



UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Artículo de

# ALTERACIONES FISIOPATOLÓGICAS POR HIPOXIA

## RESUMEN:

Frente a estados de hipoxia nuestro organismo emite diferentes respuestas con el fin de reducir al mínimo el daño causado por la hipoxia, uno de los más conocidos es la activación del factor transcripcional inducido por hipoxia -1 (HIF-1), el cual es degradado e inactivado en estados de normoxia. El elemento principal de organización del sistema regulador es un factor de transcripción específico, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en presencia de oxígeno, la subunidad  $\alpha$  del HIF-1 (HIF-1 $\alpha$ ) se modifica por las hidroxilasas, que constituyen el punto central del mecanismo sensor, induciendo su catabolismo por el proteosoma.

Otra adaptación que se menciona es la circulatoria consiste en aumento del número y tamaño de los capilares de los tejidos, lo que se llama aumento de la vascularización. En los tejidos muy activos sometidos a una hipoxia crónica es especialmente notable el aumento de la vascularización, la hipertensión se produce por vasoconstricción pulmonar a causa de la baja concentración de oxígeno).

En recientes estudios se plantea la teoría del papel que cumplen los macrófagos en la respuesta a hipoxia. Aunque los macrófagos rutinariamente ayudan en el volumen de demanda de célula normal y en contra de la invasión de patógenos, es sólo cuando los tejidos son dañados por la enfermedad es que los macrófagos muestran su gran gama funcional, y el acto reaccionar ante muchos aspectos de inflamación subaguda y crónica y el proceso de curación. El tejido enfermo se diferencia del tejido sano de varios modos, en gran parte en la interrupción a microvasculatura normal necesariamente implicado por el daño de tejido.

Los macrófagos son capaces de funcionar en la hipoxia y demuestran una gama versátil de respuestas, incluyendo alteraciones en la morfología y marcadores superficiales, adaptaciones en la actividad metabólica, y el aumento de la producción de factores de crecimiento y citocinas. Las respuestas de macrófago a la hipoxia promueven la acumulación, la supervivencia y la activación de macrófagos y otros leucocitos en sitios de lesión, y estimulan neovascularización para reestablecer la perfusión y la oxigenación de tejido. Esta serie de acontecimientos es evidente en la cicatrización y tumores sólidos.



**Palabras claves:**

*Hipoxia, Normoxia, Factor inducido por hipoxia - 1(HIF-1), sensor de oxígeno, Isquemia, Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Cuerpos carotideos, Cuerpos neuroepiteliales, Macrofagos, IL (interleucina)*

## 1. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos pueden censar concentraciones de oxígeno y responden a la hipoxia con cambios inmediatos y cambios adaptativos en la expresión de genes. El gran cuerpo de los mamíferos necesita desarrollar múltiples y complejos sistemas fisiológicos para asegurar el adecuado suministro de O<sub>2</sub> a todas las células bajo condiciones normales. El regulador transcripcional “Factor Inducido por Hipoxia - 1” (HIF-1) es un mediador esencial de la homeostasis del O<sub>2</sub>. HIF-1 es requerido para el mantenimiento de los sistemas fisiológicos claves durante el desarrollo y su subsiguiente utilización en la vida fetal y postnatal. Al parecer HIF-1 también juega un papel importante en la fisiopatología del cáncer, enfermedad cardiovascular, y enfermedad cónica del pulmón, las cuales representan las mayores causas de mortalidad de las sociedades industrializadas; es así que la modulación genética o farmacológica de la actividad del HIF-1 in vivo puede representar un gran logro terapéutico para estos desórdenes.

## 2. DEFINICION DE HIPOXIA

Se define como hipoxia a la disminución de la concentración de oxígeno en los tejidos del cuerpo.

## 3. RESPUESTAS FISIOPATOLÓGICAS A LA HIPOXIA

La hipoxia se define como la disminución del aporte de oxígeno a las células, lo que limita la producción de energía a niveles por debajo de los requerimientos celulares. Puede generarse por diversos mecanismos que se esquematizan de la siguiente forma:

- a. **Por disminución de la PaO<sub>2</sub>** secundaria a cualquiera de las causas de hipoxemia
- b. **Por disminución de la capacidad de transporte de oxígeno** de la sangre: anemia, intoxicación por CO, metahemoglobinemia.
- c. **Por disminución del aporte sanguíneo a los tejidos:**
  - ✓ generalizado: shock, insuficiencia cardiaca.
  - ✓ localizado: oclusión arterial o venosa.
- d. **Por trastorno de difusión entre capilar y célula** por aumento de líquido intersticial (edema).



- e. **Por intoxicación de los sistemas enzimáticos celulares de oxidoreducción:** intoxicación por cianuro.
- f. **Por consumo excesivo de oxígeno en los tejidos:** fiebre, ejercicio muscular intenso.

El primer grupo se caracteriza por presentar PaO<sub>2</sub> baja (hipoxia hipoxémica). El segundo grupo presenta PaO<sub>2</sub> normal con contenido bajo. En los grupos restantes, tanto la presión como el contenido de oxígeno son normales, salvo que exista compromiso pulmonar secundario o concomitante. La última causa, el mayor consumo tisular, no produce hipoxia por sí sola, ya que en general el aumento del metabolismo se acompaña de un aumento de la perfusión sanguínea del territorio en actividad. Es sí, en cambio, un factor de agravación de los mecanismos antes enumerados.

La función de censar O<sub>2</sub> fue originalmente atribuida sólo a células quimiorreceptores especializadas, tales como el cuerpo carotídeo y neuroepitelial que regulan las tasas cardiovasculares y respiratorias respectivamente. Ahora se sabe que todas las células nucleadas en el ser humano censan O<sub>2</sub> y responden a la hipoxia aguda o crónica. Las respuestas adaptativas a cambios agudos de la concentración de O<sub>2</sub> (duración de segundos a unos pocos minutos) principalmente ocurre como resultado de alteración (que envuelve fosforilación o estados redox) de proteínas preexistentes, mientras que cuando ocurren cambios crónicos en la concentración de O<sub>2</sub> (duración de minutos a horas o más) la respuesta adaptativa se basa principalmente en alteración en la expresión de genes.

No sólo la homeostasis del O<sub>2</sub> es esencial para la supervivencia, sino que también la hipoxia juega un rol importante en la patogénesis de las enfermedades con mayor causa de mortalidad, incluyendo cáncer, isquemia miocárdica y cerebral, y enfermedades crónicas del pulmón y corazón.

## **RESPUESTAS FISIOLÓGICAS**

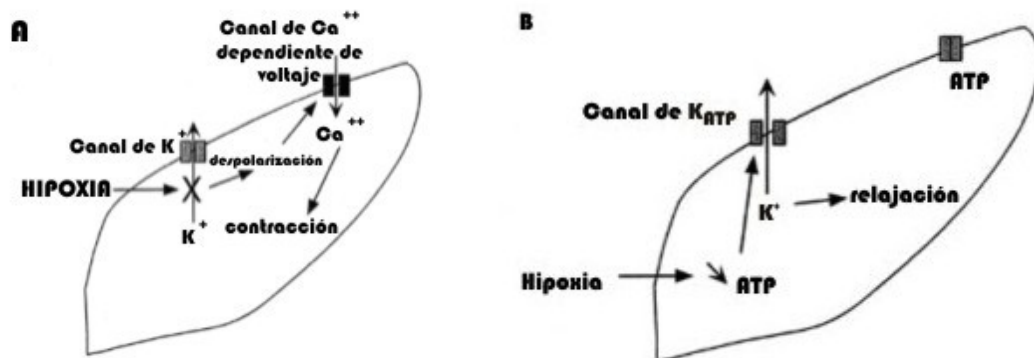
### **a. Respuestas sistémicas**

Durante condiciones de hipoxia los diversos sistemas quimiosensores actúan conjuntamente para modular rápidamente la ventilación pulmonar y la perfusión sanguínea y así optimizar el suministro de oxígeno a los tejidos que más lo necesiten. Estas respuestas dependen de células quimiorreceptoras: los cuerpos carotídeos en la circulación arterial y los cuerpos neuroepiteliales presentes en las vías aéreas, y a la respuesta directa de las células del músculo liso vascular a la hipoxia.

- ***Células del músculo liso vascular.***

En respuesta a la hipoxia, los vasos pulmonares se contraen con el fin de desviar la sangre fuera de regiones pobremente ventiladas. Este mecanismo se inicia por la inhibición de canales de  $K^+$  (por lo tanto el  $K^+$  no sale al líquido extracelular), lo cual produce la despolarización de la membrana y así se activan los canales de  $Ca^{++}$  dependientes de voltaje, ocasionando un incremento de la concentración de  $Ca^{++}$  citosólico y finalmente la contracción. Los canales de  $K^+$  también pueden estar modulados por la concentración de intermediarios reactivos de oxígeno (IRO) producidos por las mitocondrias. Es así que un ambiente celular oxidado (con mayores concentraciones de IRO, generalmente en normoxia por la presencia de  $O_2$ ) aperturan los canales de  $K^+$ , mientras que un estado reducido los bloquea.

Por otro lado, en los vasos periféricos se produce una vasodilatación hipóxica con el fin de incrementar la perfusión sanguínea a los tejidos que lo necesiten (cerebral y coronario). La vasodilatación se produce como resultado de la apertura de canales de  $K^+$  dependientes de ATP de la musculatura vascular lisa, debido a una disminución de ATP causada por la hipoxia.



**Fig 1. Representación esquemática de la respuesta de las células del músculo liso vascular a la hipoxia. A: células del músculo vascular liso pulmonar. B: células del músculo liso vascular periférico.**

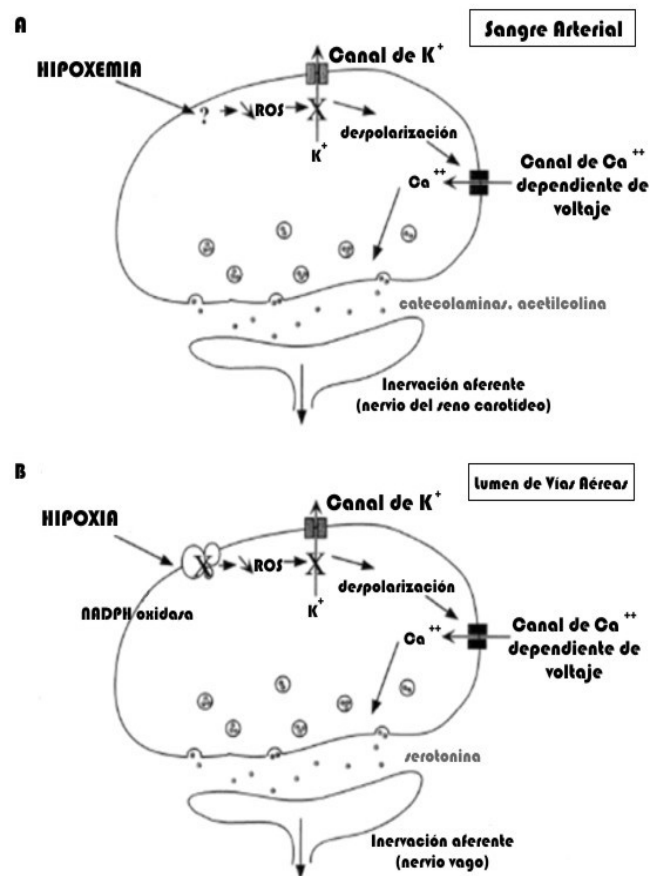
### ➤ **Cuerpos carotídeo y neuroepiteliales.**

Los cuerpos neuroepiteliales de las vías respiratorias tensan cambios del  $O_2$  inspirado; mientras que , los cuerpos carotídeos censan niveles del  $O_2$  arterial. Ambos responden al suministro disminuido de  $O_2$  iniciando la actividad en la fibras quimiosensoras que producen ajustes cardiorrespiratorios.

