

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Efecto de la hipoxia sobre la quimiosensibilidad al 5-fluorouracilo
en células Hela.**

**Efecto da hipoxia sobre a quimiosensibilidade ao 5-fluorouracilo
en células Hela.**

**Effect of hypoxia on chemosensitivity to 5-Fluorouracil
in HeLa cells.**

**Sandra M Catalán Jiménez
Septiembre 2017**

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Índice

Resumen	1.
1. Introducción	3.
1.1. Hipoxia en los tumores	3.
1.1.1. Causas que producen hipoxia	3.
1.1.2. Detección y señalización de la hipoxia	4.
1.1.3. Efectos de la hipoxia	4.
1.1.4. Resistencia a fármacos inducida por hipoxia	10.
1.2. Agentes miméticos de hipoxia	12.
1.3. 5-Fluorouracilo (5-FU)	13.
2. Objetivos	15.
3. Material y Métodos	17.
3.1. Línea celular HeLa y condiciones de cultivo	17.
3.2. Ensayos de viabilidad celular	17.
3.2.1. Ensayo de Quimiosensibilidad – MTT	18.
3.2.2. Ensayo de apoptosis - Caspasa-3/7	18.
3.3. Toma de imágenes al microscopio	19.
3.4. SDS-PAGE y Western Blot	19.
3.5. Gráficas y estadísticas	20.
4. Resultados	21.
4.1. Uso del CoCl_2 para desarrollar un modelo de hipoxia mimética	21.
4.2. Ensayo de dosis-respuesta para el 5-FU	22.
4.3. Efecto de la hipoxia mimética sobre la viabilidad con 5-FU	24.
4.4. Ensayo de apoptosis - Caspasa-3/7	26.
4.5. SDS-PAGE y Western Blot	27.
5. Discusión	29.
6.-Conclusiones	33.
Agradecimientos	35.
Referencias	37.

Abstract

A common characteristic of most solid tumours are regions of hypoxia, which have been shown to promote tumour progression by triggering angiogenesis, assisting metastasis and increasing resistance to therapy. There are several studies related to the role of physiological hypoxia in the sensitivity to chemotherapeutic agents, but very few studies have been done with models using mimetic agents of hypoxia. The purpose of this study was to evaluate the effect of cobalt chloride (CoCl_2) as a hypoxia- mimetic model to study sensibility of the human cervical cancer cell line HeLa, to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil (5-FU). Cell cultures were treated with 5-FU in the presence or absence of CoCl_2 . HeLa cells were shown to be more sensitive to treatment with 5-FU in the presence of CoCl_2 , showing highest levels of the apoptotic death markers, caspases 3 and 7, when treated with the CoCl_2 and 5-FU simultaneously. Therefore, this study suggests that CoCl_2 is an effective hypoxia-mimetic agent, and cells treated with 5-FU and CoCl_2 die by apoptosis, behaving in the same way as they do under physiological hypoxia.

Resumen

Una característica común de la mayoría de los tumores sólidos son las regiones de hipoxia, las cuales han demostrado promover la progresión tumoral desencadenando angiogénesis, colaborando en la metástasis y aumentando la resistencia a la terapia. Hay diversos estudios acerca del papel de la hipoxia fisiológica en la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos, pero son pocos los estudios realizados en modelos de hipoxia mimética. El propósito de este estudio fue evaluar el efecto del agente mimético de hipoxia, cloruro de cobalto (CoCl_2), en la sensibilidad de la línea celular humana de cáncer cervical HeLa, al agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo (5-FU). Los cultivos celulares fueron tratados con 5-FU en presencia y ausencia de CoCl_2 . Las células HeLa mostraron ser más sensibles al tratamiento con 5-FU en presencia de CoCl_2 , encontrándose niveles más altos de marcadores apoptóticos, caspasas 3 y 7, en el tratamiento conjunto que cuando se trataron con CoCl_2 y 5-FU por separado. Por lo tanto, este estudio sugiere que el CoCl_2 es un agente mimético de hipoxia efectivo, y las células tratadas con CoCl_2 y 5-FU mueren por apoptosis, comportándose de la misma manera que lo hacen en condiciones de hipoxia fisiológica.

