencia de MG132 para translocarse al núcleo mientras que, el tratamiento

#### 4. Resultados

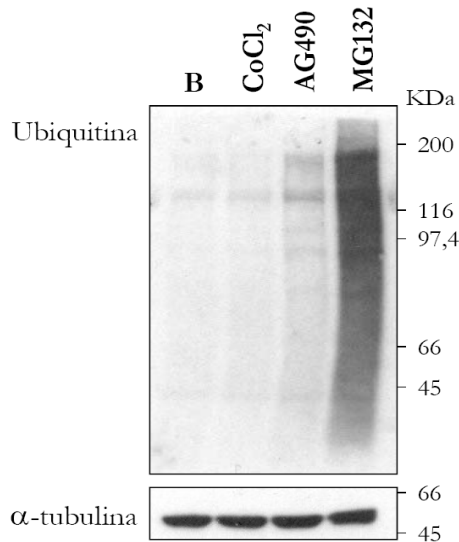
con AG490 si produce dicha translocación, lo que sugiere mecanismos de acción diferentes.

De nuevo la localización nuclear de HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 se confirmó mediante microscopia confocal con técnicas de inmunofluorescencia en CE tratadas con AG490 (50  $\mu$ M) y MG132 (10  $\mu$ M) durante 4 horas. Los resultados confirmaron que, en presencia de la tirfostina, la subunidad HIF-1 $\alpha$  podía translocarse al núcleo mientras que en presencia del inhibidor del proteasoma su localización era exclusivamente citoplásmica (Figura 4.16).



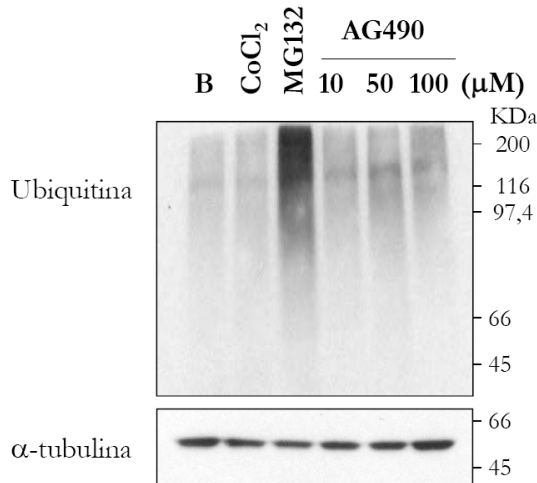
**Figura 4.16.** El AG490, a diferencia del MG132, permite la translocación de HIF-1 $\alpha$  al núcleo. Microfotografías confocales (200X) de CE estimuladas con AG490 (50  $\mu$ M) y el inhibidor del proteasoma MG132 (10  $\mu$ M) durante 4 horas. El basal corresponde a células sin tratar. La subunidad HIF-1 $\alpha$  (verde), ausente en estado basal, se localiza en el citoplasma de las células tratadas con MG132 mientras que en presencia de AG490 puede observarse tanto en el citoplasma como en el núcleo. La tinción con Ioduro de propidio permite la visualización de los núcleos (rojo).

Para comprobar si este resultado se debía a la ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$  se obtuvieron extractos proteicos totales de CE incubadas durante 4 horas con AG490 (50  $\mu$ M), CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) y el inhibidor del proteasoma MG132 (10  $\mu$ M), realizamos un Western blot de las proteínas obtenidas y comprobamos la cantidad de ubiquitina asociada. Los resultados mostraron un incremento significativo de ubiquitinación en presencia de MG132 consistente con un efecto inhibitor de la degradación de proteína ubiquitinizadas por el proteasoma (Figura 4.17). En contra de lo esperado también pudimos observar un ligero incremento de ubiquitinación en presencia de la tirfostina AG490.



**Figura 4.17. El AG490 incrementa ligeramente los niveles ubiquitinación aunque en menor medida que el MG132.** Western blot de ubiquitina en extractos proteicos totales (20  $\mu\text{g}$ ) de CE estimuladas con AG490 (50  $\mu\text{M}$ ), y el inhibidor del proteasoma MG132 (10  $\mu\text{M}$ ) durante 4 horas. El basal corresponde a células sin tratar. La  $\alpha$ -tubulina se usó como control de carga.

Los niveles de ubiquitinación en presencia de AG490 eran sin embargo muy inferiores a los observados en presencia de MG132. Para comprobar si este efecto podía tener relación con la concentración utilizada de AG490 incubamos las CE con concentraciones crecientes de tirfostina y valoramos de nuevo la cantidad de ubiquitina asociada a proteínas. Los resultados no mostraron modificaciones significativas en el grado de ubiquitinación en función de la concentración empleada de AG490 (Figura 4.18).

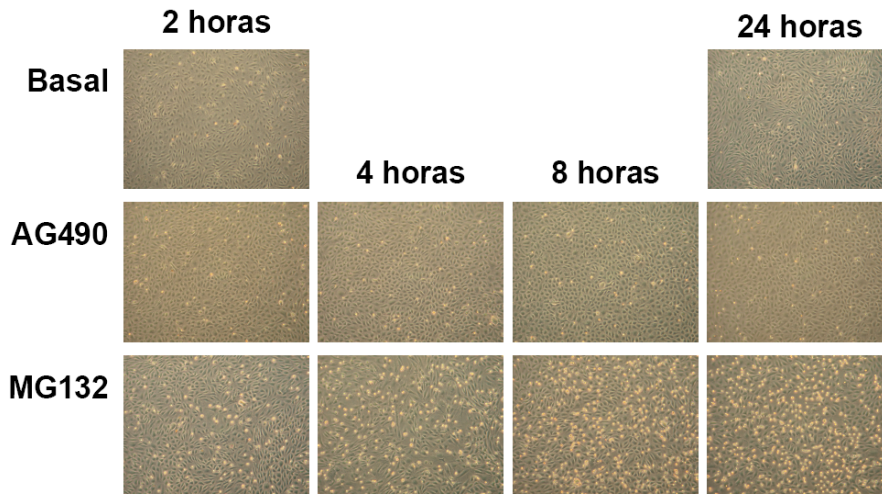


**Figura 4.18. El AG490 aumenta el grado de ubiquitinación de forma independiente de la concentración.** Western blot de ubiquitina en extractos proteicos totales (20  $\mu\text{g}$ ) de CE estimuladas con concentraciones crecientes de AG490 (10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ), y el inhibidor del proteasoma MG132 (10  $\mu\text{M}$ ) durante 4 horas. El basal corresponde a células sin tratar. La  $\alpha$ -tubulina se usó como control de carga.

El leve incremento en el grado de ubiquitinación con la tirfostina AG490 en comparación con el observado en presencia de MG132 tampoco se correspondía con los cambios inducidos por ambos compuestos en HIF-1 $\alpha$ . Para valorar de nuevo la posible inhibición del proteasoma por parte del AG490 y evaluar, si el escaso aumento de HIF-1 $\alpha$  en presencia de la tirfostina se debía a un mecanismo de inhibición más lento, disminuimos la concentración de AG490 a 25  $\mu\text{M}$  e incubamos las CE con ambos estímulos durante tiempos más largos (2, 4, 8 y 24 horas).

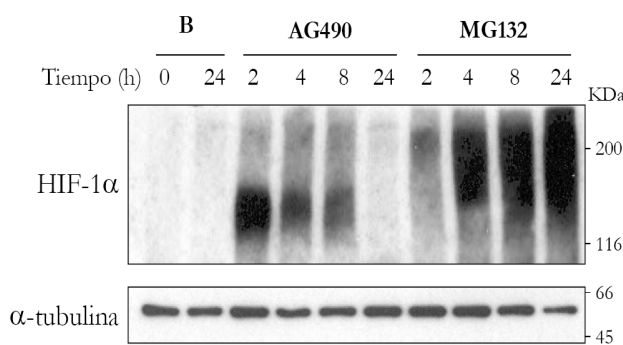
#### 4. Resultados

En primer lugar, la observación de las CE al microscopio óptico durante el tiempo de estimulación demostró que el tratamiento de las CE con MG132 tenía un efecto citotóxico desde las primeras horas de incubación mientras que este efecto no se apreciaba en las células estimuladas con AG490 (Figura 4.19).



**Figura 4.19.** El AG490 no tiene efectos citotóxicos sobre CE en cultivo. Microfotografías (200x) de CE estimuladas con AG490 (25  $\mu$ M) y el inhibidor del proteasoma MG132 (10  $\mu$ M) tomadas antes de la extracción de proteínas. El basal corresponde a células sin tratar.

El análisis de la expresión proteica mediante Western blot mostró que la inhibición del proteasoma ejercida por el MG132 permitía incrementar los niveles de HIF-1 $\alpha$  a tiempos mayores de exposición. Por el contrario, y como ya habíamos observado en experimentos anteriores (Figura 4.4), el AG490 no fue capaz de inhibir la degradación durante tiempos tan largos; el incremento fue indetectable a las 24 horas. Por otro lado el desplazamiento de la banda de HIF-1 $\alpha$  hacia pesos moleculares superiores en presencia de MG132 sugirió un alto grado de ubiquitinación en la proteína HIF-1 $\alpha$ <sup>165</sup> mientras que en presencia de AG490 la subunidad permanecía a la altura correspondiente a la de la proteína sin ubiquitinizar (Figura 4.20).



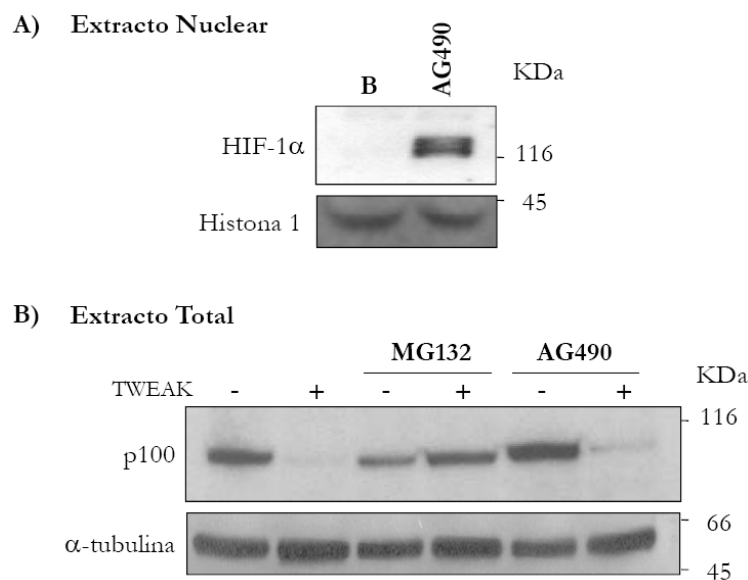
**Figura 4.20.** La exposición prolongada a MG132 aumenta la expresión de formas de HIF-1 $\alpha$  de alto peso molecular. Western blot de HIF-1 $\alpha$  en extractos proteicos totales (30  $\mu$ g) de CE estimuladas con AG490 (25  $\mu$ M) o MG132 (10  $\mu$ M) a diferentes tiempos (2, 4, 8 y 24 horas). El basal (B) corresponde a células sin tratar. La  $\alpha$ -tubulina se usó como control de carga.

Para demostrar definitivamente que la inhibición en la degradación de HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 se producía en pasos previos a su ubiquitinación, y no a una posible inhibición del proteasoma, estudiamos el efecto del AG490 sobre la ruta de activación del factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B2. La degradación por proteasoma de la proteína p100 previamente ubiquitinizada en respuesta a citoquinas inflamatorias, facilita la liberación de la subunidad activa p52 y su migración al núcleo <sup>369</sup> de este modo, si el AG490 era capaz de inhibir la actividad del proteasoma como hace el MG132, en presencia de la citoquina TNF like weak (TWEAK) y AG490 la subunidad p100 no sería procesada.

Este experimento se realizó en células tubulares proximales murinas (MCT) por tener bien caracterizado el sistema mediante reactivos específicos en esta especie <sup>370</sup>. En este sistema celular la tirfostina AG490 (50  $\mu$ M) era capaz de incrementar la subunidad HIF-1 $\alpha$  en el núcleo de las MCT tras 4 horas de estimulación (Figura 4.21.A).

Tras confirmar que el AG490 también es capaz de incrementar los niveles de HIF-1 $\alpha$  incubamos MCT con MG132 (10  $\mu$ M) o AG490 (50  $\mu$ M) media hora antes de la estimulación con TWEAK (100 ng/mL) y los estímulos se mantuvieron durante 3 horas y media más antes de la recogida celular para la extracción proteica.

Los resultados obtenidos mostraron que, el AG490 (50  $\mu$ M) no impedía el procesamiento de p100 en células estimuladas con TWEAK, efecto que sí se apreciaba en presencia de MG132 (10  $\mu$ M) (Figura 4.21.B).

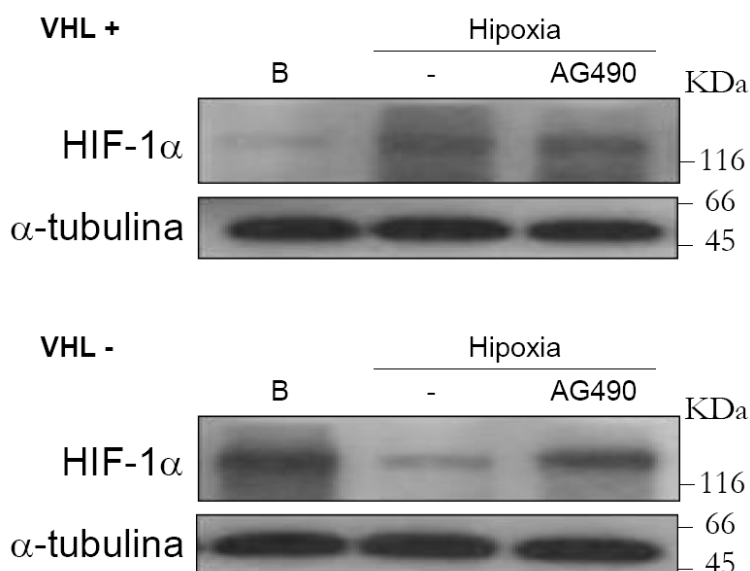


**Figura 4.21. El AG490 no impide la liberación de los monómeros de NF- $\kappa$ B2.** A) Western blot de HIF-1 $\alpha$  en extractos proteicos nucleares (30  $\mu$ g) de MCT estimuladas durante 4 horas con AG490 (50  $\mu$ M). La Histona 1 se usó como control de carga. B) Western blot de la subunidad p100 de NF- $\kappa$ B2 en extractos proteicos totales (30  $\mu$ g) de MCT estimuladas durante 3 horas y media con TWEAK (100ng/mL). Los inhibidores MG132 (10  $\mu$ M) y AG490 (50  $\mu$ M) se añadieron 30 minutos antes del estímulo con TWEAK. La  $\alpha$ -tubulina se usó como control de carga.

#### 4.3.5. La ausencia de VHL previene la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$ inducida por AG490

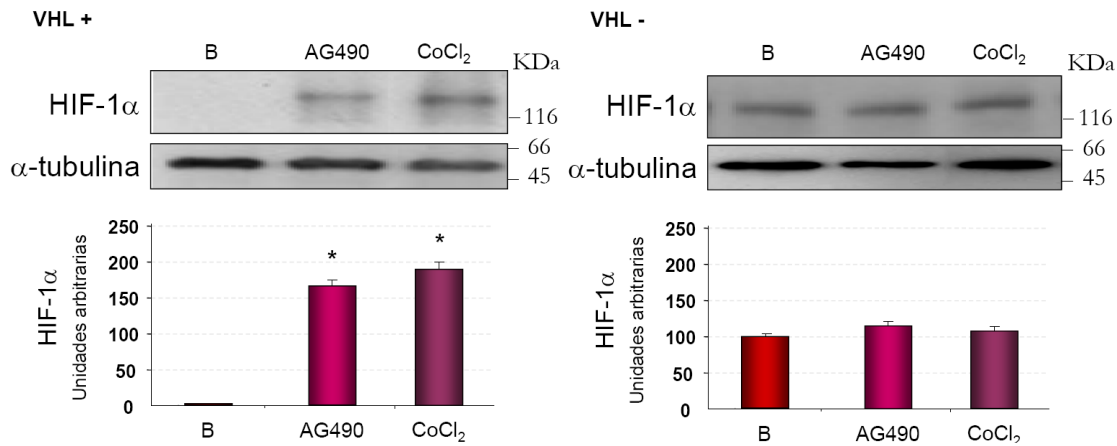
Ya que la estabilización de subunidades HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 no está relacionada con la inhibición del proteasoma diseñamos una serie de experimentos que nos permitieran identificar el punto de degradación bloqueado por efecto del AG490. Puesto que la pVHL es necesaria para la degradación de HIF-1 $\alpha$  en condiciones de normoxia utilizamos células claras de carcinoma renal pVHL negativas (RCC4-VHL-) y su control positivo transfectadas con pVHL *wt* (RCC4-VHL+) <sup>371</sup>.