Los cuerpos carotídeos están altamente vascularizados y se encuentran en la bifurcación de la arteria carótida común los elementos sensores de esta estructura son células de tipo I (glomus) las cuales contienen en su mayoría catecolaminas y acetilcolina. Por otro lado, los cuerpos neuroepiteliales se localizan en las bifurcaciones de las vías

respiratorias y envían información al centro respiratorio para la liberación de neuromedadores, serotonina.

En condiciones de hipoxia, esta inhibe los canales de  $K^+$  (los cierra e impide su salida al exterior) de la membrana de estas células quimiorreceptoras, se produce entonces la despolarización y el aumento del  $Ca^{++}$  citosólico, con lo cual se estimula la liberación de neurotransmisores y la activación de las fibras eferentes. El sensor del glomus y cuerpos neuroepiteliales están asociados a una NADPH oxidasa, la cual en estados de normoxia genera IRO y así activa canales de  $K^+$  (los apertura); y en condiciones de hipoxia, se inhibe y no genera IRO, por lo tanto los canales de  $K^+$  se inhiben.



**Fig 2. Representación esquemática de la respuesta de los cuerpos carotídeos y neuroepiteliales a la hipoxia. A: cuerpos carotídeos. B: cuerpos neuroepiteliales.**

## b. Regulación del metabolismo celular

- **Efecto de la hipoxia en las mitocondrias.**



La limitación de oxígeno se considera generalmente como un impedimento de la respiración mitocondrial.

Los mayores efectos de la disminución de O<sub>2</sub> en la respiración mitocondrial consisten en la inhibición de la cadena respiratoria y el incremento del escape de protones mientras la fosforilación es menos afectada. La inhibición de la cadena respiratoria ocurre automáticamente a una determinada concentración disminuida de O<sub>2</sub>.

## ➤ **Adaptación a la hipoxia.**

La adaptación a la hipoxia consiste en 2 procesos:

- Incremento en la eficiencia de las vías productoras de energía: incrementando la actividad anaeróbica de glicolisis.
- Disminución de los principales procesos consumidores de energía : comenzando por la síntesis de proteínas, RNA/DNA y continuando con la disminución de la actividad de ATPasas transportadoras de iones (bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y bomba de Ca<sup>++</sup>).

Si bien la glicólisis no resulta tan eficiente en la producción de ATP como la fosforilación oxidativa, en presencia de suficiente glucosa y la actividad incrementada de enzimas glicolíticas (debido a la regulación alostérica de la fosfofructokinasa y la sobreexpresión de estas enzimas mediada por HIF-1) la glicólisis puede ser capaz de sostener la producción de ATP.

La fosfofructokinasa es activada alostéricamente por ADP y AMP, y es inhibida por ATP (mecanismo llamado “control por adenilato”). Sin embargo, el activador alostérico más potente es la fructosa 2,6-bisfosfato, cuya síntesis y degradación depende de una enzima, la fructosa 2,6-bisfosfato kinasa (PFK-2). Esta enzima es regulada en minutos por la fosforilación por la AMP- activada proteína quinasa (AMPK), pero su expresión sólo aumenta por activación transcripcional vía HIF-1. La AMPK fosforila a PFK-2 e incrementan así la V<sub>máx</sub> de su actividad kinasa, así se incrementa la producción de fructosa 2,6-bisfosfato y la activación alostérica de la fosfofructokinasa. Además, la activación de AMPK estimula la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 a la membrana y consecuentemente la captación de glucosa. En términos generales, la AMPK aumenta la expresión de GLUT-4, hexokinasa, y enzimas mitocondriales involucradas en el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. Por otro lado, AMPK inhibe la síntesis de ácidos grasos, triglicéridos, esteroides, así como la expresión de enzimas sintetizadoras de ácidos grasos y gluconeogénesis.

## c. **Regulación de la expresión génica**



Células y tejidos desarrollan diversas respuestas para hacerle frente a la hipoxia, entre estas tenemos:

- Incremento de la ventilación y el gasto cardiaco.
- Cambio del metabolismo aeróbico por el anaeróbico.
- Mejoramiento de la vascularización.
- Aumento de la capacidad de la sangre para transportar O<sub>2</sub>.

La mayoría de estas respuestas ocurren en etapas tempranas mediante la activación de proteínas preexistentes, y en una etapa más tardía mediante la activación transcripcional de determinados genes. El principal factor transcripcional encargado de mediar las respuestas a la hipoxia es el Factor Inducible por Hipoxia: HIF-1, el cual es un heterodímero compuesto por subunidades HIF-1<sup>a</sup> e HIF-1b. En presencia de O<sub>2</sub>, la subunidad  $\alpha$  del HIF-1 (HIF-1 $\alpha$ ) se modifica por las hidroxilasas, que constituyen el punto central del mecanismo sensor, induciendo su ubiquitinización y su catabolismo por el proteosoma. Por el contrario, en hipoxia, o en presencia de algunos factores de crecimiento que incrementan su síntesis, el HIF-1 $\alpha$  se transloca al núcleo, donde, unido al HIF-1b, actúa como factor transcripcional de genes con elementos de respuesta hipóxica (HRE) en su promotor. Estos regulan la síntesis de una amplia serie de proteínas, que abarcan desde enzimas respiratorias y transportadores hasta hormonas involucradas en la regulación a escala del organismo de la circulación y la eritropoyesis. El papel del HIF-1 no se restringe a la mera inducción de una respuesta adaptativa a la falta de oxígeno, sino que participa significativamente en los mecanismos de reparación celular.

Entre algunos de los genes activados por HIF-1 en hipoxia tenemos a los de:

- Tirosin hidroxilasas, envueltas en la síntesis de dopamina en células de tipo I del cuerpo carotideo.
- Enzimas glicolíticas: fosfoglicerato kinasa-1, piruvato kinasa, aldolasa A, fosfofrutokinasa, glicerato-3-fosfato deshidrogenada, enolasa-1, y transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4.
- VEGF, PDGF para inducir la angiogénesis, y NOS (sintetasa de NO) para incrementar la vasodilatación.

- Eritropoyetina y receptores de transferrina.

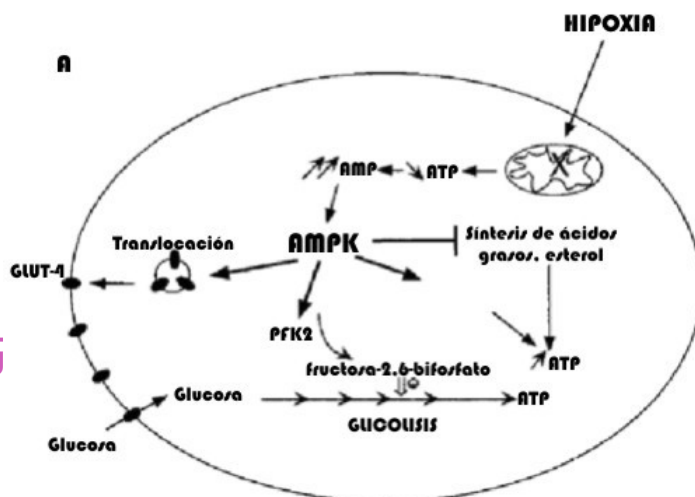
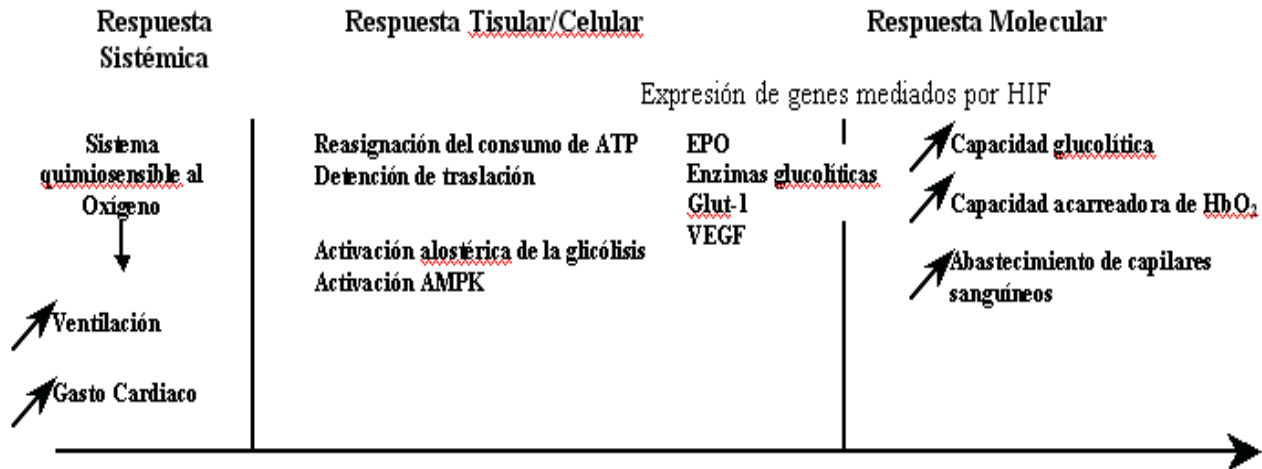


Fig 3. Representación esquemática de la respuesta





**adaptativa de las células frente a la hipoxia. A:** Representación esquemática del rol de AMPK en una adaptación aguda del metabolismo celular a la hipoxia.



**B:** Representación esquemática que muestra el curso de tiempo de las respuestas metabólicas adaptativas a la hipoxia. HIF, factor inducible por hipoxia; EPO, eritropoyetina; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular; HB, hemoglobina.

## RESPUESTAS PATOLÓGICAS

La hipoxia tiene grandes efectos en la estructura y función de los órganos. Este es el caso especial de paro (isquemia cerebral) e infarto de miocardio (isquemia miocárdica). La hipoxia también juega un papel crucial en la regulación del crecimiento y metástasis tumoral.

### a. INJURIA POR REPERFUSIÓN

Tanto en el caso de isquemia cerebral como miocárdica se produce injuria causada por la hipoxia y así también la reperfusión, después de un estado de hipoxia, controversialmente suele producir daño tisular e incluso muerte celular debido a un incremento brusco de los IRO producidos en los primeros minutos al incrementarse el O<sub>2</sub>. este proceso es denominado “INJURIA POR REPERFUSIÓN”

- **Isquemia cerebral.** Se la disminución de PO<sub>2</sub> no es tan severa, entonces las células suprimen la síntesis de proteínas y la actividad eléctrica espontánea, proceso denominado “penumbra”. La injuria progresa conforme la hipoxia lo hace y eventualmente llega a ser irreversible si es que no se restaura la oxigenación. La muerte aguda de células ocurre por necrosis, sin embargo la hipoxia también puede inducir posteriormente apoptosis.