Resumo

Unha característica común na maioría dos tumores sólidos é a presenza de rexións hipóxicas, que promoven a progresión do tumor, a anxioxénese, metástases e aumentan a resistencia as terapias. Hai varios estudos sobre o papel fisiolóxico da hipoxia na sensibilidade aos axentes quimioterapêuticos, mais poucos empregando modelos miméticos da hipoxia. O obxectivo deste estudo foi avaliar o efecto do mimetico da hipoxia, cloruro de cobalto (CoCl_2) na sensibilidade da liña celular humana do cancro cervical HeLa, o axente quimioterapêutico 5-fluorouracilo (5-FU). Os cultivos celulares foron tratados con 5-FU na presenza e ausencia de CoCl_2 . As células HeLa mostráronse máis sensibles ao tratamento con 5-FU, en presenza de CoCl_2 , que mostra os niveis máis elevados de marcadores de apoptose, as caspases 3 e 7, que cando foron tratadas co CoCl_2 e 5-FU ailladamente. Polo tanto, este estudo suxire que o CoCl_2 é un axente mimético de hipoxia eficaz, e cando tratouse con CoCl_2 e 5-FU as células morreron por apoptose, semellante o que sucede nés condicións de hipoxia fisiolóxicas.

1. Introducción

1.1 Hipoxia en los tumores

Son muchos y variables los microambientes en los que se puede encontrar un tumor, sin embargo, la mayoría de ellos se enfrentan a condiciones de hipoxia.

Hipoxia es la condición en la que las células o tejidos no reciben suficiente nivel de oxígeno para igualar su consumo. Comprender los mecanismos que la hipoxia genera despierta un gran interés ya que nos ayudaría a entender mejor la evolución tumoral y desarrollar tratamientos más efectivos.

El foco principal de la investigación de hipoxia durante la mayor parte del siglo 20 fue su papel en las respuestas al tratamiento del cáncer. Ya en 1909, se observó que las células normales de mamíferos irradiadas bajo condiciones de hipoxia eran menos sensibles a la radiación que las irradiadas en presencia de oxígeno (Schwarz, 1909). También se ha demostrado que la hipoxia puede disminuir la eficacia de ciertos fármacos citotóxicos como el carboplatino, la carmustina y el melfalán (Teicher et al., 1990, Littlewood, 2001). Además de inhibir la eficacia del tratamiento, se ha demostrado que la hipoxia puede incrementar la progresión maligna (Wang et al., 2014; De Oliveira et al., 2015).

1.1.1. Causas que producen hipoxia

Existen tres causas principales de hipoxia dentro de un tumor (Vaupel et al., 2001; Höckel et al., 2001a).

1. **Hipoxia relacionada con la perfusión** – Está causada por un nivel insuficiente de sangre en la vascularización. Los tumores suelen presentar frecuentes anomalías de la estructura de la micro-vascularización que los rodea, debido a la pérdida de regulación normal dentro de la masa tumoral. Estas pueden incluir dilataciones irregulares de los vasos, una red vascular desorganizada y un revestimiento endotelial imperfecto. Este tipo de causa se relaciona con hipoxia isquémica que puede ser intermitente.
2. **Hipoxia relacionada con la difusión** - Causada por un aumento en la distancia entre las células tumorales y los vasos sanguíneos. A medida que proliferan las células tumorales, el tumor puede aumentar de tamaño a una velocidad más rápida que la angiogénesis. Esto hace que determinadas áreas del tumor estén demasiado lejos de un vaso sanguíneo (> 70 μm) y no puedan recibir un volumen suficiente de oxígeno.

3. **Hipoxia anémica** – Se produce cuando la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre se ve afectada debido a la anemia asociada al tumor o a la terapia. Una condición similar se puede observar en pacientes que son fumadores crónicos. Fumar provoca que la hemoglobina se una al monóxido de carbono en lugar del oxígeno, disminuyendo así los niveles de oxígeno en la sangre, causando hipoxia similar a la anemia.

La hipoxia aparece de manera temprana dentro de los tumores en desarrollo. Cualquier tumor que alcance un diámetro por encima de 1 mm sin que se forme un nuevo suministro sanguíneo, comienza a hacerse hipóxico (Folkman, 1990, Folkman et al 1992, Helminger et al, 1997). Es curioso que, aunque los tumores inician procesos angiogénicos y la formación de nuevos vasos sanguíneos, la demanda de oxígeno que tienen normalmente excede el suministro que les llega.