En primer lugar valoramos el efecto del AG490 en células carentes de pVHL funcional en condiciones hipóxicas. Como era de esperar las células carentes de pVHL mostraban altos niveles de HIF-1 $\alpha$  constitutivamente debido a la incapacidad de ser reconocida por pVHL y ubiquitinizarse para su degradación. En condiciones de hipoxia sin embargo no se observaba incremento de HIF-1 $\alpha$  con respecto al basal en presencia de AG490 (Figura 4.22).



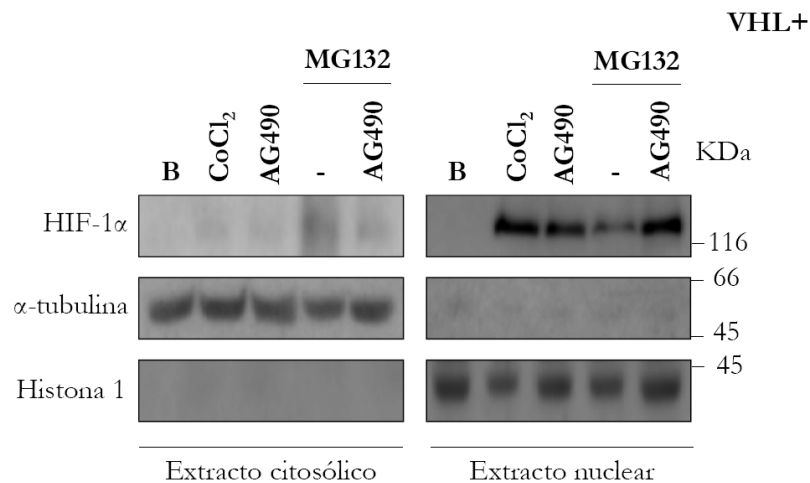
**Figura 4.22. AG490 no incrementa los niveles de HIF-1 $\alpha$  con respecto al basal en células carentes de pVHL.** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en extractos proteicos totales (30  $\mu$ g) de células de carcinoma renal con VHL (VHL+) o sin VHL (VHL-) estimuladas con AG490 (50  $\mu$ M) durante 4 horas en hipoxia. El basal (B) corresponde a células sin tratar. La  $\alpha$ -tubulina se usó como control de carga.

Para comprobar este resultado utilizamos de nuevo el CoCl<sub>2</sub> como inhibidor de la interacción HIF-1 $\alpha$ -VHL. Como era de esperar tampoco hubo incremento en presencia de CoCl<sub>2</sub>. Como ya habíamos visto en experimentos anteriores en otras células VHL funcionales, en las células RCC4-VHL+ también se produjo un incremento significativo de la subunidad HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 (Figura 4.23).



**Figura 4.23. pVHL es necesaria para la estabilización de HIF-1 $\alpha$  inducida por AG490.** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en extractos proteicos totales (30 $\mu$ g) de células de carcinoma renal con VHL (VHL+) o sin VHL (VHL-) estimuladas, durante 4 horas con AG490 (50 $\mu$ M) y CoCl<sub>2</sub> (100 $\mu$ M). El basal (B) corresponde a células sin tratar. El CoCl<sub>2</sub> se usó como control positivo. La  $\alpha$ -tubulina se usó como control de carga. Representación gráfica de las bandas cuantificadas y normalizadas con la  $\alpha$ -tubulina. \*  $p < 0,02$  con respecto al Basal.

De nuevo para valorar la capacidad de translocación al núcleo de las subunidades HIF-1 $\alpha$  estabilizadas por AG490 utilizamos el MG132. Como era de esperar las subunidades inducidas tanto por AG490 como por CoCl<sub>2</sub> en células VHL+ se encontraron mayoritariamente en los extractos nucleares mientras que la acumulación inducida por inhibición del proteasoma se observaba mayoritariamente en el citoplasma. (Figura 4.24).



**Figura 4.24. Translocación de HIF-1 $\alpha$ .** Western blot de HIF-1 $\alpha$  en extractos proteicos nucleares (30  $\mu$ g) y citoplasmáticos de células de carcinoma renal con VHL (VHL+) estimuladas durante 4 horas con MG132 (10  $\mu$ M), AG490 (50  $\mu$ M) y CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M). El basal (B) corresponde a células sin tratar. La  $\alpha$ -tubulina y la Histona 1 se usaron como controles de carga.

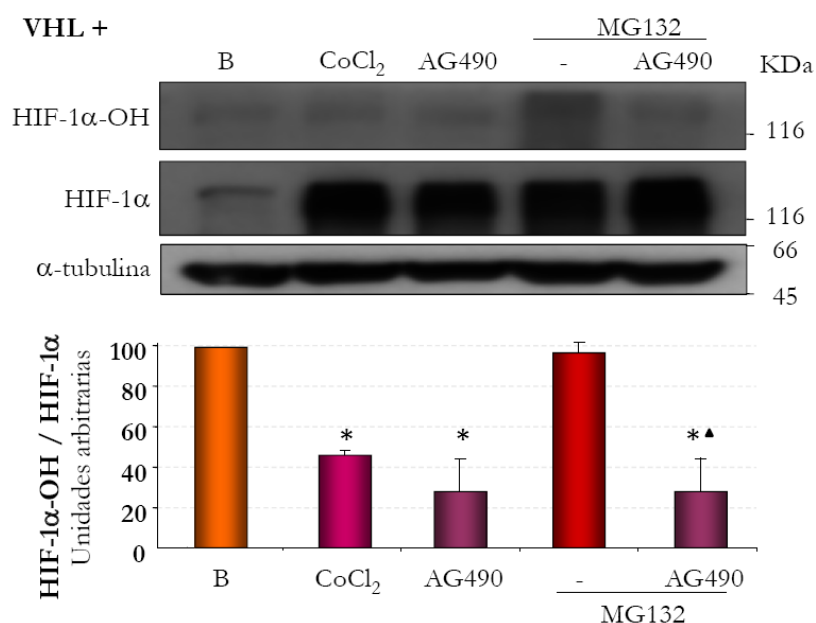


#### 4.3.6. El AG490 previene la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$

Los resultados hasta ahora presentados sugerían que el AG490 evitaba la degradación de HIF-1 $\alpha$  en un momento previo al reconocimiento por pVHL, impidiendo su ubiquitinación por la vía dependiente de O<sub>2</sub> y su posterior degradación por el proteasoma facilitando su migración al núcleo. Ya que en condiciones de normoxia HIF-1 $\alpha$  es hidroxilado en su Pro<sup>564</sup> por acción de las prolin hidroxilasas, quisimos comprobar si el AG490 podía impedir esta hidroxilación.

Para ello utilizamos células VHL+. Las células se incubaron durante 5 horas con AG490 y CoCl<sub>2</sub>. Éste último se utilizó como control positivo de la inhibición de la degradación de HIF-1 $\alpha$ . El tiempo elegido permitía combinar la estimulación de AG490, tras la primera hora de incubación, con la del inhibidor de proteasoma MG132 ya descrito durante 4 horas.

Como ya habíamos observado en células VHL+, tanto el AG490 como el CoCl<sub>2</sub> incrementaron los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  sin embargo no los de proteína HIF-1 $\alpha$ -OH (Figura 4.25). El pretratamiento durante una hora con AG490 bloqueó la acumulación de HIF-1 $\alpha$ -OH en presencia de MG132 sin afectar significativamente a los niveles de HIF-1 $\alpha$  total sugiriendo que el AG490 inhibe la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$ .

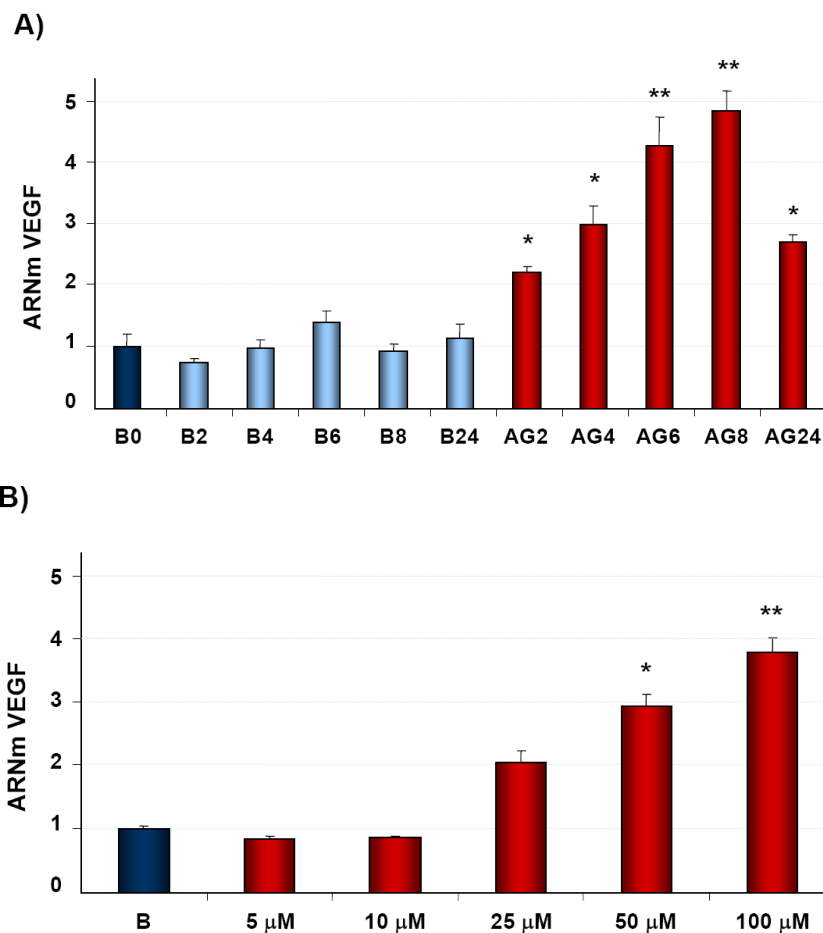


**Figura 4.25. AG490 previene la hidroxilación de la proteína HIF-1 $\alpha$ .** Western blots de HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\alpha$ -OH en extractos proteicos totales (30  $\mu$ g) de células de carcinoma renal con VHL (VHL+) estimuladas, durante 5 horas con AG490 (50  $\mu$ M) y CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M). Tras la primera hora de incubación se añadió el MG132 (10  $\mu$ M). El basal (B) corresponde a células sin tratar. El CoCl<sub>2</sub> se usó como control positivo. La  $\alpha$ -tubulina se usó como control de carga. Representación gráfica del ratio HIF-1 $\alpha$ -OH / HIF-1 $\alpha$  de las bandas cuantificadas y normalizadas con la  $\alpha$ -tubulina. \*  $p < 0,05$  con respecto al Basal y ▲  $p < 0,05$  con respecto al MG132.

## 4.4. Consecuencias biológicas del incremento de HIF-1 $\alpha$ inducido por AG490

### 4.4.1 El AG490 incrementa los niveles del ARNm de VEGF en CE cultivadas

Dado que HIF-1 es el principal factor de transcripción para el gen de VEGF y puesto que el AG490 no sólo incrementaba los niveles de la subunidad HIF-1 $\alpha$  sino que permitía su translocación al núcleo quisimos comprobar si HIF-1 $\alpha$  era activo e inducía la expresión del mensajero de VEGF. Para ello se estimularon CE durante distintos tiempos (2, 4, 6, 8 y 24 horas) con AG490 (50  $\mu$ M) y extrajimos su ARN total para llevar a cabo una PCR en tiempo real del ARNm para VEGF. Como controles se utilizaron extractos de ARN obtenidos a los mismos tiempos sin estimular. Los resultados obtenidos demostraron que el AG490 provocaba incrementos significativos en los niveles del ARNm para VEGF (Figura 4.26.A).



**Figura 4.26. El AG490 incrementa la expresión del ARN mensajero de VEGF, medida mediante PCR en tiempo real** A) CE estimuladas con AG490 (50  $\mu$ M) durante diferentes tiempos (horas). Valores normalizados con respecto al basal extraído a tiempo 0 \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,005$  con respecto al basal 0 horas. B) CE estimuladas durante 6 horas con diferentes concentraciones de AG490. Valores normalizados con respecto al basal. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,005$ .

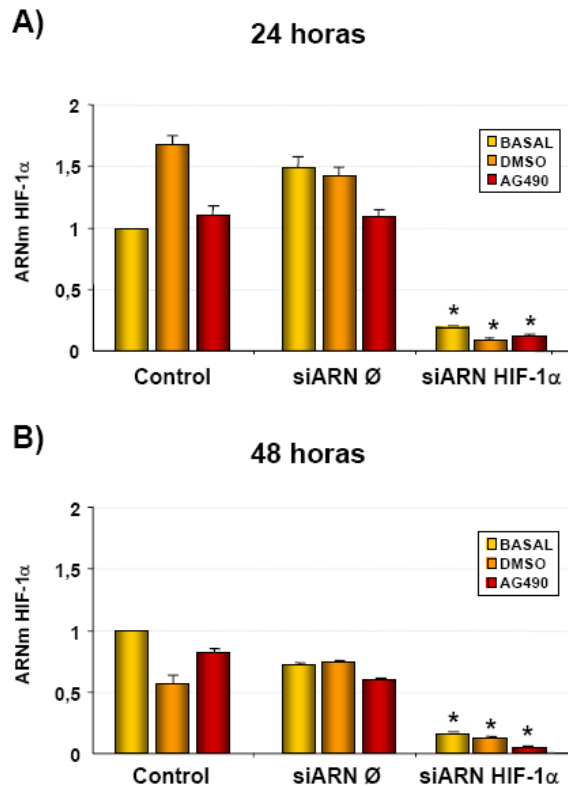
Seguidamente para evaluar el efecto de la concentración de AG490 sobre el incremento de los niveles de ARNm para VEGF se añadieron diferentes concentraciones de AG490 (5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) y el estímulo se mantuvo durante seis horas. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que el aumento de los niveles de ARNm de VEGF dependían de la concentración de AG490 (Figura 4.26.B).

Para demostrar que el incremento del ARN mensajero de VEGF era resultado de la activación de HIF-1 $\alpha$  por AG490 y no a otras posibles acciones de la tirfostina, diseñamos un experimento con un silenciador que impidiera la traducción del mensajero de HIF-1 $\alpha$  (siARN HIF-1 $\alpha$ ). La especificidad de este silenciador se valoró utilizando como control una secuencia inespecífica denominada siARN  $\emptyset$  y, para evitar que el daño celular producido durante la transfección alterara nuestros resultados, las CE utilizadas como “Control” se sometieron al mismo procedimiento de transfección pero sin incorporar ninguna secuencia.

De esta manera las CE se transfectaron con los siARN, o sin secuencia en el caso de las “Control”, y antes de su recogida para los estudios de expresión proteica o de mensajeros a las 24 y 48 horas, se estimularon previamente durante 6 horas con AG490 (50  $\mu\text{M}$ ) o su vehículo DMSO.