- **Isquemia miocárdica.** El cese del flujo sanguíneo permite el paso de respiración mitocondrial a glicólisis anaeróbica, lo cual produce el acúmulo de lactato y protones en el cardiomiocito, induciendo acidosis, cambios osmóticos y edema celular. El aumento de lactato activa el transporte de  $\text{Ca}^{++}$  y eventualmente conlleva a necrosis celular. Para restaurar las funciones celulares es necesario restaurar el flujo arterial; sin embargo, este induce al daño celular, proceso llamado “injuria por reperfusión” (explicado anteriormente), la cual causa fallo en la contractilidad miocárdica por alteraciones en el  $\text{Ca}^{++}$ .

## b. ANGIOGÉNESIS TUMORAL

La formación de nuevos vasos sanguíneos o “**NEOANGIOGÉNESIS**” es esencial tanto para el crecimiento tumoral como para su metástasis. El factor inductor de angiogénesis más importante es el stress metabólico producido por hipoxia. Es así que las células tumorales responden a la hipoxia por medio del HIF-1, el cual incrementa la transcripción de VEGF y la capacidad glicolítica en células tumorales.

## 4. FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA-1 (HIF-1)

HIF-1 es factor de transcripción heterodimérico compuesto por dos sub-unidades (HIF-1a y HIF-1b) con pesos moleculares aparentes de 120-130 kD y 91-94 kD, respectivamente. Ambas sub-unidades comparten cierta homología en sus extremos N-terminales y C-terminales teniendo las siguientes características:

- El extremo N-terminal contiene un dominio bHLH (*basic helix-loop-helix*) y un dominio PAS (Per-Arnt-Sim), que están involucrados en la dimerización y en la unión al ADN.
- El extremo COOH-terminal de la sub-unidad a contiene dos dominios de transactivación (TADs) y un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), siendo éstos los responsables de las funciones transactivadora y reguladora de este factor en diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno.

El ARNm de ambas subunidades HIF-1<sup>a</sup> y HIF-1b se expresan constitutivamente bajo cualquier condición (hipoxia, normoxia y reoxigenación). Sin embargo, la proteína de HIF-1<sup>a</sup> sólo es detectable en hipoxia debido a que en estas de normoxia y reoxigenación HIF-1<sup>a</sup> es modificado en sus estructura por enzimas sensoras de  $\text{O}_2$ , luego ubiquitinizado y finalmente degradado en el proteosoma.

HIF-1b es idéntico al ARNT–translocador nuclear del receptor Ah (aril hidrocarbon). Esta proteína dimeriza con receptores Ah activados cuyos ligandos constituyen diferentes contaminantes ambientales, como aminos heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos y compuestos aromáticos



(dioxinas, dibenzofuranos y bifenilos). La identificación de ARNT como sub-unidad de HIF-1 demostró por vez primera que ARNT (HIF-1b) constituye una sub-unidad común de varios heterodímeros que contienen dominios bHLH. La translocación al núcleo de HIF-1a y heterodimerización con HIF-1b son necesarias para la unión de HIF-1 a los HBSs (sitios de unión para HIF-1) y su consiguiente transactivación.

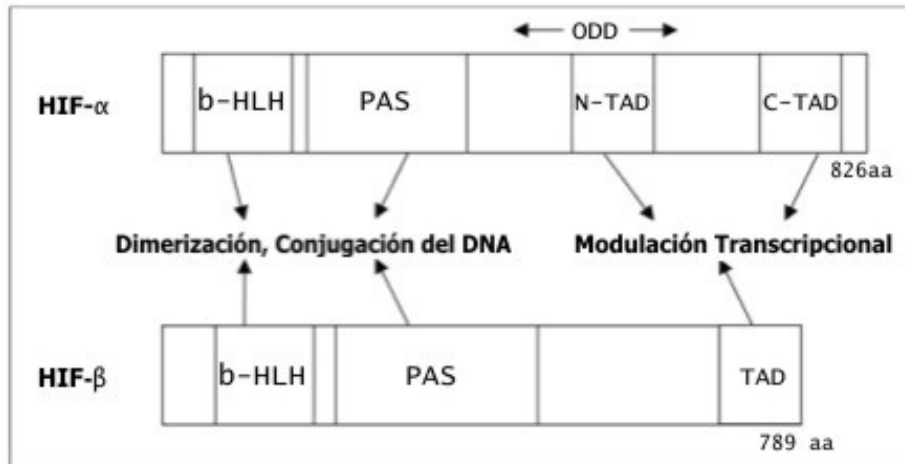


Fig 4. Esquema de los elementos que constituyen la estructura de los genes IF-1b y sus acciones

Tabla1:Proteínas bHLH-PAS en Mamíferos

Clase I
ARNT (HIF-1β)
ARNT2
ARNT3 (BMAL/MOP3)
Clase II
AHR
CLOCK
HIF-1α
HIF-2α (EPAS1 / HLF / HRF / MOP2)
HIF-3α
NPAS1 (MOP5)
NPAS2 (MOP4)
SIM1
SIM2

Tabla 1. Proteínas bHLH-PAS en mamíferos. bHLH, hélice-asa-hélice básico; PAS, translocador nuclear de PER- aril hidrocarburo; HIF-1, Factor inducido por hipoxia – 1; MOP, miembro de las proteínas de dominio PAS; AHR, receptor de aryl hidrocarburo; EPAS1, proteína endotelial de dominio PAS 1; HLF, factor tipo HIF-1; HFR, factor relacionado HIF-1.

**HIF-1 EN ESTADOS DE NORMOXIA**



El HIF-1<sup>a</sup> solo se mantiene estable, activo y se transloca al núcleo donde cumple su acción, en estados de hipoxia; mientras que en estados de normoxia es degradado en el proteosoma para inactivarlo.

## a. Hidroxilación de dominios ODD y TAD

Al manifestarse hipoxia o anoxia, una familia de hidroxilasas con actividad enzimática dependiente de oxígeno (razón por la cual son conocidas como los verdaderos sensores de O<sub>2</sub>) modifican el dominio de HIF-1<sup>a</sup> conocido como ODD (dominio de degradación dependiente de O<sub>2</sub>) y TAD (dominio transcripcional). Estas enzimas son prolil hidroxilasas 1, 2 y 3 (PHD1, PHD2 y PHD3) y factor inhibidor de HIF-1 (FIH).

Las PDHs son dioxigenasas que requieren de O<sub>2</sub> y 2-oxoglutarato como cosustratos. Las PHDs contienen hierro ligado a dos residuos de histidina y uno de ácido aspártico. La unión del O<sub>2</sub> a la parte central requiere del mantenimiento del hierro en su estado ferroso. Las PHDs transfieren un átomo de O<sub>2</sub> a un residuo de prolina de HIF-1<sup>a</sup>, y el segundo átomo de O<sub>2</sub> reacciona con el 2-oxoglutarato, dando como productos succinato y Co<sub>2</sub>. La hidroxilación de la prolina regula la estabilidad del HIF-1<sup>a</sup> (lo inestabiliza).

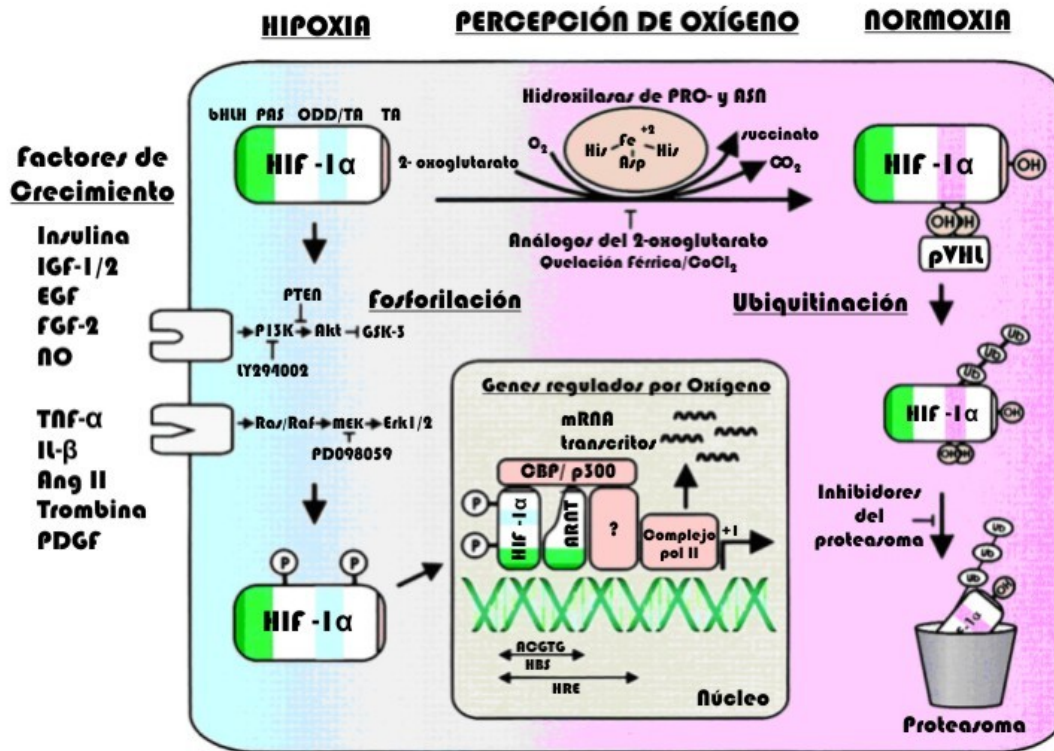
El FIH hidroxila los residuos de asparragina (en Asn803 y Asn851) de los dominios TADs. Esta hidroxilación, a diferencia de la anterior, regula la actividad de HIF-1<sup>a</sup>, ya que interfiere en el reclutamiento del coactivador transcripcional CBP/p300.

## b. Ubiquitinización por el complejo E3 ubiquitin ligasa

Posteriormente la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL) se une a los dominios ODD hidroxilados. pVHL es parte de una ubiquitina ligasa (complejo E3 ubiquitin ligasa) que une a HIF-1<sup>a</sup> a la maquinaria de ubiquitinización.

## c. Degradación proteasomal

La unión covalente con las moléculas de ubiquitina dirige al HIF-1<sup>a</sup> hacia la degradación por el proteosoma, el cual tiene gran actividad proteolítica y genera una amplia variedad de péptidos a partir de las proteínas degradadas.



**Fig 5. Representación esquemática del sensor de O<sub>2</sub> y la regulación de la expresión de HIF-1.** Bajo condiciones hipóxicas, HIF-1<sup>a</sup> es estabilizado y bajo ciertas modificaciones es translocado al núcleo donde se une con cofactores y activa la expresión de genes. Bajo condiciones hipóxicas, el dominio ODD de HIF-1<sup>a</sup> es hidroxilado por proliil hidroxilasas dependientes de O<sub>2</sub> (marcando a HIF-1<sup>a</sup> para su destrucción proteolítica en el proteasoma) y el dominio TAD es hidroxilado por una asparragina hidroxilasa dependiente de O<sub>2</sub> (bloqueando así la interacción con el coactivador CBP/p300).

**HIF-1 EN ESTADO DE HIPOXIA**

En la ausencia o disminución de O<sub>2</sub>, el HIF-1<sup>a</sup> se activa para producir la transcripción de genes de respuesta a la hipoxia. HIF-1<sup>a</sup> comienza a acumularse en el núcleo después de unos 2 minutos de hipoxia o anoxia. Entre los factores necesarios para la activación de HIF-1<sup>a</sup> tenemos:

- Condiciones redox adecuadas.
- Estabilización de HIF-1<sup>a</sup> por inhibición de las hidroxilasas.
- Disociación de la chaperona HSH90 [se unen a proteínas de estrés (HSP)].
- Fosforilación de HIF-1<sup>a</sup>.
- Unión de HIF-1<sup>a</sup> con HIF-1b en el núcleo.
- Asociación con co-activadores CBP/p300.