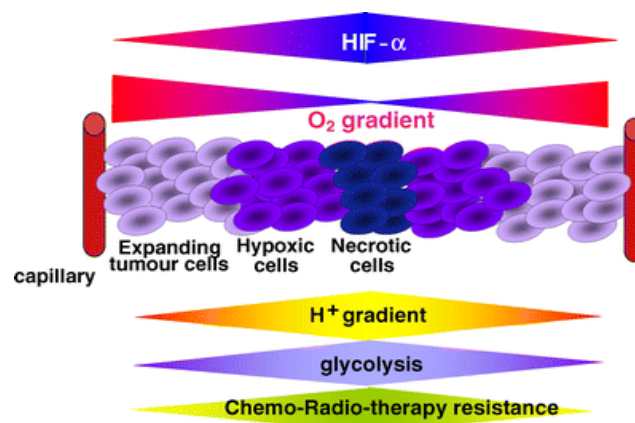


Figura 1. Características de la hipoxia dentro de un tumor. Los capilares llevan oxígeno a los tejidos, pero como el oxígeno tiene un límite de difusión, su concentración disminuye a medida que aumenta la distancia desde los capilares. Esto da como resultado regiones hipóxicas y necróticas de las células que están más alejadas de los capilares y encontraremos las células en expansión cerca de los capilares donde la oferta de oxígeno es mayor. Este gradiente de viabilidad celular es paralelo a un gradiente decreciente de oxígeno, que se acompaña de un aumento en los niveles de HIF-1 α (subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia), una disminución del pH extracelular y un aumento de la resistencia a radioterapia y quimioterapia (Figura modificada de: Brahimi-Horn et al., 2007).

1.1.2. Detección y señalización de la hipoxia

El oxígeno es necesario en muchos procesos metabólicos y para la producción de ATP en las células. Se han propuesto diversos mecanismos que funcionan en la célula para detectar los niveles de oxígeno en las células, tales como los niveles de expresión de proteínas, las enzimas prolin hidroxilasa (PHD) que requieren oxígeno para su actividad, y la propia cadena de transporte de electrones (Brahimi-Horn et al.2007; Prabhakar et al., 2015).

1.1.2.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

En hipoxia, las mitocondrias liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden controlar las respuestas postraduccionales y transcripcionales (Schumacker, 2003). La cadena de transporte de electrones dentro de las mitocondrias está controlada por el complejo II y el complejo III que son centros redox unidos a proteínas. Las ROS se liberan del complejo III (una Coenzima Q-citocromo *c* reductasa). En el mecanismo normal de transporte de electrones dentro de las mitocondrias, el ubiquinol se forma a partir de ubiquinona que genera un radical libre. Este radical libre puede entonces formar un superóxido donando su electrón desemparejado a una molécula de O_2 . El superóxido formado se convierte en peróxido de hidrógeno que desencadena las vías de señalización que conducen a la activación del Factor Inducible de Hipoxia (HIF). Sin embargo, en hipoxia la generación de ROS de este sitio se incrementa, posiblemente por el aumento de la vida de la ubisemiquinona en el complejo III (Smith et al., 2017) desencadenando otras vías de señalización.

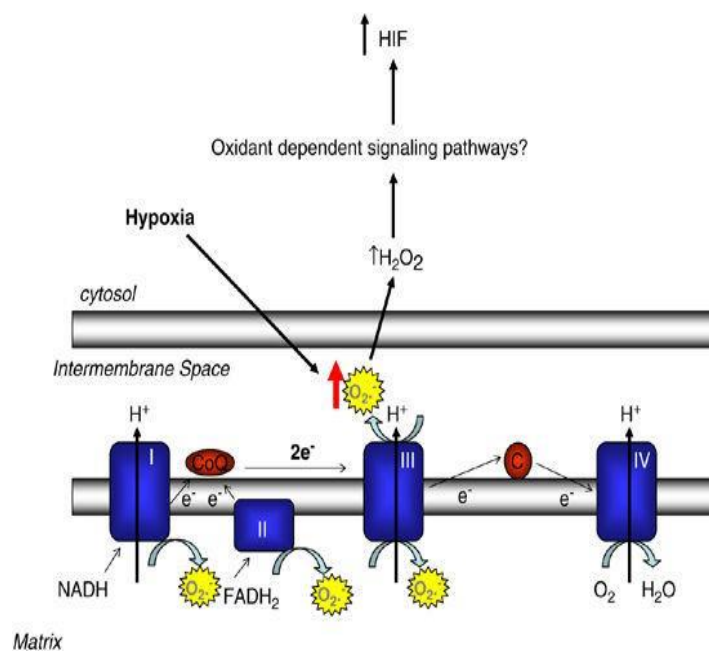


Figura 2. Cadena transportadora de electrones mitocondrial generando ROS. La cadena transportadora de electrones mitocondrial puede generar superóxido en los complejos I, II (en la matriz mitocondrial) y III (en la matriz y el espacio intermembrana). Se propone que el complejo III como parte del mecanismo de detección de oxígeno. La hipoxia lleva al complejo III a liberar superóxido en el citosol donde se convierte en H_2O_2 . Esto desemboca en la activación de HIF. (Figura modificada de: Klimova et al., 2008).