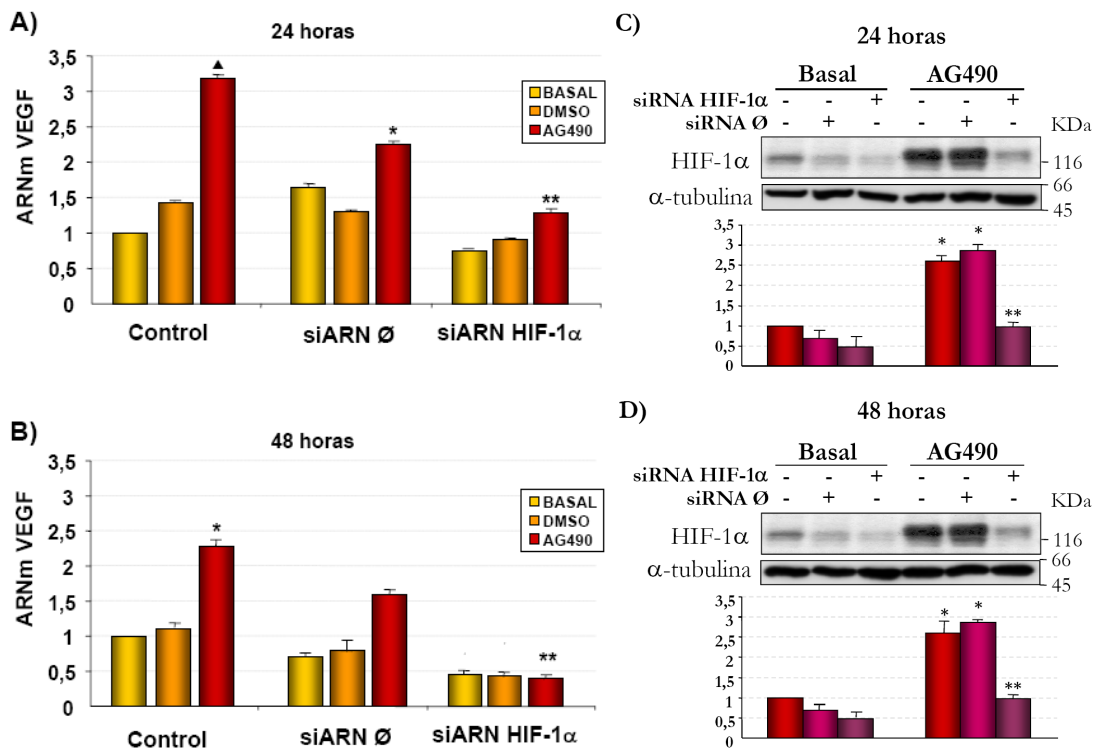
Los análisis del ARNm de HIF1- $\alpha$  mediante PCR en tiempo real demostraron la eficacia del silenciamiento en presencia del siARN HIF-1 $\alpha$  observándose una disminución significativa, aunque no total, del ARN mensajero de HIF-1 $\alpha$  tanto a las 24 como a las 48 horas (Figuras 4.27.A y B).

Los extractos proteicos totales, analizados por Western blot, corroboraron este silenciamiento, los niveles de proteína HIF-1 $\alpha$  en presencia del siARN HIF1- $\alpha$  disminuían, tanto a las 24 como a las 48 horas, hasta alcanzar el nivel basal cuando las CE estaban estimuladas con AG490 (Figuras 4.28.C y D).



**Figura 4.27.** El siARN HIF-1 $\alpha$  bloquea la traducción del ARNm de HIF-1 $\alpha$ . CE transfectadas con el silenciador de HIF-1 $\alpha$  (siARN HIF-1 $\alpha$ ) o su control negativo (siARN Ø) estimuladas con AG490 (50 $\mu$ M) o su vehículo DMSO durante 6 horas. A) y B) Expresión del mensajero de HIF-1 $\alpha$  medida mediante PCR en tiempo real a las 24 (A) y a las 48 (B) horas. \*  $p < 0,01$  con respecto al control basal.

Una vez comprobada la eficacia de la técnica del silenciamiento, para comprobar si la expresión incrementada del VEGF en presencia de AG490 se debía a la presencia de un HIF-1 $\alpha$  activo se realizó una PCR en tiempo real del mensajero de VEGF. Los resultados demostraron que el siARN HIF-1 $\alpha$  impedía el incremento del mensajero de VEGF en presencia de AG490 (Figura 4.28). Este efecto era significativo tanto a las 24 como a 48 horas después de la transfección (Figuras 4.28.A y B).



**Figura 4.28. El siARN HIF-1α impide el incremento del ARNm de VEGF en presencia de AG490.** CE transfectadas con el silenciador de HIF-1α (siARN HIF-1α) o su control negativo (siARN Ø) estimuladas con AG490 (50 μM) o su vehículo DMSO durante 6 horas. Expresión del mensajero de VEGF medida mediante PCR en tiempo real a las 24 (A) y a las 48 (B) horas. Valores normalizados con respecto al basal extraído a tiempo 0. \*  $p < 0,05$  y <sup>▲</sup>  $p < 0,01$  con respecto al control basal y \*\*  $p < 0,05$  con respecto al control AG490. Western blots de HIF-1α en extractos proteicos totales (30 μg) de CE transfectadas con el silenciador de HIF-1α (siARN HIF-1α) o su control negativo (siARN Ø) y estimuladas a las 24 (C) y a las 48 (D) horas con AG490 (50 μM) durante 6 horas. La α-tubulina se usó como control de carga. Representación gráfica HIF-1α de las bandas cuantificadas y normalizadas con la α-tubulina. \*  $p < 0,05$  con respecto al Basal en células sin transfectar y \*\*  $p < 0,05$  con respecto al AG490 en células sin transfectar.

#### 4.4.2. El AG490 protege del daño renal inducido por isquemia/reperfusión en ratones

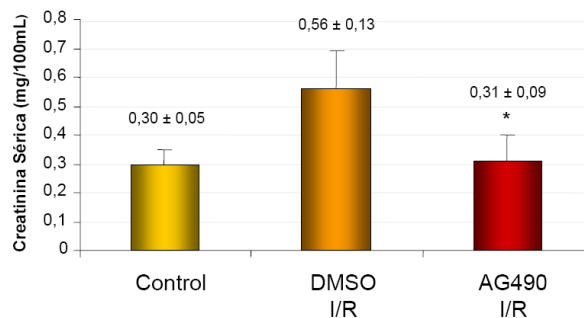
Ya que el AG490 aumenta la estabilización de HIF-1α y ello tiene como consecuencia el incremento de factores que promueven la adaptación del tejido y la supervivencia celular, quisimos determinar la posible protección del AG490 *in vivo* utilizando un modelo de isquemia/reperfusión (I/R) en ratones.

Para ello hicimos tres grupos de cuatro ratones cada uno. Mediante una inyección intraperitoneal se les administró: vehículo al grupo “DMSO I/R” y AG490 (1,5 mg/Kg) al grupo “AG490 I/R”. Media hora después les sometió a una isquemia renal bilateral durante

30 minutos y a una reperfusión posterior de 24 horas. Al grupo “Control” se les realizó la misma operación que a los ratones tratados pero no se les sometió a I/R.

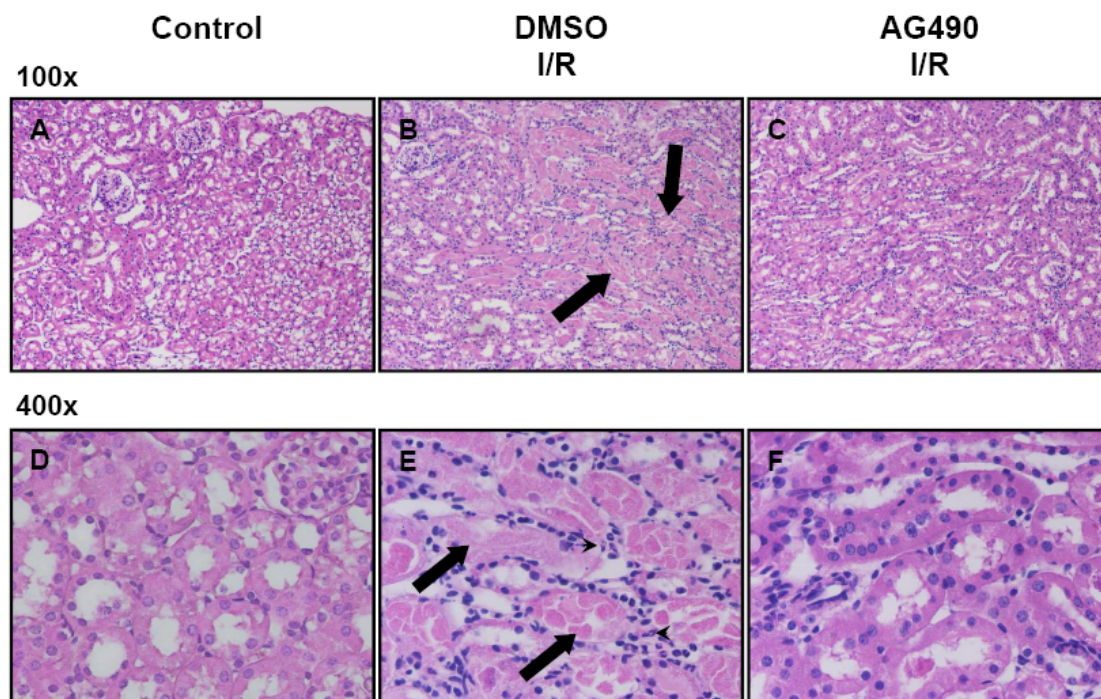
Nuestro primer objetivo fue evaluar los niveles de creatinina en sangre tras la isquemia-reperfusión ya que es el indicador más común de la función renal.

El AG490 protegió del deterioro de la función renal, estimado por el restablecimiento de los niveles de creatinina sérica (Figuras 4.29).



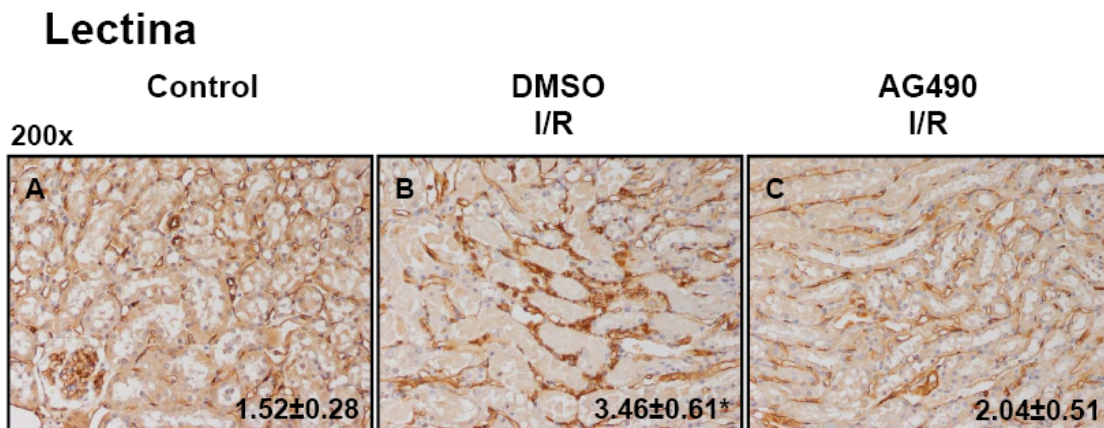
**Figura 4.29.** El AG490 previene el incremento de creatinina sérica inducido por isquemia/reperfusión en ratones. “Control” operados pero sin tratar y sin isquemia, “DMSO I/R” tratados con el vehículo y “AG490 I/R” con AG490 (1,5 mg/Kg), mediante i.p. media hora antes de someterles a 30 minutos/24 horas de I/R. Valores de creatinina sérica expresados en mg/100mL. \*  $p < 0,05$  con respecto a los ratones tratados con DMSO y sometidos a I/R.

Para valorar la posible protección del AG490 en el daño de los capilares peritubulares y la infiltración leucocitaria tras el periodo de I/R, se realizaron cortes histológicos de riñón y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Así, los resultados obtenidos mostraron que el daño renal inducido por un periodo de I/R de 30 minutos/24 horas, aumentaba el daño de los capilares peritubulares y la infiltración leucocitaria en comparación con los respectivos controles. Por otra parte, el tratamiento con AG490 (1,5 mg/Kg), media hora antes de provocar la I/R, disminuyó la severidad del daño renal, reflejada por una menor infiltración de leucocitos y una menor acumulación de restos celulares en los túbulos renales, en comparación con los ratones sin tratar o tratados únicamente con el vehículo DMSO (Figura 4.30).



**Figura 4.30.** El AG490 protege del daño renal inducido por isquemia/reperfusión en ratones. Microfotografías (100x ó 400x) de riñones teñidos con hematoxilina-eosina. Imágenes representativas de cada grupo de ratones: “Control” operados pero sin tratar y sin isquemia, “DMSO I/R” tratados con el vehículo y “AG490 I/R” con AG490, mediante i.p. media hora antes de someterles a 30 minutos/24 horas de I/R. Las flechas negras, en B y en E, muestran los túbulos dañados con restos celulares en los riñones tratados solo con DMSO. Las puntas de flecha, en E, indican la infiltración de leucocitos. El daño fue menos severo en los tratados con AG490.

Debido a que los ligandos de superficie en CE sometidas a I/R quedan más expuestos e incrementan el reconocimiento por parte de las lectinas, con objeto de determinar la posible protección del endotelio utilizamos la tinción con lectina de *Bandeiraea simplicifolia* BS-1 como marcador de daño endotelial. El reconocimiento fue de menor intensidad en los riñones de los ratones tratados con AG490 antes de la I/R que en los ratones tratados únicamente con el vehículo (Figura 4.31) demostrando un menor daño endotelial en presencia de nuestra tirfostina.



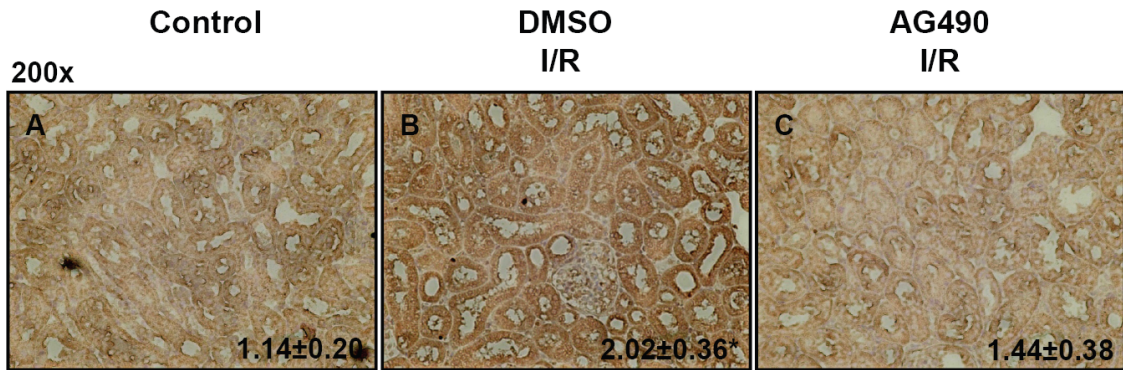
**Figura 4.31. El AG490 disminuye el daño endotelial inducido por isquemia/reperfusión en riñones de ratones.** Microfotografías (200x) de los capilares peritubulares renales teñidos con la lectina *Bandeiraea simplicifolia* BS-1. Imágenes representativas de cada grupo de ratones: “Control” operados pero sin tratar y sin isquemia, “DMSO I/R” tratados con el vehículo y “AG490 I/R” con AG490, mediante i.p. media hora antes de someterles a 30 minutos de I/R. La unión de la lectina a los capilares peritubulares muestran mayor daño endotelial en los riñones de los ratones tratados con DMSO (b) con respecto a los tratados con AG490 (c). Los valores sobre las figuras indican la intensidad de tinción relativa  $\pm$  d.s. de cuatro riñones diferentes por condición. \* $p < 0,05$  con respecto a los otros grupos.

Por último cuando en un tejido se produce isquemia, la falta de oxígeno, conduce a una acumulación de electrones en la zona isquémica y sus adyacentes. Por ello, cuando la sangre cargada de oxígeno comienza a fluir nuevamente durante la reperfusión surge la posibilidad de que accidentalmente, los electrones represados, salten al oxígeno y lo transformen en especies químicas altamente reactivas conocidas como radicales libres de oxígeno, siendo los más conocidos el superóxido y el hidroxilo. Estos radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando malondialdehído (MDA) de tal manera que la concentración de MDA, es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y por lo tanto un buen indicador de peroxidación lipídica.

Quisimos saber si el AG490 podría prevenir la peroxidación lipídica debida a la I/R e incubamos nuestro tejido con un anticuerpo contra el malondialdehído. Los resultados mostraron que el contenido de malondialdehído en los riñones de los ratones “AG490 I/R” fue menor que en los tratados con DMSO indicando una menor proporción de ácidos grasos poliinsaturados oxidados y por lo tanto una menor peroxidación lipídica (Figura 4.32).



## Malondialdehído



**Figura 4.32. El AG490 disminuye el estrés oxidativo renal inducido por isquemia/reperfusión en ratones.** Microfotografías (200x) de los riñones teñidos con el anticuerpo anti-malondialdehído (MDA) como marcador de la peroxidación lipídica resultante del estrés oxidativo. Imágenes representativas de cada grupo de ratones: "Control" operados pero sin tratar y sin isquemia, "DMSO I/R" tratados con el vehículo y "AG490 I/R" con AG490, mediante i.p. media hora antes de someterles a 30 minutos/ 24 horas de I/R. Se observó mayor peroxidación lipídica en los riñones de los ratones tratados con DMSO (b) con respecto a los tratados con AG490 (c). Los valores sobre las figuras indican la intensidad de tinción relativa  $\pm$  d.s. de cuatro riñones diferentes por condición. \* $p < 0,05$  con respecto a los otros grupos.