En hipoxia o anoxia las enzimas prolil hidroxilasas no permanecen activas (proceso de estabilización) ya que no presentan su cosustrato de átomos de O<sub>2</sub>; entonces, las prolinas de HIF-1<sup>a</sup> no se hidroxilan y así se evita su ubiquitinización y degradación proteosomal.

El HIF-1<sup>a</sup> libre no hidroxilado es fosforilado y translocado al núcleo, donde dimeriza con HIF-1b (expresado ahí constitutivamente) y se acopla a su co-activador CBP/p300, permitiendo la transactivación e inducción de genes. Es importante también, aunque está menos caracterizada, la unión de HIF-1 a proteínas de estrés (HSPs). Esta unión protege a HIF-1 de la degradación.

## a. Fosforilación de HIF-1<sup>a</sup>

La fosforilación es secundaria a la estabilización hipóxica y esta mediada por las MAPK que son activadas directamente por la hipoxia. Otro modulador importante en la actividad de HIF-1 es la vía Akt kinasas. Ambas kinas median la traslación y actividad de HIF, mas no su estabilización.

## b. Translocación de HIF-1<sup>a</sup> al núcleo y rol de HIF-1b

A diferencia de HIF-1<sup>a</sup>, HIF-1b o ARNT se expresan permanentemente en el núcleo y se unen a proteínas AhR o a HIF-1<sup>a</sup>. ARNT no es necesario para la translocación de HIF-1<sup>a</sup> al núcleo; es la hipoxia la que activa esta translocación.

## c. Reclutamiento de los cofactores transcripcionales

El CBP/p300 es un cofactor transcripcional y una acetil transferasa que acetila histonas con el fin de modular la estructura de la cromatina para “abrir” el locus genómico a transcribirse.

## d. Unión al DNA y ensamblaje del complejo transcripcional.

Una vez estabilizado y activado por hipoxia, el HIF-1<sup>a</sup> se une al sitio de unión de HIF-1 al DNA (HBS) presente en los elementos de respuesta hipóxica (HRE) de muchos genes regulados por O<sub>2</sub>.

Nota: la unión entre HIF-1 y DNA se pierde a los 8 minutos de reoxigenación y a los 32 minutos la concentración de HIF-1 es indetectable.

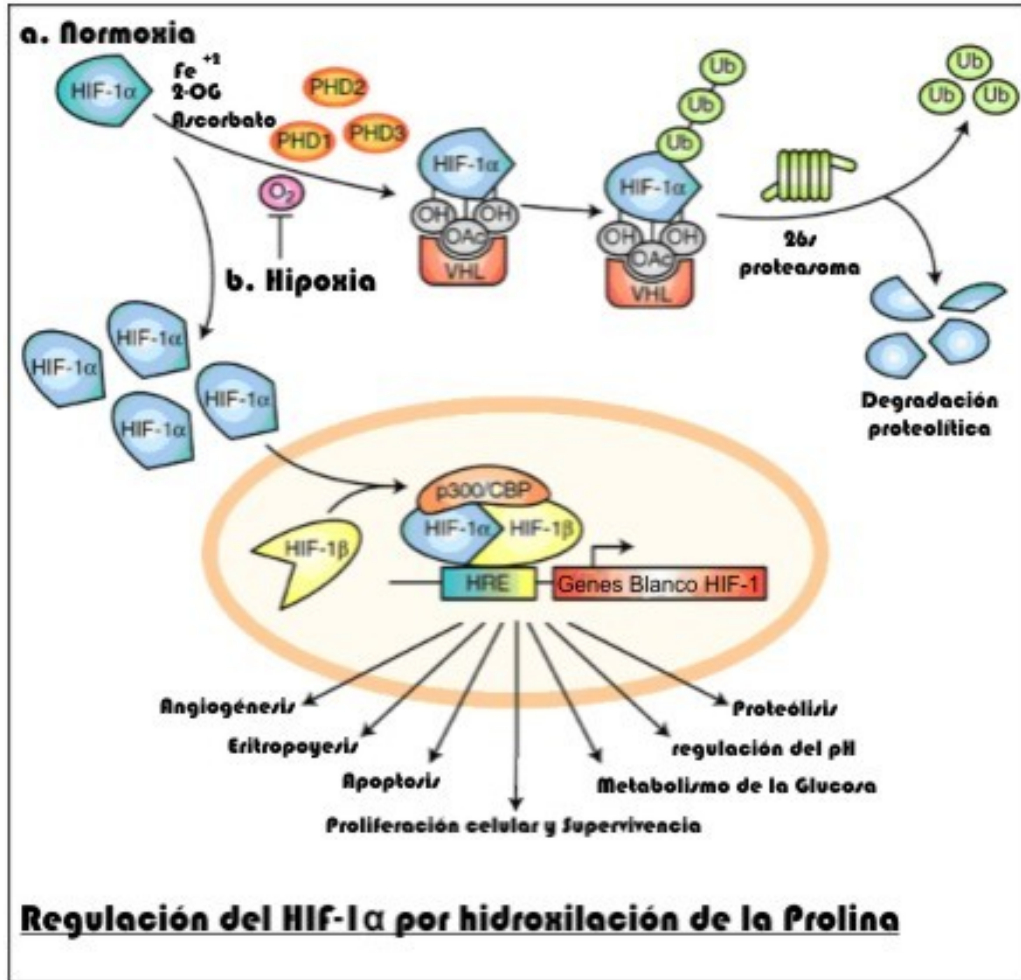


Fig 6. Modelo esquemático simplificado de la regulación de HIF-1 $\alpha$  y sus funciones. Ver la explicación en el texto.

### OTRAS VÍAS DE ESTIMULACIÓN Y REGULACIÓN DE HIF-1

La hipoxia no es el único estímulo que incrementa los niveles de HIF-1 $\alpha$ . En condiciones de normoxia muchas citoquinas y factores de crecimiento activadores de receptores del tipo tirosina quinasa (RTKs) son también capaces de inducir HIF-1 $\alpha$ , repercutiendo sobre un incremento en los niveles de este factor transcripcional. Entre éstos se incluyen: insulina, factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2), interleuquina-1b (IL-1b), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor de crecimiento epidérmico (EGF), trombina, endotelina 1 (ET-1) y heregulina (HER2). De manera general, el mecanismo por el cual todos ellos inducen HIF-1 $\alpha$  incluye un incremento en la síntesis de la proteína, a diferencia de lo que ocurre en hipoxia, en la que la estabilidad del factor está asociada a una disminución en su tasa de degradación. Las vías principales de señalización descritas hasta el momento que participan en la inducción de HIF-1 $\alpha$  a partir de estos factores de crecimiento, incluyen PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa), Akt



(PKB), Ras, MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), y MEK (quinasa de MAPK). En el corriente año académico, y en el curso de trabajos enfocados al efecto del estrés oxidativo sobre las células endoteliales, hemos obtenido resultados que sugieren la existencia de una vía de retroalimentación del VEGF sobre su propio factor de transcripción principal, el HIF-1. Un aspecto novedoso adicional de esta vía es el papel del anión superóxido como mediador principal de transmisión de la señal activadora.

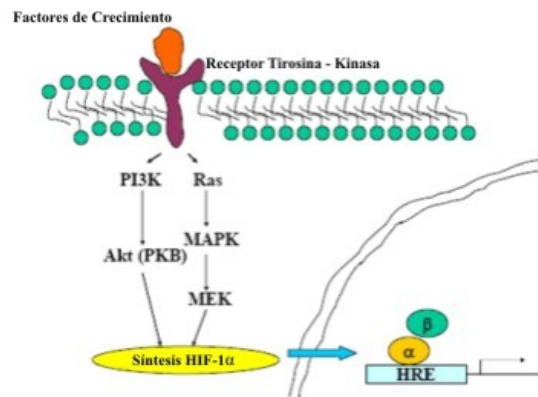


Fig 7. Representación esquemática de la regulación de HIF-1<sup>a</sup> por MAPK, IP3K y otros.

### GENES BLANCO DE HIF-1

El HIF-1 actúa como el mayor regulador de la expresión de genes dependientes de la concentración de O<sub>2</sub>. Entre los principales genes blancos de HIF-1 tenemos:

a. **Genes involucrados en la hematopoyesis y metabolismo de Fe<sup>++</sup>**

El hierro es necesario para la formación del grupo hemo y es el factor limitante más común en la eritropoyesis. Se ha observado que en la hipoxia existe una incrementada expresión de transferrina, probablemente para mejorar el transporte de Fe<sup>++</sup> a los tejidos hematopoyéticos. Así también existe un incremento de ceruloplasmina necesaria para el paso de estado ferroso a férrico para que éste pueda unirse a la transferrina.

Durante periodos breves de hipoxia se producen estímulos suficientes para la expresión de EPO (eritropoyetina), la cual protegerá al corazón del daño apoptótico por isquemia y reperfusión. La EPO no solo tiene funciones como regulador de la eritropoyesis, sino que participa en diferentes mecanismos, entre otros la vascularización retiniana y de la glándula mamaria, diferenciación de adipocitos, maduración embrionaria de la cresta neural, citoprotección neuronal, de miocardiocitos y de túbulos renales en situaciones de isquemia/reperfusión.

Entre otros, se estimulan los siguientes genes:

- Eritropoyetina (EPO). *Eritropoyesis*





- Transferrina. Transporte de Hierro
- Receptor de Transferrina. Absorción de Hierro

## b. Genes involucrados en la biología vascular

El sistema vascular varía muy finamente según el control regulado por el O<sub>2</sub>. VEGF es el gen blanco más prominente de HIF-1 involucrado en la biología vascular. HIF-1 parece regular a flt-1, un receptor de VEGF. Recientemente se ha reportado que sería el VEGF derivado de glándulas endocrinas el gen que estimularía HIF-1 durante la hipoxia. La inducción de la angiogénesis lleva al incremento de la densidad vascular; y por lo tanto, una disminución en la distancia de difusión del O<sub>2</sub>. sin embargo, el flujo sanguíneo local bajo condiciones fisiopatológicas está controlado por la regulación del tono vascular a través de la producción de NO (por expresión de iNOS), CO (hemo oxigenasa 1), endotelina 1 (ET-1), adrenomedulina, o activación de los receptores adrenérgicos alfa (subtipo 1B).

HIF-1 no solo modula la angiogénesis y el tono vascular, sino que también se encarga de la expresión de genes relacionados con el remodelamiento vascular.

Entre otros, se estimulan los siguientes genes:

- Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF). *Angiogénesis, formación de vasos sanguíneos*
- iNOS. Producción de óxido nítrico
- Endotelina 1. Regulador del Tono vascular

## c. Genes involucrados en el metabolismo de la glucosa

Bajo condiciones de limitado suministro de O<sub>2</sub>, la glicólisis anaeróbica es la forma predominante de generación de ATP celular. Muchos genes están involucrados en la captación de la glucosa (GLUT-1 y GLUT-4) y la glicólisis. HIF-1 estimula la expresión de anhidrasas carbónicas transmembrana con el fin de regular la disminución de pH producido por el excesivo lactato liberado de la glicólisis. Las anhidrasas carbónicas convierten los protones en bicarbonato y dióxido de carbono. Así también se aumenta grandemente la expresión de enzimas glicolíticas.