1.1.2.2 Síntesis de proteínas

Se ha demostrado que la hipoxia es capaz de inhibir la síntesis de proteínas con el fin de conservar la energía (Heacock et al., 1990). La diana de rapamicina en células de mamífero o mTOR es una serin-treonin proteína-quinasa que regula positivamente la fosforilación de la quinasa ribosomal p70 S6 (S6K1) y el factor de iniciación eucariótico eIF4E unido a la proteína 1 (4E-BP1). mTOR puede formar dos complejos de señalización llamados mTORC1 y mTORC2. El complejo mTOR1 coordina el crecimiento celular y el metabolismo, actuando como un punto de restricción bajo condiciones de estrés tales como hipoxia.

La inhibición de mTOR por rapamicina da lugar a la hipofosforilación de 4E-BP1 que de esta forma se une fuertemente a eIF4E evitando la asociación de eIF4E con eIF4G y la formación del complejo de iniciación eIF4F, inhibiendo con ello la traducción dependiente de la caperuza de mRNA (Hay et al. 2004). La hipoxia induce hipofosforilación de mTOR1 y sus efectores, siendo esta reacción comparable a la que experimenta una célula tratada con rapamicina. Por lo tanto, a niveles bajos de oxígeno, mTOR puede inhibir la expresión de proteínas. Sin embargo, las señales por las cuales la hipoxia suprime mTORC1 sólo se comprenden parcialmente, y se desconoce un enlace directo entre el estrés fisiológico impulsado por hipoxia y la regulación de la señalización de mTORC1 (Cam et al., 2010).

Además de la inhibición de mTOR, la hipoxia puede desencadenar la activación de PERK (*pancreatic endoplasmic reticulum kinase*), así como la fosforilación en la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eIF2 α (Koumenis et al., 2002; Mujcic et al., 2013). Paradójicamente, la fosforilación de eIF2 α también da como resultado una traducción selectiva del factor activador de la transcripción 4 (ATF4). ATF4 controla la expresión de una amplia gama de genes adaptativos que permiten a las células soportar períodos de estrés, como es el caso de la hipoxia. Sin embargo, en condiciones de estrés persistente, ATF4 promueve la inducción de la apoptosis (Wortel et al., 2017).

1.1.2.3 Enzimas proil hidroxilasa (PHD)

Los factores inducibles de hipoxia (HIFs) son factores de transcripción que responden a disminuciones en los niveles de oxígeno celular. HIF-1 se compone de dos subunidades: HIF- α es una subunidad sensible al oxígeno que se estabiliza en condiciones hipóxicas y HIF- β que se expresa constitutivamente (Wang et al., 1995; Yang et al., 2014). HIF se regula mediante hidroxilación dependiente de oxígeno en aminoácidos específicos asparragina y prolina dentro de las diferentes subunidades. Se ha demostrado que hay al menos tres enzimas proil-hidroxilasas (PHDs) que hidroxilan HIF en residuos de prolina específicos - PHD-1, PHD-2 y PHD-

3 (Berra et al., 2003; Miikkulainen et al., 2017). Bajo niveles normales de oxígeno la subunidad HIF-1 α es hidroxilada en estos residuos de prolina promoviendo su unión a la proteína supresora tumoral von Hippel-Lindau (pVHL) que marca al HIF1- α para su degradación proteolítica. Sin embargo, en condiciones hipóxicas, las PHDs ya no pueden hidroxilar HIF1- α , por lo tanto, no se une a pVHL y no se degrada (Giaccia et al, 2004).