*DISCUSIÓN*



En la última década se han realizado grandes avances en la comprensión de la maquinaria molecular que utilizan las células de mamífero para detectar y adaptarse a los bajos niveles de oxígeno. El factor inducible por hipoxia 1, HIF-1, como mediador crítico de esta adaptación celular a la hipoxia, es capaz de regular genes implicados en la incorporación y el metabolismo de la glucosa, la angiogénesis, la eritropoiesis, la proliferación y la apoptosis celular, las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular y la función barrera.

La relevancia de HIF en la patogénesis y el tratamiento del fallo renal isquémico agudo, la fibrosis renal y el cáncer renal ha sido motivo de estudio en numerosas ocasiones.

La tirfostina AG490 tiene efectos pleiotrópicos que pueden contribuir a su acción nefroprotectora. En el transcurso de este estudio sobre el potencial terapéutico de AG490 en patología renal y vascular se describe una nueva capacidad de la tirfostina para incrementar los niveles de HIF-1 $\alpha$  transcripcionalmente activos. Este hallazgo, independiente de otros efectos ya caracterizados con anterioridad sobre JAK2, EGFR o GC, podría tener grandes implicaciones en el estudio de los efectos terapéuticos de las tirfostinas, así como en el desarrollo de nuevas aproximaciones a la modulación de la actividad de HIF.

### **5.1. El AG490 estabiliza HIF-1 $\alpha$ de modo dependiente de la concentración y del tiempo en células tubulares renales, endoteliales y de músculo liso vascular**

La hipoxia es el principal estímulo que activa HIF-1, pero otros estímulos de potencial interés terapéutico pueden promover su expresión y activación. Entre éstos se encuentran el fumarato, el quelante específico de Cu(II) y Zn(II) clioquinol y citoquinas y factores de crecimiento como el VEGF<sup>170,372-376</sup>. Esta tesis añade la tirfostina AG490 a esta lista. El tratamiento con AG490 estabilizó y aumentó los niveles de la subunidad  $\alpha$  de HIF-1 (Figura 4.1) sin afectar a la subunidad  $\beta$  (Figura 4.3) en células endoteliales, musculares lisas vasculares y tubulares renales (Figura 4.5). HIF-1 $\alpha$  aumentó tanto en el citoplasma como en el núcleo, demostrando que AG490 permite la rápida translocación de HIF-1 $\alpha$  al núcleo (Figuras 4.2 y 4.4), donde puede ejercer su actividad como factor de transcripción. El incremento de HIF-1 $\alpha$  es dependiente de la concentración y el tiempo (Figuras 4.4, 4.5, 4.6

y 4.7), lo que facilitaría el empleo terapéutico de AG490 o derivados para este fin. Además este efecto se observa en células estructural y funcionalmente diferentes, de diversos órganos y especies, lo que indica que esta dependencia cuantitativa y temporal podría ser extensible a otras estirpes celulares y que el mecanismo de acción de AG490 pudiera ser generalizado ampliando así la aplicabilidad de la tirfostina a otros modelos.

La ausencia de incremento en los niveles de ARNm de HIF-1 $\alpha$  a lo largo del tiempo, e independientemente de la concentración de AG490 utilizada (Figura 4.8), descarta un incremento de la transcripción como causa del aumento de proteína. Sin embargo, aunque los experimentos con cicloheximida demuestran un aumento de estabilidad de HIF-1 $\alpha$  ya sintetizada en presencia de AG490, no permiten descartar un aumento en la tasa de traducción del mensajero ya que éste podría haber tenido lugar antes de la adición de cicloheximida y verse encubierto por el aumento en la estabilidad.

El incremento de HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 se observa rápidamente (45 minutos) (Figura 4.6) y persiste al menos 24 horas si AG490 permanece en el medio (Figura 4.4). Sin embargo, la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 es un efecto total y rápidamente reversible ya que, al eliminar la tirfostina del medio de incubación celular, los niveles de HIF-1 $\alpha$  disminuyen hasta niveles prácticamente indetectables (Figura 4.10). Esto puede suponer una ventaja a fin de poder limitar potenciales efectos adversos. Esta reversibilidad no obstante requiere un buen conocimiento farmacocinético que permita discernir si los efectos adversos, en caso de haberlos, son o no reversibles. Sin embargo, la rápida reversibilidad también puede dificultar una eventual intervención terapéutica donde se desee mantener la inducción de HIF-1 $\alpha$  en el tiempo. La mejor comprensión del mecanismo de acción de HIF-1 $\alpha$  puede ayudar a diseñar fármacos con un efecto más prolongado si se considerara necesario.

### **5.2. El efecto de AG490 no es compartido por otras tirfostinas y es independiente de su acción sobre JAK2, EGFR o GC**

Este trabajo describe una nueva capacidad de la tirfostina AG490 para incrementar los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  que es independiente de otros efectos ya caracterizados con anterioridad sobre JAK2, EGFR o GC.

En nuestros experimentos, el cambio de medio rico en factores de crecimiento en células endoteliales provoca la fosforilación de JAK2 (Figura 4.11). Tal y como está descrito, AG490 evita esta activación de JAK2, sin embargo, el incremento de HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 es independiente de la inhibición de JAK2. Así, las transfecciones con formas dominantes negativas de JAK2 no modularon la expresión de HIF-1 $\alpha$  (Figura 4.12). Por otro lado, la utilización de inhibidores de la actividad tirosina quinasa del EGFR (Figura 4.13) o de la actividad guanilato ciclasa (Figura 4.14) nos permitió descartar también la implicación de estas rutas en el incremento de HIF-1 $\alpha$ .

La erbstatina, la genisteína, Ly83583 y la tirfostina AG9 no aumentaron los niveles de HIF-1 $\alpha$  (Figura 4.13). Resulta interesante comprobar que AG82 no inhibe JAK2<sup>358</sup> y que también comparte el efecto de AG490 sobre HIF-1 $\alpha$  (Figura 4.13), lo que presta solidez a la observación. Nuestro nuevo resultado sugiere que el mecanismo por el que AG490 y AG82 incrementan la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  podría ser común y, aunque diferente de sus acciones conocidas sobre GC y EGFR (Figura 1.13), estar relacionado con características estructurales comunes<sup>248</sup>. Para evaluarlo, sería necesaria la comparación con una batería de tirfostinas que nos permitieran descartar o implicar motivos estructurales claves en este incremento de los niveles de HIF-1 $\alpha$ . Nuestra observación sirve de base para el desarrollo de nuevas pequeñas moléculas en las que, mediante modificaciones sucesivas, se intente separar el efecto inductor de HIF de otros efectos conocidos de AG490 y mejorar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas.

Hasta la fecha todas las publicaciones que describen el uso de tirfostinas como AG490 y AG82 han relacionado los efectos fisiológicos obtenidos con las actividades previamente conocidas. A raíz de los resultados del presente trabajo sería conveniente revisar de nuevo la bibliografía y reevaluar las conclusiones obtenidas teniendo en cuenta las posibles acciones de estas tirfostinas sobre HIF-1 $\alpha$ .

### **5.3. El efecto de AG490 depende de una mayor vida media de la proteína HIF-1 $\alpha$ por inhibición de la hidroxilación**

El mecanismo de inducción de HIF-1 $\alpha$  por AG490 difiere claramente de otros mecanismos descritos en nuestro propio laboratorio y en el mismo sistema celular, en los que el aumento de HIF-1 $\alpha$  se debía a un incremento en la transcripción de su mensajero y por tanto era sensible al tratamiento con cicloheximida<sup>372</sup> (Figura 4.9). La acumulación de

HIF-1 $\alpha$  inducida por AG490 comparte características con la acumulación producida por CoCl<sub>2</sub>, sin incremento en los niveles de ARNm de HIF-1 $\alpha$  pero con una mayor vida media tras la adición de cicloheximida. Además tanto el AG490 como el CoCl<sub>2</sub> inhiben la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$  y promueven su acumulación en células RCC4 VHL+ (Figura 4.24).

Este trabajo muestra que AG490 inhibe la hidroxilación de la Pro<sup>564</sup> en la subunidad HIF-1 $\alpha$  (Figura 4.25), pero la ausencia de anticuerpos específicos para otras hidroxilaciones reguladoras de HIF no ha permitido valorar la especificidad de esta inhibición, ni caracterizar el mecanismo exacto de la inhibición de la hidroxilación de la Pro<sup>564</sup>. Podemos suponer que se debe a una inhibición de las prolil hidroxilasas o al bloqueo del sitio de hidroxilación de HIF-1 $\alpha$  pero ésta y otras cuestiones deberán ser evaluadas en un futuro.

La hidroxilación de prolinas es un paso crítico durante la regulación de HIF-1, pero no existen métodos que permitan medir la actividad de las prolil hidroxilasas de forma fácil. Los ensayos bioquímicos que miden la conversión de  $\alpha$ -cetoglutarato marcado radiactivamente hasta CO<sub>2</sub> requieren equipamiento especial para el manejo de gas radiactivo y generalmente arrastran elevadas señal de fondo debido a reacciones desacopladas<sup>137</sup>. Otro método ampliamente utilizado es el ensayo de captura de pVHL<sup>134</sup> pero esta técnica requiere pasos de inmunoprecipitación que han fracasado en nuestro laboratorio con nuestro sistema celular. Sin embargo, un estudio farmacocinético de las prolil hidroxilasas es esencial para comprender el mecanismo de actuación de AG490. Sería interesante conocer el grado de inhibición de la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$  en la Asn<sup>803</sup>, que actúa impidiendo la asociación necesaria con el co-activador p300 o CBP (*CREBS binding protein*) y por tanto bloqueando la correcta actividad transcripcional<sup>126</sup>. Esta hidroxilación depende de otra dioxigenasa dependiente de O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup> y 2-oxoglutarato y podría estar inhibida en nuestro sistema, ya que el HIF-1 $\alpha$  acumulado es transcripcionalmente activo y se asocia a un incremento en los niveles de ARNm de VEGF. Pequeñas moléculas que interfieren con Fe<sup>2+</sup> o 2-oxoglutarato pueden inhibir las prolil hidroxilasas tanto de HIFs<sup>134;140</sup> como del colágeno<sup>377-379</sup> preservando la función miocárdica en ratones tras infartos de miocardio experimentales<sup>140;380</sup> o inhibiendo la apoptosis de neuronas, posiblemente a través de sus efectos sobre HIFs<sup>80</sup>.

Muchos de los inhibidores de prolil hidroxilasas como el 3,4-DHB, S956711, FG-0041 o la deferroxamina son quelantes de hierro<sup>140</sup>. La inhibición de las prolil hidroxilasas por quelación de hierro induce angiogénesis<sup>381</sup> y protege frente a la isquemia en el riñón, el hígado o corazón, o son capaces de rescatar neuronas de la muerte celular por apoptosis<sup>382</sup>.

El cobalto, el elemento con el que AG490 parece compartir el modo de actuación, es capaz de desplazar el hierro y ha demostrado ser eficaz en enfermedades relacionadas con la hipoxia, incluida la enfermedad cerebrovascular <sup>383-385</sup>. Más aún, el cobalto, no sólo reemplaza al hierro en las prolil hidroxilasas sino que también es capaz de depletar el ascorbato intracelular <sup>140</sup>, necesario como sustrato en las prolil hidroxilasas.

Se sabe que las tirfostinas AG18 y AG82 <sup>255</sup> tienen capacidad para interactuar con metales así que hipotetizamos que el AG490 (Figura 1.16) podría interactuar con el hierro e impedir la correcta funcionalidad de las prolil hidroxilasas.

El quelante de Zn(II) llamado N,N,N,N,tetrakis (2-piridilmetil) etilendiamina (TPEN) bloquea la ubiquitinación de HIF pero no su hidroxilación. La hidroxilación de la Asn<sup>803</sup> previene el reclutamiento de su coactivador CBP permitiendo la acumulación de subunidades de HIF-1 $\alpha$  no funcionales <sup>373</sup>. Por el contrario otro quelante de cationes bivalentes de zinc y cobre, el clioquinol, impide la ubiquitinación y permite la acumulación de HIF-1 $\alpha$  hidroxilado en prolinas pero no asparaginas, o lo que es lo mismo, la acumulación de HIF-1 $\alpha$  funcional <sup>374</sup>. Estos resultados demuestran la necesidad de estudios adicionales que nos permitan evaluar la posible capacidad de AG490 como quelante de hierro y dilucidar el grado de inhibición de las hidroxilasas implicadas en la regulación de HIF-1.

Los resultados de nuestros experimentos apoyan la idea de que la estabilización de subunidades HIF-1 $\alpha$  en presencia de AG490 no está relacionada con una inhibición del proteasoma ya que no inhibe el procesamiento dependiente del proteasoma de proteínas como NF-kB2 p100 (Figura 4.21), ni se asocia a toxicidad en las dosis empleadas (Figura 4.19). En contraposición a las acciones del inhibidor del proteasoma MG132 que facilita el acúmulo de HIF-1 $\alpha$  ubiquitinado incapaz de migrar al núcleo, AG490 no causa acumulación de HIF-1 $\alpha$  ubiquitinado (Figura 4.24) ni impide la migración al núcleo.

#### **5.4. Efectos biológicos de AG490 mediados por HIF-1**

La estabilización de HIF-1 $\alpha$  es necesaria pero no suficiente para inducir la expresión de los genes dianas de HIF. Este trabajo ha demostrado que AG490 incrementa los niveles de HIF-1 $\alpha$  y que el HIF-1 $\alpha$  acumulado es plenamente funcional y capaz de incrementar la expresión del ARNm de VEGF de forma dependiente a la dosis. (Figura 4.26) Los estudios de silenciamiento demostraron que el incremento del ARNm de VEGF



se debía a la estabilización de HIF-1 $\alpha$  por AG490 y no a otros posibles factores de transcripción activados mediante rutas de señalización alternativas (Figura 4.27). Así en presencia del silenciador de HIF-1 $\alpha$  el mensajero de VEGF dejaba de expresarse (Figura 4.28).

Turpaev y colaboradores<sup>256</sup> demostraron que otras tirfostinas, como AG126, eran potentes inductores de una gran variedad de genes sensibles a la presencia de NO o de la actividad redox (Fig 1.18). AG490, al igual que AG30, no es capaz de reproducir este efecto. En ese estudio las tirfostinas con capacidad para activar la expresión de genes dependientes de NO y de la activación redox, no promovieron la expresión de genes inducidos por hipoxia (piruvato deshidrogenasa kinasa o hexoquinasa 2) o por xenobióticos o estrés redox (perosiredoxina 1 y epóxido hidrolasa 1). De nuevo, los motivos estructurales presentes sobre el anillo de benceno malonitrilo presentes en la tirfostina parecían jugar un papel relevante en esta inducción.

Este trabajo pone de manifiesto un nuevo mecanismo por el que las tirfostinas estimulan la expresión de genes dependientes de hipoxia. También en este caso la comparación con una batería de tirfostinas nos permitiría descartar o implicar motivos estructurales claves en el incremento de los niveles de HIF-1 $\alpha$  y en la expresión de los genes que regula.

### 5.5. AG490 como un nuevo agente terapéutico en el fracaso renal agudo

La hipoxia túbulo-intersticial renal juega un papel central en la patofisiología del daño renal agudo y en la progresión de la enfermedad renal crónica. AG490 disminuyó el daño túbulo-intersticial por isquemia/reperfusión renal experimental. La mejoría de la morfología renal es paralela al mantenimiento de los niveles de creatinina sérica (Figura 4.29), a la disminución de la infiltración leucocitaria (Figura 4.30) y al daño en los capilares peritubulares (Figura 4.31), y se asocia a protección frente a los radicales libres de oxígeno durante la reperfusión (Figura 4.32).

En la patogénesis del daño renal por isquemia están implicados múltiples factores: alteraciones en la hemodinámica, en el metabolismo de la célula tubular, la apoptosis, la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo y la sobrecarga intracelular de calcio. En este

sentido, si bien hemos observado el efecto protector de AG490 *in vivo*, no hemos podido demostrar que éste se deba exclusivamente a los efectos sobre la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .

Sin embargo, el aumento de HIF-1 $\alpha$  inducido por AG490 podría contribuir a la nefroprotección a través de la inducción de la expresión de genes regulados por HIF-1, como OH-1, VEGF, EPO y enzimas del metabolismo de la glucosa. Así, OH-1 cataliza la conversión de hemo y ofrece citoprotección frente al daño oxidativo post isquémico. VEGF es factor de supervivencia para células endoteliales y tubulares. La EPO podría contribuir a la protección renal a través de efectos directos en la vasculatura. Las enzimas del metabolismo de la glucosa permiten la generación de energía continua en entornos hipóxicos. En definitiva, la nefroprotección por AG490 dependiente de HIF-1 $\alpha$  es una posible y atractiva explicación para los efectos observados en nuestro estudio que deberá ser analizada en futuros trabajos. Apoyando esta teoría se encuentran los resultados de Matsumoto M y Bernhardt WM que muestran efectos nefroprotectores en ratas sometidas a isquemia/reperfusión pretratadas con ClCo<sub>2</sub><sup>385</sup> y CO e inhibidores de prolil hidroxilasas<sup>386</sup> respectivamente. Estos autores demostraron así que la estabilización de HIF-1 $\alpha$  aminora la lesión isquémica del riñón en ratas a través de la inducción de la expresión de sus genes diana. HIF-2 $\alpha$  también tiene un efecto nefroprotector en la isquemia/reperfusión renal, al menos en parte mediado por expresión de genes diana de HIF como la superóxido dismutasa<sup>387</sup>.

Existían datos previos, uno en cultivo y otro *in vivo*, que sugerían el efecto protector de AG490 en la lesión de las células tubulares. Arany y sus colaboradores<sup>304</sup> demostraron que AG490 inhibía STAT3, activaba proteínas kinasas reguladas por señales extracelulares (extracelular signal-regulated protein kinase ERK) y mejoraba la supervivencia de células de túbulo proximal de ratón sometidas estrés oxidativo severo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado Yang<sup>275</sup> demostró en ratones que la administración intraperitoneal de AG490 4 horas antes de una isquemia reperfusion inhibía la fosforilación de JAK2, STAT1 y STAT3, mejoraba la función renal, atenuaba las lesiones histológicas, reducía la apoptosis tubular, e inhibía la expresión de la quimioquina MCP-1 y de moléculas de adhesión que promueven la interacción leucocito-endotelio como ICAM-1. La inhibición de la fosforilación de JAK2 es uno de los principales efectos conocidos de AG490<sup>260;285</sup> incluso cuando JAK2 se activa en respuesta a hipoxia<sup>388</sup>. La hipoxia favorece la secreción de mediadores como IL-6<sup>281;389-392</sup>, que es un conocido activador de las proteínas JAKs y sus efectores inmediatos STATs<sup>393-397</sup>.

Los efectos pleiotrópicos de AG490 sobre múltiples vías de señalización intracelular y la interacción entre estas numerosas vías, hacen posible que el efecto protector de AG490 sea debido, tanto a la inducción de HIF-1 $\alpha$  como al conjunto de actividades descritas previamente. Así por ejemplo, el efecto antiapoptótico de AG490 sobre células renales o endoteliales estresadas con agua oxigenada se puede reproducir al inhibir específicamente JAK2 mediante dominantes negativos<sup>285</sup>. Sin embargo, nuestros datos indican que el incremento de HIF-1 $\alpha$  deberá ser tenido en cuenta en la valoración del potencial terapéutico de AG490 en el daño por isquemia-reperfusión.

### 5.6. Otras aplicaciones terapéuticas de AG490

La hipoxia contribuye significativamente a la patofisiología de numerosas enfermedades humanas como el infarto de miocardio y la isquemia cerebral o periférica, el cáncer, la enfermedad cardíaca congénita y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Así, mejorar la capacidad de los órganos para tolerar el daño isquémico podría ser beneficioso en los casos de hipoxia. Los genes diana de HIF-1 son claves en esta adaptación a la hipoxia.

La inhibición de las prolin hidroxilasas y el aumento de HIF-1 $\alpha$  aumentan la expresión de EPO y de otros genes regulados por HIF-1 incluso en células bien oxigenadas. Durante los años noventa se diseñaron inhibidores de prolin hidroxilasas con el objetivo de prevenir la formación de la hidroxiprolina esencial para la estabilización de la triple hélice de colágeno. Varios compuestos de plomo mostraron capacidad para sobreexpresar el gen *Epo* en células de hepatoma Hep3B sin apenas efectos sobre *VEGF*. En concreto, el compuesto FG-4487 indujo una marcada acumulación de HIF-1 y HIF-2 en células peritubulares y tubulares de riñón y condujo a la sobreexpresión de genes dianas de HIFs en un modelo de fallo renal isquémico agudo en ratas<sup>386</sup>. La administración oral de uno de estos compuestos, FG-2216, corrigió la anemia de forma más efectiva que la darbepoetina en un modelo de inflamación en monos<sup>398</sup>. En voluntarios sanos FG-2216 aumentó de forma dosis-dependiente los niveles de hemoglobina con sólo un modesto aumento de la Epo circulante. Un estudio en fase 1 confirmó que en pacientes con enfermedad renal crónica, FG-2216 estimula la eritropoiesis de forma similar a rhEpo o darbepoetina pero con niveles plasmáticos de Epo menores<sup>399</sup>.

En el trasplante de órganos, el uso del inmunosupresor CsA está limitado por nefrotoxicidad. Algunos estudios han demostrado que la activación de HIF-1 $\alpha$  con cobalto en células tubulares renales humanas HK-2 y en modelos de rata mejoraba la arteriopatía inducida por CsA y las lesiones túbulo-intersticiales renales, reduciendo la infiltración por macrófagos, la activación de NF $\kappa$ B y la expresión de marcadores de fibrosis<sup>400</sup>. Es posible que efectos similares pudieran obtenerse tratando con AG490 u otras tirfostinas activadoras de HIF-1.

La mayor parte de la información disponible actualmente sobre el uso terapéutico de AG490 proviene del campo de la medicina cardiovascular. La ruta JAK2/STAT parece tener un importante papel en la cardioprotección asociada al preconditionamiento isquémico<sup>311</sup>. No obstante, JAK2/STAT se ha considerado un arma de doble filo en modelos de infarto de miocardio, con posibles efectos adversos o beneficiosos dependientes del sistema experimental y de la pauta de inhibición. La activación de la ruta JAK2/STAT reduce la apoptosis en la zona infartada y la inhibición de JAK2/STAT por AG490 incrementa otros mecanismos de disfunción miocárdica<sup>312</sup>. Por el contrario, la inhibición de JAK2/STAT reduce el tejido desvitalizado y disminuye el número de cardiomiocitos apoptóticos<sup>313</sup>. JAK2/STAT está implicado en el efecto antiapoptótico del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) en el miocardio isquémico y en el endotelio<sup>314</sup>. En conjunto estos datos indican que el estrés celular activa STATs y estos factores de transcripción pueden participar tanto a favor como en contra de la supervivencia celular. Así la activación del espectro completo de genes diana de HIF podría tener efectos sinérgicos a la inhibición de proteínas quinasas específicas, como JAK2, y contribuir a la protección por tirfostinas frente al preconditionamiento isquémico.

Al igual que con JAK2, la delgada línea entre el beneficio terapéutico y los efectos perjudiciales secundarios en el desarrollo de cualquier uso novedoso de HIF-1 debe estar bien definida para permitir evaluar el efecto neto. Una de las principales preocupaciones relacionadas con el uso de cualquier droga estabilizadora de HIF-1 son los efectos adversos que puedan surgir debido a la activación o supresión de los genes que regula como factor de transcripción.

Existen dudas acerca de si la expresión sostenida de HIF-1 permite la estabilización de la enfermedad renal actuando como nefroprotector o por el contrario contribuye a la fibrosis intersticial. Diversos trabajos sugieren que la activación prolongada de HIF-1 $\alpha$  en células del epitelio renal provoca fibrosis y destrucción de tejido al estimular la acumulación de colágeno y el reclutamiento de células inflamatorias en modelos experimentales de

enfermedad renal crónica. Estudios de expresión génica en biopsias de pacientes con nefropatía diabética y nefropatía IgA revelaron un aumento de la expresión de genes diana de HIF relacionados con la modulación de la matriz extracelular y profibrogénicos como el colágeno 1<sup>401;402</sup>, el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF)<sup>84</sup>, genes modificadores de la transición epitelio-mesénquima como TGF- $\beta$ 1, LOX y PAI-1<sup>403-405</sup>, el inhibidor de metaloproteinasas de la matriz TIMP-1<sup>406</sup> y al activador de plasminógeno, sugiriendo que la activación de HIF-1 estaba asociada al desarrollo de la fibrosis renal. Sin embargo, esto son datos observacionales y existen resultados que sugieren precisamente lo contrario, que la expresión de HIF-1 $\alpha$  está asociada inversamente con el avance fibrótico<sup>407</sup>.

La activación descontrolada de HIF-1 puede producir lesión glomerular. En ratones *knockout* para VHL la activación constitutiva de HIF-1 favorece la dediferenciación y proliferación de los podocitos, originando una glomerulonefritis con semilunas<sup>408</sup>.

Existen dudas sobre la posible tumorigenicidad de fármacos estabilizadores de HIF-1. La activación descontrolada y mantenida de HIF-1 podría, teóricamente, desencadenar una neoangiogénesis no deseada, o inducir o agravar una neoplasia. HIF-1 está constitutivamente expresado en muchos cánceres, particularmente los metastásicos<sup>409</sup>. La especificidad de agentes que activan HIFs podría estar basada en la inhibición diferencial de las proli hidroxilasas y/o en la activación diferencial de las tres subunidades  $\alpha$  de HIF. En la actualidad existen ensayos clínicos para evaluar la seguridad y eficacia de los activadores de HIF en diferentes tipos de anemias. Además de la inhibición de las proli hidroxilasas, la quelación de hierro activa HIF tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>23</sup>. Por otro lado las tirfostinas se han estudiado como agentes antitumorales, ya que la generación de ROS y la activación de proteínas quinasas pueden favorecer la génesis y progresión de tumores<sup>410;411</sup> y ambos procesos son dianas terapéuticas de las tirfostinas<sup>294</sup>.

Si la quelación de hierro contribuyera a la activación de HIF-1 $\alpha$  por AG490 sería necesario considerar posibles efectos adversos derivados de la depleción funcional de hierro.

La fosforilación del HIF-1 podría ser un paso crítico en la activación de HIF-1 $\alpha$  por hipoxia. Así los inhibidores de serin-treonin quinasas o de tirosinas quinasas pueden bloquear la activación de HIF-1 por hipoxia<sup>412</sup>. Teniendo en cuenta que los niveles de HIF-1 $\alpha$  estabilizados por AG490 disminuyen a partir de las 8 horas, sería conveniente analizar si AG490 modifica la ruta de degradación independiente de oxígeno y discernir si

AG490 afecta a otras formas de regulación de HIF-1 $\alpha$ . Los niveles de HIF-1 $\alpha$  obtenidos en presencia de AG490 con respecto al basal en células VHL<sup>-</sup>, donde la ruta de degradación independiente de O<sub>2</sub> es la funcional, no están modificados por lo que esta vía en principio no debería estar alterada. Sin embargo los tiempos a los que se han medido no nos permiten descartar esta posibilidad.

Estas reflexiones hacen necesaria cierta precaución a la hora de evaluar la posible utilización de AG490 como estabilizador de HIF-1 $\alpha$ . Sería preciso caracterizar bien las bases moleculares y generar moléculas que permitan diferenciar sus múltiples acciones, eligiendo la mejor para cada una de las posibles indicaciones y perfeccionando los aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos a fin de ajustar la duración y la intensidad de la activación de HIF a las necesidades terapéuticas e idealmente limitarlo a las células dianas de interés en cada patología.



***CONCLUSIONES***





1. AG490 induce la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  de modo dependiente de la concentración y del tiempo en células endoteliales, tubulares renales y de músculo liso vascular. Este efecto no es compartido por otras tirfostinas y es independiente de su acción sobre JAK2 o la GC.
2. AG490 inhibe la hidroxilación y posterior ubiquitinación y degradación vía proteasoma de la proteína HIF-1 $\alpha$ . Como resultado, AG490 alarga la vida media de HIF-1 $\alpha$ .
3. Además del incremento de HIF-1 $\alpha$ , AG490 induce su translocación al núcleo celular permitiendo la completa activación funcional de HIF-1, provocando un incremento significativo en al menos una de sus dianas, el gen para el VEGF.
4. Los experimentos en ratones apuntan al AG490 como un nuevo y prometedor agente nefroprotector en la lesión renal producida por isquemia/reperfusión.
5. Como conclusión final de este trabajo de Tesis Doctoral, recomendamos profundizar en el estudio de los mecanismos de acción del AG490 sobre HIF-1, así como continuar con la caracterización de todo su potencial terapéutico en nuevos y más ambiciosos experimentos *in vivo*.



## *BIBLIOGRAFÍA*



1. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. *Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group.* *Crit Care* 2004;8:R204-R212.
2. Molitoris BA, Levin A, Warnock DG et al. *Improving outcomes from acute kidney injury.* *J.Am.Soc.Nephrol.* 2007;18:1992-1994.
3. Kellum JA, Bellomo R, Ronco C. *Definition and classification of acute kidney injury.* *Nephron Clin.Pract.* 2008;109:c182-c187.
4. Coca SG, Peixoto AJ, Garg AX, Krumholz HM, Parikh CR. *The prognostic importance of a small acute decrement in kidney function in hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis.* *Am.J.Kidney Dis.* 2007;50:712-720.
5. Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, Garg AX, Parikh CR. *Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis.* *Am.J.Kidney Dis.* 2009;53:961-973.
6. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R et al. *Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study.* *JAMA* 2005;294:813-818.
7. Lo LJ, Go AS, Chertow GM et al. *Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease.* *Kidney Int.* 2009;76:893-899.
8. Wald R, Quinn RR, Luo J et al. *Chronic dialysis and death among survivors of acute kidney injury requiring dialysis.* *JAMA* 2009;302:1179-1185.
9. Hoste EA, Schurgers M. *Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem?* *Crit Care Med.* 2008;36:S146-S151.
10. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. *Acute renal failure.* *N.Engl.J.Med.* 1996;334:1448-1460.
11. Sheridan AM, Bonventre JV. *Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure.* *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 2000;9:427-434.
12. Kaushal GP, Basnakian AG, Shah SV. *Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure.* *Kidney Int.* 2004;66:500-506.
13. Bonventre JV, Zuk A. *Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?* *Kidney Int.* 2004;66:480-485.
14. Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. *Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure.* *Kidney Int.* 2002;62:1539-1549.
15. Yasuda H, Yuen PS, Hu X, Zhou H, Star RA. *Simvastatin improves sepsis-induced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects.* *Kidney Int.* 2006;69:1535-1542.
16. Liu KD, Brakeman PR. *Renal repair and recovery.* *Crit Care Med.* 2008;36:S187-S192.
17. Devarajan P. *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease.* *Scand.J.Clin.Lab Invest Suppl* 2008;241:89-94.
18. Kellerman PS, Clark RA, Hoilien CA, Linas SL, Molitoris BA. *Role of microfilaments in maintenance of proximal tubule structural and functional integrity.* *Am.J.Physiol* 1990;259:F279-F285.

19. Molitoris BA, Wagner MC. Surface membrane polarity of proximal tubular cells: alterations as a basis for malfunction. *Kidney Int.* 1996;49:1592-1597.
20. Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KK, Siow YL, O K. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF- $\kappa$ B. *Kidney Int.* 2002;62:1160-1170.
21. Burne-Taney MJ, Rabb H. The role of adhesion molecules and T cells in ischemic renal injury. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 2003;12:85-90.
22. Jo SK, Sung SA, Cho WY, Go KJ, Kim HK. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2006;21:1231-1239.
23. Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 1993;82:3610-3615.
24. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:5510-5514.
25. Crews ST, Fan CM. Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 1999;9:580-587.
26. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J.Biol.Chem.* 1996;271:32529-32537.
27. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am.J.Physiol* 1996;271:C1172-C1180.
28. Semenza GL, Neifelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:5680-5684.
29. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol.Cell Biol.* 1992;12:5447-5454.
30. Liu L, Simon MC. Regulation of transcription and translation by hypoxia. *Cancer Biol.Theor.* 2004;3:492-497.
31. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci.STKE.* 2005;2005:re12.
32. Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91:6496-6500.
33. Gorr TA, Cabn JD, Yamagata H, Bunn HF. Hypoxia-induced synthesis of hemoglobin in the crustacean *Daphnia magna* is hypoxia-inducible factor-dependent. *J.Biol.Chem.* 2004;279:36038-36047.
34. Liu YL, Ang SO, Weigent DA, Prchal JT, Bloomer JR. Regulation of ferrochelatase gene expression by hypoxia. *Life Sci.* 2004;75:2035-2043.
35. Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J.Biol.Chem.* 2004;279:24218-24225.

36. Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J.Biol.Chem.* 1997;272:20055-20062.
37. Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzeri A, Cairo G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J.Biol.Chem.* 1999;274:24142-24146.
38. Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J.Biol.Chem.* 1999;274:24147-24152.
39. Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J.Biol.Chem.* 2000;275:21048-21054.
40. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ.Res.* 1995;77:638-643.
41. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol.Cell Biol.* 1996;16:4604-4613.
42. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J.Biol.Chem.* 1997;272:23659-23667.
43. Elvert G, Kappel A, Heidenreich R et al. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J.Biol.Chem.* 2003;278:7520-7530.
44. Ambrosini G, Nath AK, Sierra-Honigmann MR, Flores-Riveros J. Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *J.Biol.Chem.* 2002;277:34601-34609.
45. Grosfeld A, Andre J, Hauguel-De MS et al. Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. *J.Biol.Chem.* 2002;277:42953-42957.
46. Melillo G, Musso T, Sica A et al. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J.Exp.Med.* 1995;182:1683-1693.
47. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am.J.Physiol* 1998;274:L212-L219.
48. Coulet F, Nadaud S, Agra-part M, Soubrier F. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *J.Biol.Chem.* 2003;278:46230-46240.
49. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J.Biol.Chem.* 1997;272:5375-5381.
50. Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1998;245:894-899.
51. Eckhart AD, Yang N, Xin X, Faber JE. Characterization of the alpha1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;94:9487-9492.
52. Nguyen SV, Claycomb WC. Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1999;265:382-386.



53. Cormier-Regard S, Nguyen SV, Claycomb WC. Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.* 1998;273:17787-17792.
54. Kietzmann T, Roth U, Jungermann K. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* 1999;94:4177-4185.
55. Fink T, Kazlauskas A, Poellinger L, Ebbesen P, Zachar V. Identification of a tightly regulated hypoxia-response element in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-1. *Blood* 2002;99:2077-2083.
56. Chun YS, Hyun JY, Kwak YG et al. Hypoxic activation of the atrial natriuretic peptide gene promoter through direct and indirect actions of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem.J.* 2003;370:149-157.
57. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J.Biol.Chem.* 1994;269:23757-23763.
58. Graven KK, Yu Q, Pan D, Roncarati JS, Farber HW. Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim.Biophys.Acta* 1999;1447:208-218.
59. Lu S, Gu X, Hoestje S, Epner DE. Identification of an additional hypoxia responsive element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Biochim.Biophys.Acta* 2002;1574:152-156.
60. Formenti F, Constantin-Teodosiu D, Emmanuel Y et al. Regulation of human metabolism by hypoxia-inducible factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2010;107:12722-12727.
61. Gwak GY, Yoon JH, Kim KM et al. Hypoxia stimulates proliferation of human hepatoma cells through the induction of hexokinase II expression. *J.Hepatol.* 2005;42:358-364.
62. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006;3:177-185.
63. Roth U, Curth K, Unterman TG, Kietzmann T. The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J.Biol.Chem.* 2004;279:2623-2631.
64. Obach M, Navarro-Sabate A, Caro J et al. 6-Phosphofructo-2-kinase (*pfkfb3*) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J.Biol.Chem.* 2004;279:53562-53570.
65. Fukasawa M, Tsuchiya T, Takayama E et al. Identification and characterization of the hypoxia-responsive element of the human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J.Biochem.* 2004;136:273-277.
66. Minchenko O, Opentanova I, Minchenko D, Ogura T, Esumi H. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation. *FEBS Lett.* 2004;576:14-20.
67. Gess B, Hofbauer KH, Deutzmann R, Kurtz A. Hypoxia up-regulates triosephosphate isomerase expression via a HIF-dependent pathway. *Pflugers Arch.* 2004;448:175-180.
68. Choi JH, Park MJ, Kim KW et al. Molecular mechanism of hypoxia-mediated hepatic gluconeogenesis by transcriptional regulation. *FEBS Lett.* 2005;579:2795-2801.

69. Okino ST, Chichester CH, Whitlock JP, Jr. Hypoxia-inducible mammalian gene expression analyzed *in vivo* at a TATA-driven promoter and at an initiator-driven promoter. *J.Biol.Chem.* 1998;273:23837-23843.
70. Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct *Cis*-acting sequences. *J.Biol.Chem.* 1995;270:29083-29089.
71. O'Rourke JF, Pugh CW, Bartlett SM, Ratcliffe PJ. Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1. *Eur.J.Biochem.* 1996;241:403-410.
72. Grabmaier K, Weijert MC Ad, Verhaegh GW, Schalken JA, Oostervijk E. Strict regulation of CAIX(G250/MN) by HIF-1 $\alpha$  in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene* 2004;23:5624-5631.
73. Bierl C, Voetsch B, Jin RC, Handy DE, Loscalzo J. Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression. *J.Biol.Chem.* 2004;279:26839-26845.
74. Mastuyugin V, Mezentsev A, Zhang WX et al. Promoter activity and regulation of the corneal CYP4B1 gene by hypoxia. *J.Cell Biochem.* 2004;91:1218-1238.
75. Fradette C, du SP. Hypoxia-inducible factor-1 and activator protein-1 modulate the upregulation of CYP3A6 induced by hypoxia. *Br.J.Pharmacol.* 2003;140:1146-1154.
76. Liu M, Alkayed NJ. Hypoxic preconditioning and tolerance via hypoxia inducible factor (HIF) 1 $\alpha$ -linked induction of P450 2C11 epoxide oxygenase in astrocytes. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 2005;25:939-948.
77. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* 2002;62:3387-3394.
78. Feldser D, Agami F, Iyer NV et al. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 1999;59:3915-3918.
79. Tazuke SI, Mazure NM, Sugawara J et al. Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:10188-10193.
80. Zaman K, Ryu H, Hall D et al. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. *J.Neurosci.* 1999;19:9821-9830.
81. Schaffer L, Scheid A, Spielmann P et al. Oxygen-regulated expression of TGF-beta 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation. *Placenta* 2003;24:941-950.
82. Nishi H, Nakada T, Kyo S et al. Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol.Cell Biol.* 2004;24:6076-6083.
83. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabeu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J.Biol.Chem.* 2002;277:43799-43808.
84. Higgins DF, Biju MP, Akai Y et al. Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2004;287:F1223-F1232.
85. Furuta H, Mori N, Luo L, Ryan AF. Detection of mRNA encoding guanylate cyclase A/atrial natriuretic peptide receptor in the rat cochlea by competitive polymerase chain reaction and *in situ* hybridization. *Hear.Res.* 1995;92:78-84.

86. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J.Clin.Invest* 2002;110:993-1002.
87. Miki N, Ikuta M, Matsui T. Hypoxia-induced activation of the retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha4 gene by an interaction between hypoxia-inducible factor-1 and Sp1. *J.Biol.Chem.* 2004;279:15025-15031.
88. Shoshani T, Faerman A, Mett I et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol.Cell Biol.* 2002;22:2283-2293.
89. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat.Med.* 2004;10:858-864.
90. Zagzag D, Krishnamachary B, Yee H et al. Stromal cell-derived factor-1alpha and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von Hippel-Lindau loss-of-function induces expression of a ligand and its receptor. *Cancer Res.* 2005;65:6178-6188.
91. Sun X, Wei L, Chen Q, Terek RM. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol.Cancer* 2010;9:17.
92. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J et al. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 2003;425:307-311.
93. Choi JW, Park SC, Kang GH, Liu JO, Youn HD. Nur77 activated by hypoxia-inducible factor-1alpha overproduces proopiomelanocortin in von Hippel-Lindau-mutated renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2004;64:35-39.
94. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzi M et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 2003;3:347-361.
95. Wagner KD, Wagner N, Wellmann S et al. Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor *Wt1* involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *FASEB J.* 2003;17:1364-1366.
96. Yatabe N, Kyo S, Maida Y et al. HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene* 2004;23:3708-3715.
97. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;97:9082-9087.
98. Kothari S, Cizeau J, McMillan-Ward E 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;22:4734-4744.
99. Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J.Exp.Med.* 2004;199:113-124.
100. Wykoff CC, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ. Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling. *Oncogene* 2000;19:6297-6305.
101. Zhou G, Golden T, Aragon IV, Honkanen RE. Ser/Thr protein phosphatase 5 inactivates hypoxia-induced activation of an apoptosis signal-regulating kinase 1/MKK-4/JNK signaling cascade. *J.Biol.Chem.* 2004;279:46595-46605.
102. Piret JP, Minet E, Cosse JP et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 2005;280:9336-9344.

103. Li J, Zhang X, Sejas DP, Bagby GC, Pang Q. Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J.Biol.Chem.* 2004;279:41275-41279.
104. Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK et al. Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev.* 1999;13:64-75.
105. Lofstedt T, Jogi A, Sigvardsson M et al. Induction of ID2 expression by hypoxia-inducible factor-1: a role in dedifferentiation of hypoxic neuroblastoma cells. *J.Biol.Chem.* 2004;279:39223-39231.
106. Oikawa M, Abe M, Kurosawa H et al. Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2001;289:39-43.
107. Miyazaki K, Kawamoto T, Tanimoto K et al. Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes. *J.Biol.Chem.* 2002;277:47014-47021.
108. Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, Shelley CS. Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004;101:10440-10445.
109. Paris S, Denis H, Delaive E et al. Up-regulation of 94-kDa glucose-regulated protein by hypoxia-inducible factor-1 in human endothelial cells in response to hypoxia. *FEBS Lett.* 2005;579:105-114.
110. McMabon 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;280:6561-6569.
111. Petrella BL, Lobi J, Brinckerhoff CE. Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24:1043-1052.
112. Takahashi Y, Takahashi S, Shiga Y, Yoshimi T, Miura T. Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells. *J.Biol.Chem.* 2000;275:14139-14146.
113. Metzgen E, Stiehl DP, Doege K et al. Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem.J.* 2005;387:711-717.
114. Pescador N, Cuevas Y, Naranjo S et al. Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene. *Biochem.J.* 2005;390:189-197.
115. Ema M, Taya S, Yokotani N et al. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;94:4273-4278.
116. 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.
117. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J.Appl.Physiol* 2000;88:1474-1480.
118. Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ab receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech.Dev.* 1998;73:117-123.

119. Iyer NV, Kotch LE, Agani F et al. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 1998;12:149-162.
120. Pugh CW, Tan CC, Jones RW, Ratcliffe PJ. Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:10553-10557.
121. 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;20:5197-5206.
122. Cockman ME, Masson N, Mole DR et al. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J.Biol.Chem.* 2000;275:25733-25741.
123. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* 2000;19:4298-4309.
124. Iyer NG, Ozdag H, Caldas C. p300/CBP and cancer. *Oncogene* 2004;23:4225-4231.
125. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev.* 1998;12:3320-3324.
126. Lando D, Pongratz I, Poellinger L, Whitelaw ML. A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1alpha and the HIF-like factor. *J.Biol.Chem.* 2000;275:4618-4627.
127. Maynard MA, Qi H, Chung J et al. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J.Biol.Chem.* 2003;278:11032-11040.
128. Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T et al. Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J.* 2005;19:1396-1406.
129. Makino Y, Cao R, Svensson K et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 2001;414:550-554.
130. Drutel G, Kathmann M, Heron A, Schwartz JC, Arrang JM. Cloning and selective expression in brain and kidney of ARNT2 homologous to the Ab receptor nuclear translocator (ARNT). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1996;225:333-339.
131. Hirose K, Morita M, Ema M et al. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol.Cell Biol.* 1996;16:1706-1713.
132. Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos.* 1998;26:1194-1198.
133. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001;294:1337-1340.
134. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA 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.
135. Huang LE, Pete EA, Schau M, Milligan J, Gu J. Leu-574 of HIF-1alpha is essential for the von Hippel-Lindau (VHL)-mediated degradation pathway. *J.Biol.Chem.* 2002;277:41750-41755.

136. Schofield CJ, Zhang Z. Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 1999;9:722-731.
137. 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;278:30772-30780.
138. McNeill LA, Hewitson KS, Gleadle JM et al. The use of dioxygen by HIF prolyl hydroxylase (PHD1). *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 2002;12:1547-1550.
139. Berra E, Benizri E, Ginouves A et al. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J.* 2003;22:4082-4090.
140. Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC et al. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002;99:13459-13464.
141. Elkins JM, Hewitson KS, McNeill LA et al. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1 alpha. *J.Biol.Chem.* 2003;278:1802-1806.
142. Lee C, Kim SJ, Jeong DG, Lee SM, Ryu SE. Structure of human FIH-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. *J.Biol.Chem.* 2003;278:7558-7563.
143. Kageyama Y, Koshiji M, To KK et al. Leu-574 of human HIF-1alpha is a molecular determinant of prolyl hydroxylation. *FASEB J.* 2004;18:1028-1030.
144. Baek JH, Mahon PC, Oh J et al. OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha. *Mol.Cell* 2005;17:503-512.
145. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002;111:709-720.
146. Ivan M, Kondo K, Yang H et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 2001;292:464-468.
147. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-275.
148. Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98:9630-9635.
149. Ohb M, Park CW, Ivan M et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat.Cell Biol.* 2000;2:423-427.
150. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Jr., Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:10595-10599.
151. Huang LE, Bunn HF. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J.Biol.Chem.* 2003;278:19575-19578.
152. Kondo K, Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp.Cell Res.* 2001;264:117-125.
153. Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, Kaelin WG, Jr. Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* 1995;269:1444-1446.

154. Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohb M et al. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol.Cell Biol.* 1998;18:732-741.
155. Kamura T, Koepp DM, Conrad MN et al. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 1999;284:657-661.
156. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu.Rev.Biochem.* 1998;67:425-479.
157. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu.Rev.Biochem.* 2001;70:503-533.
158. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2001;2:169-178.
159. Ciechanover A, Iwai K. The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB.Life* 2004;56:193-201.
160. Corn PG. Role of the ubiquitin proteasome system in renal cell carcinoma. *BMC.Biochem.* 2007;8 Suppl 1:S4.
161. Semple CA. The comparative proteomics of ubiquitination in mouse. *Genome Res.* 2003;13:1389-1394.
162. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millborn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J.Biol.Chem.* 2003;278:15911-15916.
163. Mekbaïl K, Khacho M, Carrigan A et al. Regulation of ubiquitin ligase dynamics by the nucleolus. *J.Cell Biol.* 2005;170:733-744.
164. Krieg M, Haas R, Brauch H et al. Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* 2000;19:5435-5443.
165. Li Z, Wang D, Messing EM, Wu G. VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1alpha. *EMBO Rep.* 2005;6:373-378.
166. Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL, Welch WJ. Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 1988;331:192-194.
167. Nandi D, Tabiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J.Biosci.* 2006;31:137-155.
168. Mabon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2001;15:2675-2686.
169. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp.Mol.Med.* 2004;36:1-12.
170. Koivunen P, Hirsila M, Remes AM et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J.Biol.Chem.* 2007;282:4524-4532.
171. Metzzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P et al. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J.Cell Sci.* 2003;116:1319-1326.
172. Flugel D, Gorlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol.Cell Biol.* 2007;27:3253-3265.

173. McCabill A, Warwicker J, Bolger GB, Houslay MD, Yarwood SJ. The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol.Pharmacol.* 2002;62:1261-1273.
174. Ceci M, Gaviraghi C, Gorrini C et al. Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 2003;426:579-584.
175. Liu YV, Semenza GL. RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle* 2007;6:656-659.
176. Liu YV, Baek JH, Zhang H et al. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol.Cell* 2007;25:207-217.
177. Liu YV, Hubbi ME, Pan F et al. Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1alpha expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *J.Biol.Chem.* 2007;282:37064-37073.
178. Koh MY, Darnay BG, Powis G. Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1alpha, leading to its oxygen-independent degradation. *Mol.Cell Biol.* 2008;28:7081-7095.
179. Koh MY, Powis G. HAF : the new player in oxygen-independent HIF-1alpha degradation. *Cell Cycle* 2009;8:1359-1366.
180. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989;246:1309-1312.
181. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309.
182. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:2576-2581.
183. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1996;15:290-298.
184. Lee J, Gray A, Yuan J et al. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:1988-1992.
185. Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:11675-11680.
186. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:548-553.
187. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, li-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:9267-9271.
188. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G et al. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 1993;8:925-931.
189. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2006;7:359-371.



190. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
191. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D et al. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J.Biol.Chem.* 1989;264:20017-20024.
192. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J.Biol.Chem.* 1998;273:30336-30343.
193. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 1998;273:13313-13316.
194. Tran J, Master Z, Yu JL et al. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002;99:4349-4354.
195. Dor Y, Porat R, Kesbet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1367-C1374.
196. Semenza GL. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu.Rev.Med.* 2003;54:17-28.
197. Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu.Rev.Biochem.* 2000;69:373-398.
198. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203-212.
199. Richardson JM, Morla AO, Wang JY. Reduction in protein tyrosine phosphorylation during differentiation of human leukemia cell line K-562. *Cancer Res.* 1987;47:4066-4070.
200. Levitzki A. Tyrophostins: tyrosine kinase blockers as novel antiproliferative agents and dissectors of signal transduction. *FASEB J.* 1992;6:3275-3282.
201. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411:355-365.
202. Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987;235:305-311.
203. Ross R. Platelet-derived growth factor. *Lancet* 1989;1:1179-1182.
204. Ben-Bassat H, Vardi DV, Gazit A et al. Tyrophostins suppress the growth of psoriatic keratinocytes. *Exp.Dermatol.* 1995;4:82-88.
205. Elder JT, Fisher GJ, Lindquist PB et al. Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. *Science* 1989;243:811-814.
206. Vassar R, Fuchs E. Transgenic mice provide new insights into the role of TGF-alpha during epidermal development and differentiation. *Genes Dev.* 1991;5:714-727.
207. Schlessinger J, Lemmon MA. Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first robin of spring. *Cell* 2006;127:45-48.
208. Umezawa H, Imoto M, Sawa T et al. Studies on a new epidermal growth factor-receptor kinase inhibitor, erbstatin, produced by MH435-bF3. *J.Antibiot.(Tokyo)* 1986;39:170-173.
209. Gazit A, Yaish P, Gilon C, Levitzki A. Tyrophostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J.Med.Chem.* 1989;32:2344-2352.
210. Gazit A, Osherov N, Posner I et al. Tyrophostins. 2. Heterocyclic and alpha-substituted benzylidenemalononitrile tyrophostins as potent inhibitors of EGF receptor and ErbB2/neu tyrosine kinases. *J.Med.Chem.* 1991;34:1896-1907.

211. Yaish P, Gazit A, Gilon C, Levitzki A. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science* 1988;242:933-935.
212. Anafi M, Gazit A, Gilon C, Ben-Neriah Y, Levitzki A. Selective interactions of transforming and normal *abl* proteins with ATP, tyrosine-copolymer substrates, and tyrphostins. *J.Biol.Chem.* 1992;267:4518-4523.
213. Wong SK, Garbers DL. Receptor guanylyl cyclases. *J.Clin.Invest* 1992;90:299-305.
214. Singh S, Lowe DG, Thorpe DS et al. Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases. *Nature* 1988;334:708-712.
215. Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R et al. Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO J.* 1989;8:1377-1384.
216. Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG. Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol.Cell Biol.* 1991;11:3454-3462.
217. Li Z, Goy MF. Peptide-regulated guanylate cyclase pathways in rat colon: in situ localization of GCA, GCC, and guanylin mRNA. *Am.J.Physiol* 1993;265:G394-G402.
218. Furuta GT, Turner JR, Taylor CT et al. Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J.Exp.Med.* 2001;193:1027-1034.
219. Vollmar AM, Schmidt KN, Schulz R. Natriuretic peptide receptors on rat thymocytes: inhibition of proliferation by atrial natriuretic peptide. *Endocrinology* 1996;137:1706-1713.
220. Jankowski M, Reis AM, Mukaddam-Daher S et al. C-type natriuretic peptide and the guanylyl cyclase receptors in the rat ovary are modulated by the estrous cycle. *Biol.Reprod.* 1997;56:59-66.
221. Chang MS, Lowe DG, Lewis M et al. Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature* 1989;341:68-72.
222. Ohyama Y, Miyamoto K, Saito Y et al. Cloning and characterization of two forms of C-type natriuretic peptide receptor in rat brain. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1992;183:743-749.
223. Chrisman TD, Schulz S, Potter LR, Garbers DL. Seminal plasma factors that cause large elevations in cellular cyclic GMP are C-type natriuretic peptides. *J.Biol.Chem.* 1993;268:3698-3703.
224. Okamoto T, Katada T, Murayama Y et al. A simple structure encodes G protein-activating function of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor. *Cell* 1990;62:709-717.
225. Okamoto T, Nishimoto I. Analysis of stimulation-G protein subunit coupling by using active insulin-like growth factor II receptor peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:8020-8023.
226. Ramirez I, Tebar F, Grau M, Soley M. Role of heterotrimeric G-proteins in epidermal growth factor signalling. *Cell Signal.* 1995;7:303-311.
227. Krieger-Brauer HI, Medda PK, Kather H. Insulin-induced activation of NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in human adipocyte plasma membranes is mediated by Galphai2. *J.Biol.Chem.* 1997;272:10135-10143.
228. Takida S, Elmquist BJ, Trachte GJ. C-type natriuretic peptide attenuates evoked dopamine efflux by influencing G $\alpha$ lpha. *Hypertension* 1999;33:124-129.
229. Murthy KS, Makhlouf GM. Differential regulation of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in smooth muscle by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Inhibitory*

- phosphorylation of PLA2 by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. J.Biol.Chem. 1998;273:34519-34526.*
230. Murthy KS, Makhlouf GM. Identification of the G protein-activating domain of the natriuretic peptide clearance receptor (NPR-C). *J.Biol.Chem. 1999;274:17587-17592.*
231. Koller KJ, de Sauvage FJ, Lowe DG, Goeddel DV. Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol.Cell Biol. 1992;12:2581-2590.*
232. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science 1988;241:42-52.*
233. Potter LR, Hunter T. Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Mol.Cell Biol. 1998;18:2164-2172.*
234. Laura RP, Hurley JB. The kinase homology domain of retinal guanylyl cyclases 1 and 2 specifies the affinity and cooperativity of interaction with guanylyl cyclase activating protein-2. *Biochemistry 1998;37:11264-11271.*
235. Chinkers M, Singh S, Garbers DL. Adenine nucleotides are required for activation of rat atrial natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase expressed in a baculovirus system. *J.Biol.Chem. 1991;266:4088-4093.*
236. Jewett JR, Koller KJ, Goeddel DV, Lowe DG. Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase. *EMBO J. 1993;12:769-777.*
237. Kamisaki Y, Sabeki S, Nakane M et al. Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J.Biol.Chem. 1986;261:7236-7241.*
238. Craven PA, DeRubertis FR. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and heme proteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J.Biol.Chem. 1978;253:8433-8443.*
239. Gerzger R, Radany EW, Garbers DL. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. *Biochem.Biophys.Res.Comm. 1982;108:678-686.*
240. Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wolin MS. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim.Biophys.Acta 1982;718:49-59.*
241. Ohlstein EH, Wood KS, Ignarro LJ. Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch.Biochem.Biophys. 1982;218:187-198.*
242. Braughler JM, Mittal CK, Murad F. Purification of soluble guanylate cyclase from rat liver. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1979;76:219-222.*
243. Garbers DL. Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. *J.Biol.Chem. 1979;254:240-243.*
244. Lenicki JA, Brandwein HJ, Waldman SA, Murad F. Purified guanylate cyclase: characterization, iodination and preparation of monoclonal antibodies. *J.Cyclic.Nucleotide.Res. 1980;6:283-296.*
245. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol.Rev. 2000;52:375-414.*

246. Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol.Rev.* 1987;39:163-196.
247. Beasley D, Schwartz JH, Brenner BM. Interleukin 1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *J.Clin.Invest* 1991;87:602-608.
248. Jaleel M, Shenoy AR, Visweswariah SS. Tyrphostins are inhibitors of guanylyl and adenylyl cyclases. *Biochemistry* 2004;43:8247-8255.
249. Terada H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ.Health Perspect.* 1990;87:213-218.
250. Ozaki S, Kano K, Shirai O. Electrochemical elucidation on the mechanism of uncoupling caused by hydrophobic weak acids. *Phys.Chem.Chem.Phys.* 2008;10:4449-4455.
251. Sagara Y, Ishige K, Tsai C, Maher P. Tyrphostins protect neuronal cells from oxidative stress. *J.Biol.Chem.* 2002;277:36204-36215.
252. Young SW, Poole RC, Hudson AT et al. Effects of tyrosine kinase inhibitors on protein kinase-independent systems. *FEBS Lett.* 1993;316:278-282.
253. Soltoff SP. Evidence that tyrphostins AG10 and AG18 are mitochondrial uncouplers that alter phosphorylation-dependent cell signaling. *J.Biol.Chem.* 2004;279:10910-10918.
254. Nabrstedt A, Albrecht M, Wray V et al. Structures of compounds with antigonadotropic activity obtained by *in vitro* oxidation of caffeic acid. *Planta Med.* 1990;56:395-398.
255. Ramdas L, McMurray JS, Budde RJ. The degree of inhibition of protein tyrosine kinase activity by tyrphostin 23 and 25 is related to their instability. *Cancer Res.* 1994;54:867-869.
256. Turpaev K, Drapier JC. Stimulatory effect of benzylidenemalononitrile tyrphostins on expression of NO-dependent genes in U-937 monocytic cells. *Eur.J.Pharmacol.* 2009;606:1-8.
257. Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 1995;267:1782-1788.
258. Dadi H, Ke S, Roifman CM. Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by ligation of the interleukin-7 receptor is dependent on protein tyrosine kinase activity. *Blood* 1994;84:1579-1586.
259. Sharfe N, Dadi HK, Roifman CM. JAK3 protein tyrosine kinase mediates interleukin-7-induced activation of phosphatidylinositol-3' kinase. *Blood* 1995;86:2077-2085.
260. Meydan N, Grunberger T, Dadi H et al. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 1996;379:645-648.
261. Zilberman Y, Gutman Y. Multiple effects of staurosporine, a kinase inhibitor, on thymocyte functions. Comparison with the effect of tyrosine kinase inhibitors. *Biochem.Pharmacol.* 1992;44:1563-1568.
262. Schneider H, Cohen-Dayag A, Pecht I. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma 1 couples the Fc epsilon receptor mediated signal to mast cells secretion. *Int.Immunol.* 1992;4:447-453.
263. Knox KA, Gordon J. Protein tyrosine phosphorylation is mandatory for CD40-mediated rescue of germinal center B cells from apoptosis. *Eur.J.Immunol.* 1993;23:2578-2584.

264. Caceres-Cortes J, Rajotte D, Dumouchel J, Haddad P, Hoang T. Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J.Biol.Chem.* 1994;269:12084-12091.
265. Osberov N, Levitzki A. Tyrphostin AG 494 blocks Cdk2 activation. *FEBS Lett.* 1997;410:187-190.
266. Ruetten H, Thiemermann C. Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase. *Br.J.Pharmacol.* 1997;122:59-70.
267. Nielsen M, Kaltoft K, Nordahl M et al. Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides: tyrphostin AG490 inhibits Stat3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;94:6764-6769.
268. Kirken RA, Erwin RA, Taub D et al. Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated JAK3/STAT5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T cells. *J.Leukoc.Biol.* 1999;65:891-899.
269. De VJ, Jourdan M, Tarte K, Jasmin C, Klein B. JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *Br.J.Haematol.* 2000;109:823-828.
270. Eriksen KW, Kaltoft K, Mikkelsen G et al. Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor expression and growth of leukemic Sezary cells. *Leukemia* 2001;15:787-793.
271. Miyamoto N, Sugita K, Goi K et al. The JAK2 inhibitor AG490 predominantly abrogates the growth of human B-precursor leukemic cells with 11q23 translocation or Philadelphia chromosome. *Leukemia* 2001;15:1758-1768.
272. Arbel R, Rojansky N, Klein BY et al. Inhibitors that target protein kinases for the treatment of ovarian carcinoma. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2003;188:1283-1290.
273. Walrafen P, Verdier F, Kadri Z et al. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 2005;105:600-608.
274. Huang C, Cao J, Huang KJ et al. Inhibition of STAT3 activity with AG490 decreases the invasion of human pancreatic cancer cells in vitro. *Cancer Sci.* 2006;97:1417-1423.
275. Yang N, Luo M, Li R et al. Blockage of JAK/STAT signalling attenuates renal ischaemia-reperfusion injury in rat. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2008;23:91-100.
276. Gorina R, Petegnief V, Chamorro A, Planas AM. AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway. *J.Neurochem.* 2005;92:505-518.
277. Krolewski JJ, Lee R, Eddy R, Shows TB, Dalla-Favera R. Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene* 1990;5:277-282.
278. Harpur AG, Andres AC, Ziemiecki A, Aston RR, Wilks AF. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* 1992;7:1347-1353.
279. Rane SG, Reddy EP. JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene* 1994;9:2415-2423.
280. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu.Rev.Immunol.* 1998;16:293-322.

281. Hartmann JT, Haap M, Kopp HG, Lipp HP. Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr. Drug Metab* 2009;10:470-481.
282. Wan HL, Yao NS. Acute renal failure associated with gefitinib therapy. *Lung* 2006;184:249-250.
283. Foringer JR, Verani RR, Tjia VM et al. Acute renal failure secondary to imatinib mesylate treatment in prostate cancer. *Ann. Pharmacother.* 2005;39:2136-2138.
284. Pou M, Saval N, Vera M et al. Acute renal failure secondary to imatinib mesylate treatment in chronic myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2003;44:1239-1241.
285. Neria F, Castilla MA, Sanchez RF et al. Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity. *Kidney Int.* 2009;75:227-234.
286. McDonald M, Abdelrahman M, Cuzzocrea S, Thiemermann C. Tyrphostin reduces the organ injury in haemorrhagic shock: role of inducible nitric oxide synthase. *Resuscitation* 2003;58:349-361.
287. Dimitrova P, Gyurkovska V, Shalova I, Saso L, Ivanovska N. Inhibition of zymosan-induced kidney dysfunction by tyrphostin AG-490. *J. Inflamm. (Lond)* 2009;6:13.
288. Novogrodsky A, Vanichkin A, Patya M et al. Prevention of lipopolysaccharide-induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors. *Science* 1994;264:1319-1322.
289. Bright JJ, Du C, Sriram S. Tyrphostin B42 inhibits IL-12-induced tyrosine phosphorylation and activation of Janus kinase-2 and prevents experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 1999;162:6255-6262.
290. Severgnini M, Takahashi S, Tu P et al. Inhibition of the Src and Jak kinases protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 2005;171:858-867.
291. Dugo L, Chatterjee PK, Mazzon E et al. The tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG 126 reduces the multiple organ failure induced by zymosan in the rat. *Intensive Care Med.* 2002;28:775-788.
292. Levitzki A. Tyrphostins--potential antiproliferative agents and novel molecular tools. *Biochem. Pharmacol.* 1990;40:913-918.
293. Wang LH, Kirken RA, Erwin RA, Yu CR, Farrar WL. JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *J. Immunol.* 1999;162:3897-3904.
294. Gorina R, Sanfelix C, Galito A, Messegue A, Planas AM. Exposure of glia to pro-oxidant agents revealed selective Stat1 activation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Jak2-independent antioxidant features of the Jak2 inhibitor AG490. *Glia* 2007;55:1313-1324.
295. Gamett DC, Pearson G, Cerione RA, Friedberg I. Secondary dimerization between members of the epidermal growth factor receptor family. *J. Biol. Chem.* 1997;272:12052-12056.
296. Bowers G, Reardon D, Hewitt T et al. The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20:1388-1397.
297. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996;379:557-560.
298. Vanichkin A, Patya M, Gazit A, Levitzki A, Novogrodsky A. Late administration of a lipophilic tyrosine kinase inhibitor prevents lipopolysaccharide and Escherichia coli-induced lethal toxicity. *J. Infect. Dis.* 1996;173:927-933.