Entre otros, se estimulan los siguientes genes:

- Transportador de Glucosa 1. Absorción de Glucosa
- Fosfofructoquinasa L y C. Glucólisis
- Lactato Deshidrogenasa A. Glucólisis
- Aldolasa A y C. Glucólisis



**d. Genes involucrados en la proliferación celular**

Entre otros, se estimulan los siguientes genes:

- Insulin-like Growth Factor 2 (IGF-2).
- Proteinas transportadoras 1 y 3 del Insulin Growth Factor (IGF).

Gen regulado por Oxígeno	Acción
Transporte de Oxígeno: eritropoyesis y metabolismo del hierro	
Eritropoyetina Transferrina Receptor de Transferrina Ceruloplasmina	Eritropoyesis Transporte de Hierro Absorción de Hierro Oxidación de Hierro
Transporte de Oxígeno: regulación vascular	
VEGF Flt-1 EG-VEGF PAI-1 INOS Hemo oxigenasa 1 Adrenomedulina Receptor adrenérgico $\alpha_{1B}$ Endotelina-1	Angiogénesis Receptor VEGF tipo 1 Angiogénesis Angiogénesis Producción de NO Producción CO Tono vascular Tono vascular Tono vascular
Energía Anaeróbica: Absorción de glucosa y glucólisis	
Transportador de Glucosa 1 PFKFB3 Fosfofructoquinasa Aldolasa A GAPDH Fosfoglicerato quinasa 1 Lactato deshidrogenasa A	Absorción de Glucosa Regulación de glucólisis Glucólisis Glucólisis Glucólisis Glucólisis Glucólisis
Varios	
Retrotransposón VL30 p35srj  Colágeno prolil-4-hidroxilasa $\alpha$ (I) Factor trébol intestinal ETS-1 IGFBP-1	Regulación de Retroalimentación HIF-1   Factor de Transcripción Factor de Crecimiento

**Tabla 2. Genes blanco de HIF-1 y sus principales acciones.**



## **FUNCIONES DE HIF-1**

En resumen y de forma general las funciones de HIF-1 son las siguientes:

- Favorecer la oxigenación tisular
- Angiogénesis
- Remodelamiento vascular
- Eritropoyesis y metabolismo del hierro. Producción de transportadores de O<sub>2</sub>.
- Metabolismo energético (glicolítico)
- Proliferación celular
- Viabilidad y apoptosis celular
- Citoprotección y amortigua y daño hipóxico
- Adaptación a la hipoxia en los tumores.
- Crecimiento y metástasis tumoral
- Embriogénesis: es esencial para la vasculogénesis, morfogénesis de estructuras cardíacas y neurales (tubo neural).

## **HIF-1, HIPOXIA Y CITOPROTECCIÓN:**

Sintetizando estos apartados, la respuesta de HIF-1 es específica de la hipoxia y del estímulo por factores de crecimiento. Esta última vía se relaciona con la necesidad de proveer una mayor oferta de oxígeno en tejidos en expansión celular. En este punto cabe preguntarse si la célula responde a la depleción energética de forma idéntica a la falta de oxígeno. Los datos disponibles, si bien todavía insuficientes, indican que el déficit de ATP, que podría ser interpretado como un equivalente de hipoxia, no parece estimular la activación de HIF-1, aunque sí en cambio la de HSPs<sup>34</sup>. De interés adicional, en modelos experimentales en células tubulares renales (LLC-PK1), la hipoxia no extrema no causa depleción de ATP, un dato que refleja la eficiente adaptación de la producción energética ante la disminución de oxígeno. No se han publicado aún estudios similares en modelos con bloqueo de HIF-1, pero su interés es obvio, ya que es probable que HIF-1 sea en gran parte responsable de la citada eficiencia.

Estos datos se relacionan con el apartado final, referido a posibilidades terapéuticas. En breve, las acciones citoprotectoras abarcan a muchos tipos celulares y respuestas sistémicas. En este contexto, HIF-1 es un factor transcripcional clave en una respuesta génica compleja, desarrollada a múltiples niveles. A modo de ejemplos, en experimentos en ratón, se ha observado que episodios breves de hipoxia intermitente bastan para inducir la producción de EPO, que a su vez protege al corazón del daño apoptótico por isquemia-reperfusión; por el contrario, en animales que no expresan HIF-1, esta respuesta no ocurre, no estimulándose la producción de EPO con la hipoxia. En diferentes tipos tumorales, HIF-1 se encuentra



marcadamente activado, y este estado se relaciona con mayor agresividad del tumor. Más aún, otra posible explicación, más indirecta, de los efectos de HIF-1 sobre los tumores proviene de datos recientes, que demuestran una elevación de HIF-1, con efectos protectores, en las células endoteliales de tumores irradiados, lo que aporta un nuevo abordaje de interpretación a los posibles mecanismos de resistencia tumoral a la radioterapia.

## 5. **ROL DEL HIF-1 EN DIFERENTES PATOLOGÍAS**

### A. **Aspectos clínicos**

La expresión de HIF-1 y los genes que regula, se han relacionado con múltiples circunstancias ambientales y fisiológicas (altura, ejercicio, frío, exposición al tabaco), como procesos patológicos. Hemos seleccionado algunas situaciones de interés inmediato.

#### a. **Enfermedad pulmonar crónica**

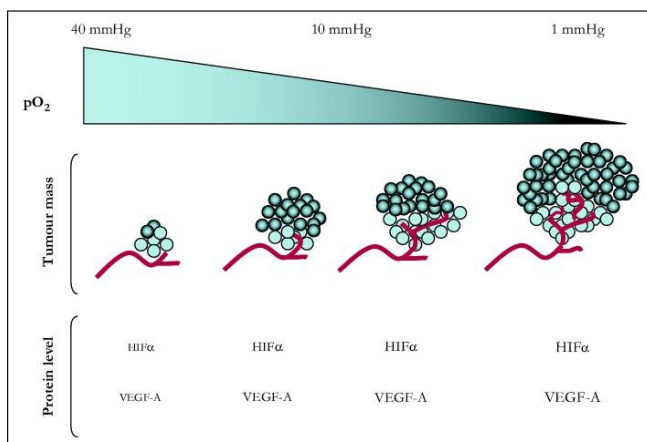
En un ejemplo de adaptación fisiológica, en la altura se ha observado un aumento de expresión de HIF-1 tanto en nativos aclimatados crónicamente como en viajeros; este aumento se acompaña de incremento de EPO y cambios en el músculo esquelético, y especialmente en el número y actividad de mitocondrias. Este aumento de HIF-1, que es útil para incrementar la capacidad transportadora de oxígeno, se acompaña de estimulación de mecanismos de remodelado de la vasculatura, que llevan a mayor hipertensión pulmonar. La hipoxia es un potente estímulo para la producción por el endotelio pulmonar de ET-1, un péptido capaz de inducir vasoconstricción y proliferación del músculo liso de los vasos pulmonares y VEGF, un agente proliferativo y remodelante; ambos genes están relacionados con HIF-1. En contrapartida fisiológica, ET-1 aumenta en la altitud de forma inversamente proporcional a la saturación arterial de oxígeno y de manera directamente proporcional con el aumento en la presión sistólica de la arteria pulmonar. Es de interés el estudio del papel de genes dependientes de HIF-1 en otros mecanismos relacionados con la hipertensión pulmonar, como la inhibición del canal de potasio en los vasos pulmonares, así como en la activación local de angiotensina II. En la misma línea de evidencia, el síndrome de apnea obstructiva del sueño se acompaña de niveles elevados de VEGF en sangre, en proporción al grado de hipoxia; este dato proporciona una pista en la dirección de un posible incremento de HIF-1 y por consiguiente de otros genes potencialmente relevantes.

El sistema de HIF-1 participa de la adaptación al ejercicio, y especialmente de los cambios hipóxicos relacionados con el mismo, favoreciendo el paso de la glucólisis aerobia a la anaerobia. En este sentido, en animales a los que se ha eliminado HIF-1, se observa

ausencia de acumulación de ácido láctico durante el ejercicio, con disminución de la fatigabilidad y consiguiente uso muscular excesivo y daño similar al encontrado en las distrofias musculares con alteración de la vía glucolítica. De interés especial, la glucólisis anaerobia mantiene los niveles de ATP a pesar de la ausencia de producción aerobia de energía. Este fenómeno es especialmente importante en la isquemia/reperfusión, y depende de HIF-1 y sus genes relacionados.

## b. Patología tumoral

El crecimiento rápido de los tumores determina que su incremento de tamaño no se acompañe de un desarrollo vascular suficiente, lo que genera 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, aumentando la densidad y permeabilidad vascular, y por tanto el crecimiento y propagación del tumor y, de gran interés, en algunos casos la resistencia del mismo al tratamiento. Independientemente de la hipoxia, en algunos tumores, como hemangioblastomas y carcinomas renales, la activación de HIF-1 se relaciona con la inactivación funcional del gen supresor VHL, lo que disminuye la degradación y aumenta el HIF-1, aun en normoxia. Además, el hallazgo reciente de niveles altos de HIF-1 en neoplasias como la leucemia aguda linfática, en la que no existe aparentemente hipoxia, sugiere que la explicación del aumento debe ser más compleja<sup>45</sup>. Si bien el incremento de HIF-1 en los tumores es un hecho demostrado, no se han desarrollado aún abordajes terapéuticos basados en su bloqueo específico. Ahondando un poco más, se desconocen las causas de por qué, dentro de todos los genes dependientes de HIF-1, solo se expresan con mayor intensidad algunos, un fenómeno que debe estudiarse y que se relaciona con la presencia de sitios co-reguladores de los efectos de la unión del HIF-1 al HRE. Un aspecto de interés extremo es el posible papel de HIF-1 en la particular adaptación metabólica de los tumores, en los que la glucólisis anaerobia no se inhibe en presencia de formación de ATP por vía aeróbica; esta situación puede relacionarse en forma directa con el efecto protector del HIF-1 sobre las células tumorales.



**Figura 1:** células tumorales sometidas a estrés hipóxico.



## c. Shock hemorrágico:

En el shock hemorrágico, el HIF-1 se activa a nivel tisular, pero la información disponible es todavía muy fragmentaria. En este tipo de shock existe inducción de óxido nítrico sintasa (NOS), ciclooxigenasa 2 (COX-2) y CD14, lo que aumenta la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas. HIF-1 regula la inducción de NOS durante la fase isquémica de este shock.

## d. Anemia y eritropoyetina

HIF-1 es esencial en la inducción fisiológica del gen de EPO. Viendo esta relación desde el punto de vista del mecanismo global desarrollado anteriormente, es notable que HIF-1 actúe sobre al menos tres genes de importancia en cuanto al efecto de la EPO: el de la transferrina, necesario para la oferta de hierro a las células eritroides, el del VEGF, cofactor en la estimulación de estas mismas células y el de la NOS2, necesario para la producción de NO, que permite el mantenimiento de cifras normales de presión arterial durante el efecto de la EPO, hasta el punto en que en ratones transgénicos para EPO humana, la inhibición de NOS provoca la muerte por complicaciones masivas cardiovasculares.

En patología, individuos con mutaciones estimuladoras de HIF-1 presentan policitemia familiar; del mismo modo, la eritrocitosis paraneoplásica se ha asociado a mutaciones del gen VHL que afectan su interacción con HIF-1. De especial interés, la EPO no solo tiene funciones como regulador de la eritropoyesis, sino que participa en diferentes mecanismos, entre otros la vascularización retiniana y de la glándula mamaria, diferenciación de adipocitos, maduración embrionaria de la cresta neural, citoprotección neuronal, de miocardiocitos y de túbulos renales en situaciones de isquemia/reperfusión.

El mecanismo exacto por el cual aumenta la EPO en la anemia humana no se ha dilucidado por completo; por ejemplo, en las Unidades de Cuidados Intensivos, los niveles de EPO pueden ser inapropiadamente bajos para el grado de anemia; las razones no se conocen suficientemente, pero la insuficiencia renal es probablemente un elemento significativo. En nuestro conocimiento, se carece de estudios acerca del HIF-1 de pacientes de cuidados intensivos.

## e. Enfermedad cardíaca

En la insuficiencia cardíaca (IC), en un contexto parecido al que referimos en la enfermedad pulmonar crónica, existe aumento de ET-1, que si bien tiene un efecto inotrópico positivo, en el largo plazo favorece la hipertrofia miocárdica y la mala adaptación. En la isquemia miocárdica, se han detectado aumentos de VEGF, relacionados con estimulación hipóxica.



Los niveles de VEGF en leucocitos expuestos a hipoxia se correlacionan con el grado de formación de colaterales que induce la isquemia coronaria in vivo, por lo que una disminución de la expresión de HIF-1/VEGF inducidos por isquemia representaría un factor de riesgo no descrito previamente. 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 recientemente descrito PR, péptido derivado de los macrófagos que induce angiogénesis miocárdica. Un segundo aspecto de interés es el del papel de HIF-1 en el acondicionamiento cardíaco ante la isquemia, en el que tiene un papel relevante la síntesis de nuevas proteínas en las primeras 24 h que siguen a un episodio agudo, con particular referencia a la NOS2 en miocardiocitos y células endoteliales. El HIF-1 es esencial en esta inducción.

La anemia es un factor patogénico relevante en la IC, cuyo origen está aún incompletamente dilucidado. La presencia de niveles elevados de EPO en pacientes con IC hace probable que HIF-1 esté estimulado, pero no se dispone aún de datos publicados en este sentido. Actualmente están en curso estudios, como el auspiciado por la Red Cardiovascular del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad, España) acerca de la patogenia de la anemia en la IC, que incluye medidas de HIF-1, pero del que no se han comunicado aún resultados.

## f. Tabaco/Humo

Algunos de los mecanismos de carcinogénesis mediada por los hidrocarburos policíclicos aromáticos, encontrados en el humo del tabaco y en la contaminación urbana, así como la de las dioxinas, depende de su unión al receptor aril hidrocarburo (AhR) y su dimerización con ARNT, proteína que también dimeriza con HIF-1. 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 (CO) producido en la combustión del cigarrillo. Esta supresión de genes angiogénicos puede ser determinante en los efectos del tabaco sobre la microcirculación, habiéndose propuesto terapéuticas basadas en la administración de vectores portadores de VEGF. Sin embargo, en un estudio en curso no se han encontrado diferencias en la respuesta de HIF-1 $\alpha$  hasta una semana después de haberse interrumpido el uso del tabaco en fumadores de más de 20 cigarrillos diarios.

## g. Preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado





En la preeclampsia, existe un fallo primario del trofoblasto para invadir el miometrio e inducir la remodelación de las arterias espirales uterinas durante la placentación. Esto provoca disminución de la perfusión de la unidad uteroplacentaria, condicionando hipoxia que activa HIF-1, promueve la expresión del factor de crecimiento de transformación  $\beta 3$  (TGF $\beta 3$ ) y la síntesis del receptor-1 soluble del VEGF (sVEGFR1), que bloquea al VEGF y empeora la perfusión de la placenta. En este contexto, son posibilidades terapéuticas la inhibición de HIF-1/TGF $\beta 3$  con oligonucleótidos antisentido, o la administración de VEGF.

En el crecimiento intrauterino retardado existe disminución de perfusión placentaria e hipoxia. IGFBP-1 (insulin growth factor binding protein-1) constituye un regulador negativo de IGF y éste está inducido por la presencia de sitios HREs en el promotor del gen que le da origen. IGFBP-1 está muy aumentado en sangre de cordón umbilical de neonatos con retraso de crecimiento.

## **h. Enfermedad inflamatoria intestinal**

La sobreexpresión de HIF-1 protege el epitelio colónico ante la inflamación, mientras que la ausencia de HIF-1 produce el efecto contrario.

## **i. Patología retiniana**

En modelos animales, se ha observado que la exposición a hiperoxia en el período neonatal, determina regresión vascular e isquemia, fenómenos similares a los descritos en la retinopatía de la prematuridad y que se relacionan con alteraciones de la expresión génica. Del mismo modo, se considera crucial el papel de péptidos como el VEGF en la neovascularización retiniana de la diabetes mellitus y otras retinopatías proliferativas. Este 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 genes dependientes.

## **j. Heridas**

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

La presente no es una revisión exhaustiva de los efectos de HIF-1, pero intenta dar una visión de conjunto de las circunstancias tan diversas en que este factor transcripcional se halla implicado y de las extraordinarias posibilidades terapéuticas que ofrecen su bloqueo o estimulación. En este sentido, HIF-1 representa el eje de un mecanismo central con múltiples



conexiones, por lo que la intervención sobre el mismo puede ser un instrumento esencial en el control de múltiples situaciones patológicas.

## 6. RESPUESTA DE LOS MACROFAGOS FRENTE A LA HIPOXIA

Los macrófagos están ubicados en el compartimiento estromal de tejidos, en condiciones fisiológicas normales, el número de estas células aumentan notablemente con el inicio y la progresión de muchos estados patológicos. Los mecanismos básicos de esta respuesta son descritos en condiciones como la cicatrización y tumores malignos, donde señales específicas de tejido mejoran la extravasación de monocitos sanguíneos y su diferenciación subsecuente en macrófagos. Pruebas recientes sugieren que los macrófagos también puedan ser estimulados por factores microambientales presentes en tejidos enfermos para realizar actividades distintas, específicas de tejido.

Un factor, la hipoxia (la tensión de oxígeno baja), es resultado de la perfusión insuficiente vascular de un tejido dado. Varios estudios han mostrado que la hipoxia experimental cambia la morfología, la expresión de marcadores de superficie de célula, viabilidad, fagocitosis, la actividad metabólica, y la liberación de citocinas por macrófagos.

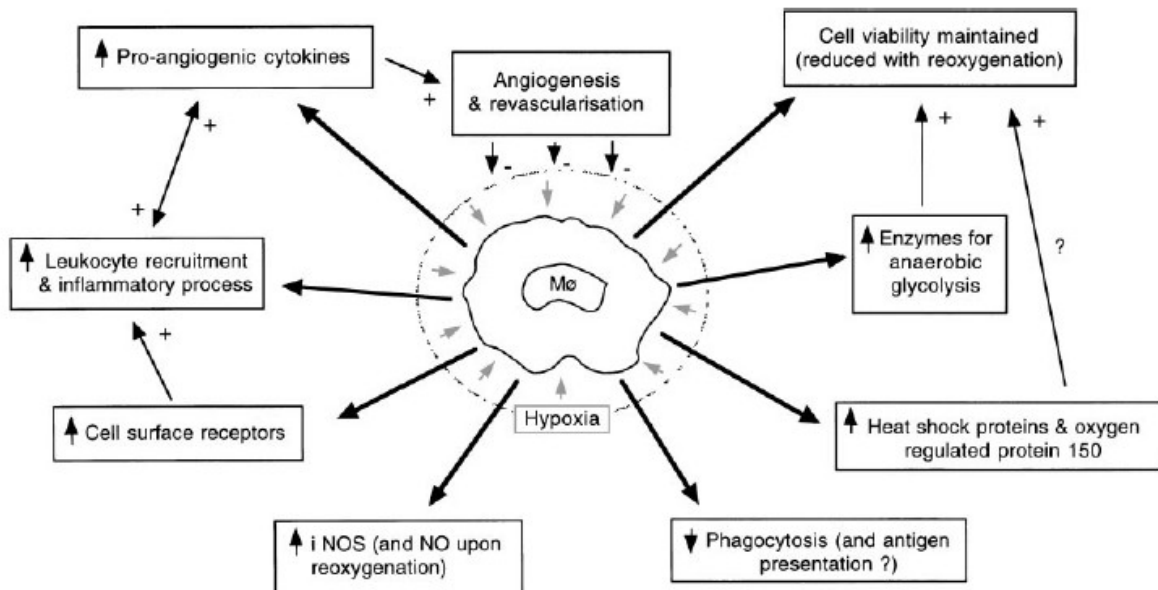
### 6.1 Hipoxia Y Macrofagos

Existe un aumento en numero de macrófagos en tejidos enfermos, muchos de ellos se acumulan en o adiacentemente a los vasos, sitios hipoxicos, donde el daño ocurrido en el tejido puede haber sido considerable. Niveles elevados de macrófago han sido encontrados en sitios avasculares y de necrosis en el pecho y carcinomas ovaricos, las áreas hipoxicas de heridas cutáneas, lugares avasculares de placas ateroscleroticas, la sinovia en articulaciones con la artritis reumatoidea, sitios isquemicos en retinopatía proliferativa, y alrededor de oclusiones vasculares cerebrales en el paludismo.

Los macrófagos son capaces de funcionar en tales condiciones adversas cambiando la expresión génica y adaptando su actividad metabólica. La hipoxia también puede inducir cambios marcados de la actividad secretoria de macrófagos, obteniendo la liberación tanto de pro-angiogénicos como de citocinas inflamatorio por macrófagos in vitro e in vivo.

### 6.2 Los Efectos De Hipoxia Sobre Actividad De Macrófago

**Figura 2:** resumen los efectos de pO<sub>2</sub> bajo sobre varias actividades de macrófago, los rasgos más importantes de cual son hablados en detalle.



### A. La Expresión De Marcadores De Superficie Celular

Monocitos responden a la hipoxia in vitro con la expresión aumentada del miembro de superfamilia integrina CD11b/CD18, sugiriendo que su capacidad de cruzar endotelio vascular y emigrar a tejidos isquémicos, inflamatorios.

Sin embargo, monocitos aislado de pacientes que sufren heridas traumáticas, incluyendo isquemia, expresó niveles más bajos de estos marcadores de "células a células" q diferencia de donantes sanos.

La producción tanto de receptores de superficie como del factor de necrosis de tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) elevada en la sangre en la hipoxia. Los estudios recientes también indican la expresión de CD87 (uroquinasa el receptor activador del plasminógeno, uPAR).

Como este receptor también ha sido implicado en la activación de varias enzimas proteolíticas vía la activación de plasmina, aumentado la actividad uPAR puede mejorar la actividad migratoria de monocitos y macrófagos. En realidad, la participación de este receptor en la



migración de macrófago ha sido demostrada recientemente. Sin embargo, un informe reciente por “Negus” demostró que la hipoxia puede inhibir directamente la actividad migratoria de los monocitos en humanos.

La hipoxia también inhibió la liberación de la proteína quimioattractantes (MCP-1; un macrófago potente quimiosina) inducido por TNF- $\alpha$ . Esto incitó a los investigadores a sugerir que la migración de macrófago dentro de tumores sólidos de hecho pueda ser arbitraria, simplemente se hacen células inmóviles en los sitios hipoxicos del tumor por un efecto directo de hipoxia sobre su actividad migratoria y debido a la presencia de niveles reducidos de quimioattractantes de macrófago.