299. Volberg T, Bershadsky AD, Elbaum M et al. Disruption of microtubules in living cells by tyrphostin AG-1714. *Cell Motil.Cytoskeleton* 2000;45:223-234.
300. Chatterjee PK. Pleiotropic renal actions of erythropoietin. *Lancet* 2005;365:1890-1892.
301. Novogrodsky A, Weisspapir M, Patya M, Meshorer A, Vanichkin A. Tyrphostin 4-nitrobenzylidene malononitrile reduces chemotherapy toxicity without impairing efficacy. *Cancer Res.* 1998;58:2397-2403.
302. Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, Tanaka S, Safirstein RL. Activation of ERK or inhibition of JNK ameliorates H(2)O(2) cytotoxicity in mouse renal proximal tubule cells. *Kidney Int.* 2004;65:1231-1239.
303. Arany I, Megyesi JK, Reusch JE, Safirstein RL. CREB mediates ERK-induced survival of mouse renal tubular cells after oxidant stress. *Kidney Int.* 2005;68:1573-1582.
304. Arany I, Megyesi JK, Nelkin BD, Safirstein RL. STAT3 attenuates EGFR-mediated ERK activation and cell survival during oxidant stress in mouse proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2006;70:669-674.
305. Breyer MD, Redha R, Breyer JA. Segmental distribution of epidermal growth factor binding sites in rabbit nephron. *Am.J.Physiol* 1990;259:F553-F558.
306. di Mari JF, Davis R, Safirstein RL. MAPK activation determines renal epithelial cell survival during oxidative injury. *Am.J.Physiol* 1999;277:F195-F203.
307. Andreucci M, Michael A, Kramers C et al. Renal ischemia/reperfusion and ATP depletion/repletion in LLC-PK(1) cells result in phosphorylation of FKHR and FKHRL1. *Kidney Int.* 2003;64:1189-1198.
308. Nakajima H, Takenaka M, Kaimori JY et al. Activation of the signal transducer and activator of transcription signaling pathway in renal proximal tubular cells by albumin. *J.-Am.Soc.Nephrol.* 2004;15:276-285.
309. Sandberg EM, Sayeski PP. Jak2 tyrosine kinase mediates oxidative stress-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 2004;279:34547-34552.
310. Yadav A, Kalita A, Dhillon S, Banerjee K. JAK/STAT3 pathway is involved in survival of neurons in response to insulin-like growth factor and negatively regulated by suppressor of cytokine signaling-3. *J.Biol.Chem.* 2005;280:31830-31840.
311. Hattori R, Maulik N, Otani H et al. Role of STAT3 in ischemic preconditioning. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2001;33:1929-1936.
312. El-Adawi H, Deng L, Tramontano A et al. The functional role of the JAK-STAT pathway in post-infarction remodeling. *Cardiovasc.Res.* 2003;57:129-138.
313. Mascareno E, El-Shafei M, Maulik N et al. JAK/STAT signaling is associated with cardiac dysfunction during ischemia and reperfusion. *Circulation* 2001;104:325-329.
314. Harada M, Qin Y, Takano H et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat.Med.* 2005;11:305-311.
315. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2004;66:486-491.
316. Chang YJ, Holtzman MJ, Chen CC. Differential role of Janus family kinases (JAKs) in interferon-gamma-induced lung epithelial ICAM-1 expression: involving protein interactions between JAKs, phospholipase Cgamma, c-Src, and STAT1. *Mol.Pharmacol.* 2004;65:589-598.

317. Haller H, Dragun D, Miethke A et al. Antisense oligonucleotides for ICAM-1 attenuate reperfusion injury and renal failure in the rat. *Kidney Int.* 1996;50:473-480.
318. Kelly KJ, Williams WW, Jr., Colvin RB, Bonventre JV. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91:812-816.
319. Alvarez-Arroyo MV, Yague S, Wenger RM et al. Cyclophilin-mediated pathways in the effect of cyclosporin A on endothelial cells: role of vascular endothelial growth factor. *Circ.Res.* 2002;91:202-209.
320. Lopez-Ongil S, Hernandez-Perera O, Navarro-Antolin J et al. Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *Br.J.Pharmacol.* 1998;124:447-454.
321. Allen DA, Harwood S, Varagunam M, Raftery MJ, Yaqoob MM. High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases. *FASEB J.* 2003;17:908-910.
322. Castilla MA, Caramelo C, Gazapo RM et al. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in endothelial cell protection against cytotoxic agents. *Life Sci.* 2000;67:1003-1013.
323. Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, Price PM, Safirstein RL. Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2004;287:F543-F549.
324. Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K et al. EGFR inhibitor enhances cisplatin sensitivity of oral squamous cell carcinoma cell lines. *Pathol.Oncol.Res.* 2008;14:39-43.
325. Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Cavenee WK, Huang HJ. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:5724-5729.
326. Salabudeen AK, Haider N, Jenkins J et al. Antiapoptotic properties of erythropoiesis-stimulating proteins in models of cisplatin-induced acute kidney injury. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2008;294:F1354-F1365.
327. Eckardt KU. Anaemia in end-stage renal disease: pathophysiological considerations. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2001;16 Suppl 7:2-8.
328. Wiesener MS, Seyfarth M, Warnecke C et al. Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel-Lindau gene in a renal cell carcinoma. *Blood* 2002;99:3562-3565.
329. Poellinger L, Johnson RS. HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2004;14:81-85.
330. Fink MP. Pathophysiology of intensive care unit-acquired anemia. *Crit Care* 2004;8 Suppl 2:S9-10.
331. Kakinuma Y, Miyauchi T, Yuki K et al. Novel molecular mechanism of increased myocardial endothelin-1 expression in the failing heart involving the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1alpha induced for impaired myocardial energy metabolism. *Circulation* 2001;103:2387-2394.
332. Schultz A, Lavie L, Hochberg I et al. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* 1999;100:547-552.



333. Li J, Post M, Volk R et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat.Med.* 2000;6:49-55.
334. Caramelo C, Justo S, Gil P. [Anemia in heart failure: pathophysiology, pathogenesis, treatment, and incognitae]. *Rev.Esp.Cardiol.* 2007;60:848-860.
335. Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur.J.Neurosci.* 1999;11:4159-4170.
336. Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am.J.Pathol.* 2000;156:965-976.
337. Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *Eur.J.Surg.Oncol.* 2004;30:465-468.
338. Kanno H, Kondo K, Ito S et al. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic central nervous system hemangioblastomas. *Cancer Res.* 1994;54:4845-4847.
339. Gnarr JR, Tory K, Weng Y et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat.Genet.* 1994;7:85-90.
340. Choi HJ, Song BJ, Gong YD, Gwak WJ, Soh Y. Rapid degradation of hypoxia-inducible factor-1alpha by KRH102053, a new activator of prolyl hydroxylase 2. *Br.J.Pharmacol.* 2008
341. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J.Mol.Med.* 1999;77:527-543.
342. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:905-909.
343. Ozaki H, Yu AY, Della N et al. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1999;40:182-189.
344. Vuorela P, Helske S, Hornig C et al. Amniotic fluid-soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in preeclampsia. *Obstet.Gynecol.* 2000;95:353-357.
345. Michaud SE, Menard C, Guy LG, Gennaro G, Rivard A. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1alpha/VEGF pathway. *FASEB J.* 2003;17:1150-1152.
346. Chin BY, Jiang G, Wegiel B et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007;104:5109-5114.
347. Sen CK, Khanna S, Babior BM et al. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J.Biol.Chem.* 2002;277:33284-33290.
348. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J.Clin.Invest* 1973;52:2745-2756.
349. Picciano PT, Johnson B, Walenga RW et al. Effects of D-valine on pulmonary artery endothelial cell morphology and function in cell culture. *Exp.Cell Res.* 1984;151:134-147.
350. Lopez FA, Riesco A, Espinosa G et al. Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation* 1993;88:1166-1171.

351. Campbell JH, Campbell GR. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle. *Clin.Sci.(Lond)* 1993;85:501-513.
352. Holifield B, Helgason T, Jemelka S et al. Differentiated vascular myocytes: are they involved in neointimal formation? *J.Clin.Invest* 1996;97:814-825.
353. Tejedor A, Noel J, Vinay P, Boulanger Y, Gougoux A. Characterization and metabolism of canine proximal tubules, thick ascending limbs, and collecting ducts in suspension. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 1988;66:997-1009.
354. Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A, Bosca L. Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2000;11:2315-2323.
355. Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH et al. Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J.Cell Biol.* 1988;107:1359-1368.
356. Calzada MJ, Esteban MA, Feijoo-Cuaresma M et al. von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates the assembly of intercellular junctions in renal cancer cells through hypoxia-inducible factor-independent mechanisms. *Cancer Res.* 2006;66:1553-1560.
357. Tanfik A, Jin L, Banes-Berceli AK et al. Hyperglycemia and reactive oxygen species mediate apoptosis in aortic endothelial cells through Janus kinase 2. *Vascul.Pharmacol.* 2005;43:320-326.
358. Neria F, Caramelo C, Peinado H et al. Mechanisms of endothelial cell protection by blockade of the JAK2 pathway. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2007;292:C1123-C1131.
359. Gao W, Ferguson G, Connell P et al. High glucose concentrations alter hypoxia-induced control of vascular smooth muscle cell growth via a HIF-1 $\alpha$ -dependent pathway. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2007;42:609-619.
360. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 1989;17:6419.
361. Sivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V, Bickenbach J, Schatteman GC. CD34+ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *J.Vasc.Res.* 2003;40:368-377.
362. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H et al. The *fms*-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991.
363. Olmeda D, Castel S, Vilaro S, Cano A. Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol.Biol.Cell* 2003;14:2844-2860.
364. Obrig TG, Culp WJ, McKeegan WL, Hardesty B. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J.Biol.Chem.* 1971;246:174-181.
365. DeMaio L, Chang YS, Gardner TW, Tarbell JM, Antonetti DA. Shear stress regulates occludin content and phosphorylation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2001;281:H105-H113.
366. Goldkorn T, Balaban N, Matsukuma K et al. EGF-Receptor phosphorylation and signaling are targeted by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redox stress. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1998;19:786-798.
367. Tang H, Kerins DM, Hao Q, Inagami T, Vaughan DE. The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of

- mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. J.Biol.Chem. 1998;273:18268-18272.*
368. He P, Zeng M, Curry FE. cGMP modulates basal and activated microvessel permeability independently of  $[Ca^{2+}]_i$ . *Am.J.Physiol* 1998;274:H1865-H1874.
369. Saitoh T, Nakayama M, Nakano H et al. TWEAK induces NF- $\kappa$ B p100 processing and long lasting NF- $\kappa$ B activation. *J.Biol.Chem.* 2003;278:36005-36012.
370. Sanz AB, Justo P, Sanchez-Nino MD et al. The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2008;19:695-703.
371. Olmos G, Arenas MI, Bienes R et al. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin-J(2) reveals a new pVHL-independent, lysosomal-dependent mechanism of HIF-1 $\alpha$  degradation. *Cell Mol.Life Sci.* 2009;66:2167-2180.
372. Deudero JJ, Caramelo C, Castellanos MC et al. Induction of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene expression by vascular endothelial growth factor. Role of a superoxide-mediated mechanism. *J.Biol.Chem.* 2008
373. Choi SM, Choi KO, Lee N, Oh M, Park H. The zinc chelator, N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine, increases the level of nonfunctional HIF-1 $\alpha$  protein in normoxic cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2006;343:1002-1008.
374. Choi SM, Choi KO, Park YK et al. Clioquinol, a Cu(II)/Zn(II) chelator, inhibits both ubiquitination and asparagine hydroxylation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , leading to expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin in normoxic cells. *J.Biol.Chem.* 2006;281:34056-34063.
375. Schneider C, Krischke G, Keller S et al. Short-term effects of pharmacologic HIF stabilization on vasoactive and cytotoxic factors in developing mouse brain. *Brain Res.* 2009;1280:43-51.
376. Spinella F, Rosano L, Di C, V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in ovarian carcinoma cells. *J.Biol.Chem.* 2002;277:27850-27855.
377. Kivirikko KI, Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix Biol.* 1998;16:357-368.
378. Bickel M, Baringhaus KH, Gerl M et al. Selective inhibition of hepatic collagen accumulation in experimental liver fibrosis in rats by a new prolyl 4-hydroxylase inhibitor. *Hepatology* 1998;28:404-411.
379. Hanauke-Abel HM. Prolyl 4-hydroxylase, a target enzyme for drug development. Design of suppressive agents and the in vitro effects of inhibitors and proinhibitors. *J.Hepatol.* 1991;13 Suppl 3:S8-15.
380. Nwogu JI, Geenen D, Bean M et al. Inhibition of collagen synthesis with prolyl 4-hydroxylase inhibitor improves left ventricular function and alters the pattern of left ventricular dilatation after myocardial infarction. *Circulation* 2001;104:2216-2221.
381. Warnecke C, Griethe W, Weidemann A et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors. *FASEB J.* 2003;17:1186-1188.
382. Nangaku M, Izuhara Y, Takizawa S et al. A novel class of prolyl hydroxylase inhibitors induces angiogenesis and exerts organ protection against ischemia. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2007;27:2548-2554.

383. Tanaka T, Kojima I, Ohse T et al. Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model. *Lab Invest* 2005;85:1292-1307.
384. Bergeron M, Gidday JM, Yu AY et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann.Neurol.* 2000;48:285-296.
385. Matsumoto M, Makino Y, Tanaka T et al. Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2003;14:1825-1832.
386. Bernhardt WM, Campean V, Kany S et al. Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2006;17:1970-1978.
387. Kojima I, Tanaka T, Inagi R et al. Protective role of hypoxia-inducible factor-2alpha against ischemic damage and oxidative stress in the kidney. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2007;18:1218-1226.
388. Wang GS, Qian GS, Zhou DS, Zhao JQ. JAK-STAT signaling pathway in pulmonary arterial smooth muscle cells is activated by hypoxia. *Cell Biol.Int.* 2005;29:598-603.
389. Kotake-Nara E, Takizawa S, Quan J, Wang H, Saida K. Cobalt chloride induces neurite outgrowth in rat pheochromocytoma PC-12 cells through regulation of endothelin-2/ vasoactive intestinal contractor. *J.Neurosci.Res.* 2005;81:563-571.
390. Ohata T, Sawa Y, Ohtake S et al. [Evaluation of cerebral circulation during cardiopulmonary bypass using near-infrared spectroscopy]. *Jpn.J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1998;46:603-609.
391. Tamm M, Bibl M, Eickelberg O et al. Hypoxia-induced interleukin-6 and interleukin-8 production is mediated by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor in primary human lung cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1998;19:653-661.
392. Yan SF, Tritto I, Pinsky D et al. Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6. *J.Biol.Chem.* 1995;270:11463-11471.
393. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem.J.* 2003;374:1-20.
394. Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002;3:651-662.
395. Saura M, Zaragoza C, Bao C et al. Stat3 mediates interleukin-6 [correction of interelukin-6] inhibition of human endothelial nitric-oxide synthase expression. *J.Biol.Chem.* 2006;281:30057-30062.
396. Severgnini M, Takahashi S, Rozo LM et al. Activation of the STAT pathway in acute lung injury. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2004;286:L1282-L1292.
397. Vinkemeier U. Getting the message across, STAT! Design principles of a molecular signaling circuit. *J.Cell Biol.* 2004;167:197-201.
398. Hsieh MM, Linde NS, Wynter A et al. HIF prolyl hydroxylase inhibition results in endogenous erythropoietin induction, erythrocytosis, and modest fetal hemoglobin expression in rhesus macaques. *Blood* 2007;110:2140-2147.
399. Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P et al. Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2010;21:2151-2156.
400. Oh SW, Ahn JM, Lee YM et al. Activation of hypoxia-inducible factor by cobalt is associated with the attenuation of tissue injury and apoptosis in cyclosporine-induced nephropathy. *Tohoku J.Exp.Med.* 2012;226:197-206.

401. Falanga V, Zhou L, Yufit T. Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1. *J.Cell Physiol* 2002;191:42-50.
402. Saed GM, Zhang W, Chegini N, Holmdahl L, Diamond MP. Alteration of type I and III collagen expression in human peritoneal mesothelial cells in response to hypoxia and transforming growth factor-beta1. *Wound.Repair Regen.* 1999;7:504-510.
403. Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol.Life Sci.* 2006;63:2304-2316.
404. Haase VH. The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney Int.* 2006;69:1302-1307.
405. Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz, Olmeda D et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* 2005;24:3446-3458.
406. Orphanides C, Fine LG, Norman JT. Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a TGF-beta1-independent mechanism. *Kidney Int.* 1997;52:637-647.
407. Hung TW, Liou JH, Yeh KT et al. Renal expression of hypoxia inducible factor-1alpha in patients with chronic kidney disease: a clinicopathologic study from nephrectomized kidneys. *Indian J.Med.Res.* 2013;137:102-110.
408. Ding M, Cui S, Li C et al. Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat.Med.* 2006;12:1081-1087.
409. Ang SO, Chen H, Hirota K et al. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat.Genet.* 2002;32:614-621.
410. Gupta A, Rosenberger SF, Bowden GT. Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines. *Carcinogenesis* 1999;20:2063-2073.
411. Irani K, Xia Y, Zweier JL et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997;275:1649-1652.
412. Wang GL, Jiang BH, Semenza GL. Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995;216:669-675.