## **B. Supervivencia de célula**

En diferentes estudios se han mostrado varios tipos de célula que sobreviven a la hipoxia crónica o severa por mecanismos adaptables que evitan el estrés normal de la apoptosis. En células de tumor esto es mediado, en parte, por la ausencia de la forma natural del gen supresor de tumor, p53, pero los mecanismos que funcionan en macrófagos aún tienen que ser determinados.

## **C. La Fagocitosis**

Una vía en la cual los macrófagos se adaptan a la presencia de hipoxia es proporcionando la energía para la función dependiente de movilidad, incluyendo la fagocitosis, de la glucólisis vía un fondo buffer de fosfato creatina. Sin embargo, ellos requieren el oxígeno para la actividad respiratoria asociada con una eficacia microbicida y la actividad digestiva tanto directamente por la producción de especies reactivas de oxígeno como el superóxido, como indirectamente por regulación intravacuolar y el pH a niveles óptimos para la actividad de enzima lisosomal. Esto, en parte, puede explicar por qué en numerosos estudios han descrito un efecto inhibitorio de hipoxia sobre la actividad fagocitaria de macrófagos in Vitro o en vivo.

Los macrófagos pulmonares alveolares de conejo mostraron reducción en la actividad fagocitaria con la exposición a la hipoxia en más de 1 h, aunque la viabilidad de célula permaneciera normal durante este período. Macrófagos pulmonares fueron incubados en el oxígeno aproximadamente del 2 % para 96 h. La fagocitosis anaerobia después de la hipoxia fue aumentada doblemente comparado con células en estado normoxico, pero la pinocitosis en normoxia fue inhibido en el 50 % después de la exposición a 6 h de pO<sub>2</sub> bajo. Esto no fue visto en macrófagos expuestos a la hipoxia crónica (p. ej., para 96 h).la Pinocitosis de célula en estado hipoxica fue aumentado considerablemente, aunque redujeran la proteína total “celular a células” hipoxicas comparado con otras normoxicas.



Histológicamente el análisis de células Kupffer expuestas a la hipoxia en un modelo de perfusión en hígado in situ demostró una reducción en la fagocitosis de carbón coloidal. La inhalación de aire que contiene el oxígeno aproximadamente del 10 % causó el paso menor de bacteria pulmonar que en estado de normoxia.

## **D. Actividad metabólica y producción de óxido nítrico**

Las células del sistema inmunológico innato son por lo general las primeras en llegar a los sitios de lesión, y son por lo tanto capaces de soportar la presencia de pO<sub>2</sub> bajo. Los neutrófilos son preadaptados porque contienen pocas mitocondrias y ganan la mayor parte de su energía de la glucólisis anaerobia. Los macrófagos por lo general llegan un poco después, y adaptan su actividad metabólica y aumentan en número cuando están expuestos a la hipoxia. La exposición a la hipoxia para 96 h notablemente redujo la actividad de citocromo oxidase (una enzima clave en fosforilación oxidativa) y aumentó piruvato cinasa y la actividad de los macrófagos alveolares en el conejillo de Indias. Además, la hipoxia también aumentó la actividad de una amplia gama de enzimas glicolíticas en macrófagos alveolares. Estas conclusiones sugieren que los macrófagos puedan adaptarse a la ausencia de oxígeno cambiando a vías glicolíticas anaerobias para la producción ATP, de esta manera se parece a las células malignas en condiciones de hypoxia.

Arginasa (L-arginine-urea hidrolase), se encontrado en tumores, en heridas, y los sitios de inflamación, el agotamiento de L-arginina en el espacio extracelular puede limitar la proliferación y la supervivencia de células vecinas. La L-arginina es convertida en el óxido nítrico (NO) por la forma de inducible de óxido nítrico sinteasa (iNOS) y NO media la vasodilatación, tiene propiedades antimicrobianas de macrófagos.

Sin embargo, la capacidad de hipoxia la activación de macrófagos para producir NO puede estar disminuida in vivo debido a los niveles reducidos de L-arginine debido al estímulo simultáneo arginase. Así pueden requerir la reoxigenación para la producción óptima de NO por macrófagos porque la hipoxia causa el agotamiento de sustrato, sobre todo en condiciones de flujo bajas. Bajo pO<sub>2</sub>. La reoxigenación puede ser un estímulo fisiológicamente relevante in vivo porque la hipoxia a menudo es transitoria en condiciones patológicas. En heridas, por ejemplo, el suministro de oxígeno gradualmente es restaurado durante la curación a niveles normales en tejidos. Cuando los tumores se hacen avasculares, desorganizó las vías y la proliferación de célula de tumor, rápidamente genera sitios de hipoxia que posteriormente se revascularizan y oxigena de nuevo. Esta hipoxia transitoria seguida de la nueva oxigenación podría producir condiciones necesarias para la producción NO sólo cuando la disponibilidad de sustrato lo permite.



## E. Secreción de Citocinas

A finales de los años 1970 era evidente que factores solubles liberados por macrófagos estuvieron implicados en la regulación de angiogenesis. En los años 1980, mostraron la hipoxia para estimular su liberación de pro-angiogenicos pero no identificado citocinas. En estudios en corneas de conejo expuestos a hipoxia se demostraron el potencial de factores solubles secretados por macrófago para inducir angiogenesis. Una relación inversa fue encontrada entre los niveles de oxígeno y unidades de angiogenesis, También hemos mostrado una correlación positiva entre el número de macrófagos y la presencia de angiogenesis en carcinomas de pecho y en tumores benignos ováricos.

Los macrófagos también parecen ser importantes para la iniciación de neovascularización en la curación de heridas. Fibroblastos entran en la herida, produciendo colágeno para reparar el área dañada, mientras que el brote de vasos sanguíneos también penetran la herida, formando el tejido de granulación. Los macrófagos aislados de heridas inducen angiogenesis en un ensayo de córnea de conejo y estimulan el depósito de colágeno.

Se piensa que la célula endotelial produce factores potentes proangiogenicos como TNF- $\alpha$ , el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento ácido o básico fibroblástico (a/bFGF), el factor de crecimiento sacado por plaqueta (PDGF), y factores/timidina fosforilasa (PDECGF/TP) median el papel de los macrófagos en la promoción de angiogenesis. Además, pruebas recientes han mostrado que la hipoxia estimula la liberación de estas proteínas.

TNF- $\alpha$  es citocinane multifuncional tanto como proinflamatoria como a favor de o efectos de anti-angiogenicos (dependiendo de la dosis aplicado). Ambas subpoblaciones células resistentes a la apoptosis, inducido por hipoxia y macrófagos apoptosis-resistentes productos de placas ateroscleroticas elevaron los niveles de esta citocina a favor de la inflamación al ser expuesto a la hipoxia. La línea de célula humana monocitica THP-1 también mostró una inducción grande de proteína TNF- $\alpha$  después de 24 h de exposición al oxígeno del 1 % acoplado con un aumento grande de la densidad de receptores TNF- $\alpha$ . Macrófagos humanos derivados de monocitos también han mostrado la expresión aumentada de TNF- $\alpha$  cuando expuesto al oxígeno del 3 % para 16 h en la presencia de estímulo LPS.

La exposición a pO<sub>2</sub> bajo estimula la liberación de VEGF por el monocito-macrofago humano. Cuando las células fueron preestimuladas con la IFN- $\gamma$  y luego expuestas al 2 % O<sub>2</sub> para 24 h, un aumento la liberación de VEGF, pero de manera insignificante el aumento de mRNA.

Otras formas de modificación post-transcripcional también pueden aumentar el bioactividad de VEGF producido por macrófagos.

Un estudio reciente también ha mostrado que la expresión del factor/enzima potente pro-angiogenicos, PDECGF/TP, por macrófagos en carcinomas de pecho es correlacionada positivamente con la angiogenesis del tumor.



Es interesante saber que los macrófagos en carcinomas de pecho también secreten el factor de crecimiento epidérmico (EGF), una llave mitogénica para células epiteliales. Aunque no haya ninguna prueba, hasta el momento, siendo estimuladas expresamente por la hipoxia, un informe reciente ha mostrado que algunas formas de EGF protegen células epiteliales de los efectos potencialmente dañinos de exposición a la hipoxia. Esto quiere decir que tales productos de macrófago pueden ayudar a mantener la viabilidad de células malignas epiteliales en las áreas hipoxicas de tumores o el crecimiento rápido de células normales epiteliales requeridas para reparar el tejido isquémico de la herida.

Los factores quimioatrayentes como la proteína inflamatoria - 1a (MIP-1a) e interleucina-8 (IL-8) atrae monocitos y otros leucocitos a sitios inflamatorios y es liberada por macrófagos en respuesta a la hipoxia in vitro. MIP-1a es citocina pro-inflamatorio y.

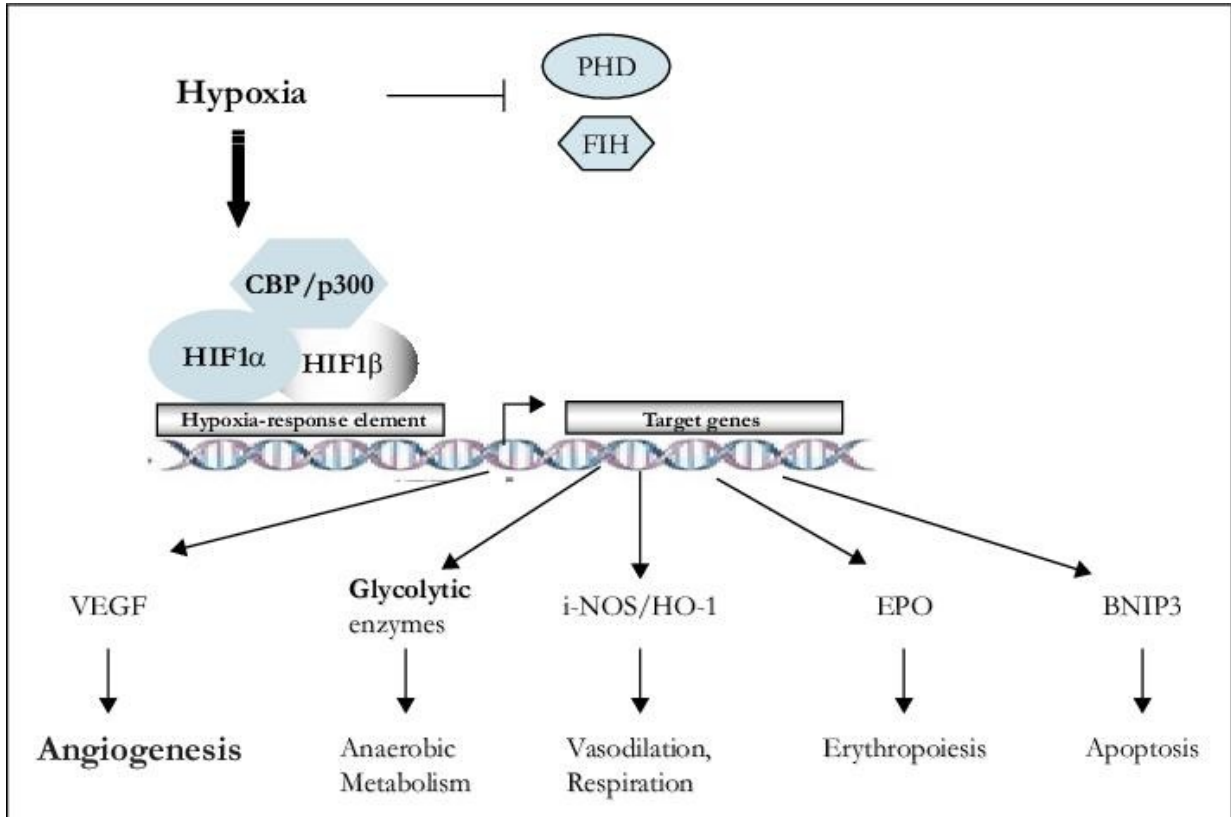
La anoxia seguida de una nueva oxigenación hiperóxica (encima de niveles de oxígeno ambientales) en macrófagos alveolares pretratados con LPS produjo un aumento de la expresión de MIP-1A mRNA y una inducción doble. Un régimen similar aumentó la producción de IL-8 mRNA y la proteína en monocitos y esta respuesta fue mejorada por el co-tratamiento con LPS. Así, los macrófagos y otros leucocitos pueden ser atraídos a áreas isquémica en el tejido enfermo por la inducción de tales factores quimioatrayentes en macrófagos.

La expresión de monofamilias a favor de inflamatorias, IL-1 y IL-6, por macrófagos no mostró ningún cambio perceptible bajo la hipoxia modelos químicamente inducido de hipotensión. Sin embargo, 2 h de exposición a anoxia aumentó la liberación de IL-1 y IL-6 por peritoneal en macrófagos, en respuesta a un desafío de LPS subsecuente.

Además, la respuesta IL-1 de macrófagos humanos alveolares a una exposición LPS mejorada cuando las células son expuestas simultáneamente a oxígeno del 0.05 % para 24 h. Otros estudios indican que, en ausencia de LPS, la hipoxia sólo estimula la liberación de IL-1 de monocitos humano o macrófagos durante un período de nueva oxigenación, cuando es provocado por la generación de radicales libres de oxígeno por las células.

La prostaglandina E2 (PGE2) es otro factor regulado por la hipoxia en macrófagos, aunque la inducción doble en PGE2 visto en macrófagos bajo la hipoxia químicamente inducida fue similar cuando las células fueron expuestas a LPS en ausencia de la hipoxia. Es interesante que la hipoxia también indujera una disminución quintuple en la presentación de antígenos de estas células. Como sin, el oxígeno es un reactante necesario para la formación de PGE2. Por lo tanto, en relaciones tensas de oxígeno bajas habrá un punto en el cual la síntesis PGE2 es afectada debido a la limitación de sustrato. También, PGH sintetasa, la enzima que precede PGE isomerasa, requiere de la enzima principal de peróxido. En pO2 bajo puede haber peróxido insuficiente disponible para iniciar y mucho menos mantener, ciclooxigenación.





**Figura 3:** Principales efectos de la hipoxia

### Comentario final

Aunque los macrófagos rutinariamente ayudan en el volumen de demanda de célula normal y en contra de la invasión de patógenos, es sólo cuando los tejidos son dañados por la enfermedad es que los macrófagos muestran su gran gama funcional, y el acto reaccionar ante muchos aspectos de inflamación subaguda y crónica y el proceso de curación. El tejido enfermo se diferencia del tejido sano de varios modos, en gran parte en la interrupción a microvasculatura normal necesariamente implicado por el daño de tejido.

Los macrófagos son capaces de funcionar en la hipoxia y demuestran una gama versátil de respuestas, incluyendo alteraciones en la morfología y marcadores superficiales, adaptaciones en la actividad metabólica, y el aumento de la producción de factores de crecimiento y citocinas. Las respuestas de macrófago a la hipoxia promueven la acumulación, la supervivencia y la activación de macrófagos y otros leucocitos en sitios de lesión, y estimulan neovascularización para reestablecer la perfusión y la oxigenación de tejido. Esta serie de acontecimientos es evidente en la cicatrización y tumores sólidos.



## 7. CONCLUSIONES

- La disminución del aporte de O<sub>2</sub> a las células, hipoxia, tiene como principales respuestas de las mismas el cambio a un metabolismo aeróbico y la regulación de la expresión génica que le permita adaptarse al estado hipóxico.
- La regulación génica tiene como objetivos generales aumentar la capacidad de la sangre para transportar O<sub>2</sub>, mejorar la vascularización y aumentar la ventilación, con el fin de aumentar el suministro de O<sub>2</sub> tisular.
- HIF-1 es el principal factor transcripcional encargado de la expresión génica en respuesta a la hipoxia.
- La regulación de HIF-1 esta mediada principalmente por hidroxilasas (PHDs y FIH) que actuan como los verdaderos sensores de O<sub>2</sub>.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MICHIELS, Carine. **Physiological and Pathological Responses to Hypoxia.** *AJP June 2004, Vol. 164, No. 6*
- MARC HEIDBREder, Frederike Fro" Hlich, Olaf Jo" Hren, Andreas Dendorfer, Fatimunnisa Qadri, And Peter Dominiak. **Hypoxia rapidly activates HIF-3 mRNA expression** Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, University of Luebeck, D-23538 Luebeck, Germany
- CAMELO, Carlos, PENA DEUDERO, Juan J., CASTILLA, Ángeles *et al.* **Respuesta a la hipoxia: Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica.** *Medicina (B. Aires), mar./abr. 2006, vol.66, no.2, p.155-164. ISSN 0025-7680.*
- SEMENZA, Greg. **Involvement of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Pulmonary Pathophysiology.** *Chest Journal, 2005; 128; 592-594.*
- WENGER, Roland. **Cellular adaptation to hypoxia. O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression.** *FASEB Journal (Alemania), agosto 2002, vol.16, p.1151-1162.*
- BRUSSELMANS, Koen, COMPERNOLLE, Veerle *et al.* **Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia.** *J. Clin. Invest. 111:1519–1527 (2003).*
- SEMENZA, Greg. **HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia.** *J.Appl Physiol 88: 1474-1480, 2000.*



- HAMPL, Václav y HERGET Jan. **Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Chronic Pulmonary Hipertensión.** *Physiological Reviews*. Vol.80. no.4, Octubre, 2000.
- COSTA BARRETO, Alessandra, MEIKEN FRANCHI, Sônia et al. **Hipertensão Arterial Pulmonar. Fisiopatología, Aspectos Genéticos e Resposta ao Uso Crónico do Silfenafil.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. Agosto, 2005, Vol.85, no.2 p. 145-154.
- JEWEL, Ursula, KTIETIKOVA, Ivica et al. **Induction of HIF-1 $\alpha$  in response to hypoxia is instantaneous.** *FASEB*, 0892-6638/01/0015-1312

## Páginas Web:

- [www.biolaster.com/hipoxia/rendimiento\\_fisico/hipoxia\\_HIF](http://www.biolaster.com/hipoxia/rendimiento_fisico/hipoxia_HIF) - 15k -
- <http://www.fasebj.org/cgi/content/full/16/10/1151>
- <http://ccforum.com/content/7/1/47/figure/F1>
- [http://www.biolaster.com/hipoxia/rendimiento\\_fisico/hipoxia\\_HIF](http://www.biolaster.com/hipoxia/rendimiento_fisico/hipoxia_HIF)
- <http://www.jle.com/fr/revues/medecine/bdc/e-docs/00/04/1D/89/article.md?fichier=images>
- [http://www.biocompare.com/gene/gene\\_pathway.asp?pathwayid=164](http://www.biocompare.com/gene/gene_pathway.asp?pathwayid=164)



**INDICE**

	<b>Págs.</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
9. <b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
10. <b>DEFINICION DE HIPOXIA</b>	<b>2</b>
11. <b>RESPUESTAS FISIOPATOLÓGICAS A LA HIPOXIA</b>	<b>2</b>
<b>RESPUESTAS FISIOLÓGICAS</b>	<b>3</b>
d. <b>Respuestas sistémicas</b>	<b>3</b>
➤ <i>Células del músculo liso vascular.</i>	<b>3</b>
➤ <i>Cuerpos carotídeo y neuroepiteliales.</i>	<b>4</b>
e. <b>Regulación del metabolismo celular</b>	<b>5</b>
➤ <i>Efecto de la hipoxia en las mitocondrias.</i>	<b>5</b>
➤ <i>Adaptación a la hipoxia.</i>	<b>6</b>
f. <b>Regulación de la expresión génica</b>	<b>6</b>
<b>RESPUESTAS PATOLÓGICAS</b>	<b>8</b>
c. <b>INJURIA POR REPERFUSIÓN</b>	<b>8</b>
➤ <i>Isquemia cerebral.</i>	<b>8</b>
➤ <i>Isquemia miocárdica.</i>	<b>8</b>
d. <b>ANGIOGÉNESIS TUMORAL</b>	<b>9</b>
12. <b>FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA-1 (HIF-1)</b>	<b>9</b>
<b>HIF-1 EN ESTADOS DE NORMOXIA</b>	<b>10</b>
d. <b>Hidroxilación de dominios ODD y TAD</b>	<b>11</b>
e. <b>Ubiquitinización por el complejo E3 ubiquitin ligasa</b>	<b>11</b>
f. <b>Degradación proteasomal</b>	<b>11</b>
<b>HIF-1 EN ESTADO DE HIPOXIA</b>	<b>12</b>
e. <b>Fosforilación de HIF-1<sup>a</sup></b>	<b>13</b>
f. <b>Translocación de HIF-1<sup>a</sup> al núcleo y rol de HIF-1b</b>	<b>13</b>
g. <b>Reclutamiento de los cofactores transcripcionales</b>	<b>13</b>
h. <b>Unión al DNA y ensamblaje del complejo transcripcional.</b>	<b>13</b>



<b>OTRAS VÍAS DE ESTIMULACIÓN Y REGULACIÓN DE HIF-1</b>	<b>14</b>
<b>GENES BLANCO DE HIF-1</b>	<b>15</b>
d. Genes involucrados en la hematopoyesis y metabolismo de Fe <sup>++</sup>	15
e. Genes involucrados en la biología vascular	16
f. Genes involucrados en el metabolismo de la glucosa	16
d. Genes involucrados en la proliferación celular	17
<b>FUNCIONES DE HIF-1</b>	<b>18</b>
<b>HIF-1, HIPOXIA Y CITOPROTECCIÓN:</b>	<b>18</b>
<b>13. ROL DEL HIF-1 EN DIFERENTES PATOLOGÍAS</b>	<b>19</b>
<b>B. Aspectos clínicos</b>	<b>19</b>
a. Enfermedad pulmonar crónica	19
b. Patología tumoral	20
c. Shock hemorrágico:	21
d. Anemia y eritropoyetina	21
e. Enfermedad cardíaca	21
f. Tabaco/Humo	22
g. Preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado	23
h. Enfermedad inflamatoria intestinal	23
i. Patología retiniana	23
j. Heridas	23
<b>14. RESPUESTA DE LOS MACROFAGOS FRENTE A LA HIPOXIA</b>	<b>24</b>
<b>6.1 Hipoxia Y Macrofagos</b>	<b>24</b>
<b>6.2 Los Efectos De Hipoxia Sobre Actividad De Macrófago</b>	<b>25</b>
F. La Expresión De Marcadores De Superficie Celular	25
G. Supervivencia de célula	26
H. La Fagocitosis	26
I. Actividad metabólica y producción de óxido nítrico	27
J. Secreción de Citocinas	28
<b>Comentario final</b>	<b>30</b>
<b>15. CONCLUSIONES</b>	<b>31</b>
<b>16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>31</b>
<b>Páginas Web:</b>	<b>32</b>