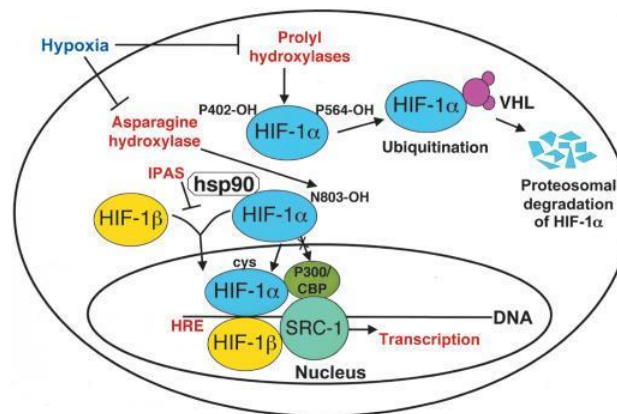


Figura 3. Mecanismos de regulación de HIF-1 α . Bajo condiciones aeróbicas, HIF-1 α es hidroxilado en la prolina 402 y 564. Las hidroxilaciones de prolina son necesarias para que se produzca la unión a VHL y HIF-1 α sea degradado tras ubiquitinación por el proteasoma. La asparagina hidroxilasa evita la unión a p300 / CBP dando como resultado la translocación de HIF-1 α al núcleo donde actúa como factor de transcripción para más de 30 genes que contienen elementos de respuesta a hipoxia (HREs) tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Figura modificada de: Giaccia et al., 2004).

1.1.3 Efectos de la hipoxia

La hipoxia puede tener dos efectos diferentes en una célula cancerosa. Puede actuar como un factor de estrés, actuando sobre la célula para inhibir el crecimiento, haciendo que la célula muera por apoptosis o necrosis. Alternativamente, la hipoxia puede desencadenar progresión maligna, así como disminuir la eficacia de ciertos fármacos quimioterapéuticos y aumentar la resistencia a radioterapia (Burroughs et al., 2013). Estos efectos contrapuestos se deben principalmente a los cambios genómicos y proteómicos inducidos por la hipoxia dentro de las células.

Se sabe que las mutaciones en oncogenes y en genes supresores de tumores juegan un papel clave en la agresividad de un tumor. Se ha demostrado que la hipoxia ($pO_2 \leq 0,7$ mm Hg) disminuye la estabilidad genómica, haciendo más fácil la aparición de mutaciones. La hipoxia influye además mediante la selección clonal, ya que las células tumorales que tienen mutaciones adecuadas a condiciones hipóxicas, tales como una vía apoptótica errónea o menor probabilidad

de detención del ciclo celular, pueden sobrevivir mejor y proliferar en estas condiciones (Höckel et al., 2001b).

El factor inducible de hipoxia alfa (HIF-1 α), regula más de 30 genes diferentes, incluyendo aquellos relacionados con eritropoyesis, angiogénesis, control del pH y metástasis (Semenza, 2007; Han et al., 2017). Algunos de los genes clave regulados son p21 y p27 que inhiben las quinasas dependientes de ciclina que causan la detención del ciclo celular en el punto de control G1 / S (Goda et al, 2003 Koshiji et al., 2004; Hubbi et al., 2013).

La hipoxia también puede conducir a la apoptosis para prevenir la acumulación de mutaciones basadas en la inestabilidad del ADN inducida por la propia hipoxia. (Koumenis et al, 2001, Liu et al, 2007). La apoptosis es una forma de muerte celular programada que da como resultado la fragmentación del ADN, invaginación y fragmentación de la membrana celular y nuclear, y formación de cuerpos apoptóticos. A diferencia de la necrosis, el proceso depende del ATP y está regulado por una cascada de proteínas, las caspasas. Las caspasas se encuentran normalmente en formas pro-zimógeno y se activan por proteólisis. Existe un alto nivel de regulación para controlar si una célula se convierte en apoptótica, con un equilibrio entre reguladores positivos tales como Bax, Bak y Bad y reguladores negativos tales como Bcl-2. Un regulador importante es p53 que se estabiliza después del daño del ADN; p53 induce Bax y Bak que a su vez controlan la liberación del citocromo c de las mitocondrias que desencadena la activación de la cascada de caspasas. El citocromo c se une al factor activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) que activa la caspasa 9, que a su vez escinde las caspasas 6 y 3, dando como resultado final la muerte celular apoptótica intrínseca (Greijer et al., 2004).

La hipoxia es capaz de desencadenar la apoptosis debido a que la falta de oxígeno inhibe el transporte de protones mitocondrial y produce una disminución en el potencial de membrana. Esto activa a Bax y Bak de modo que el citocromo c se libera y la cascada de caspasas se activa. Como se ha mencionado anteriormente, también hay un aumento paradójico en los niveles de ROS (Schumacker, 2003; Desireddi et al., 2010) provocando que la caspasa 9 sea escindida directamente por las caspasas 12 y 3 sin la participación del citocromo c.

HIF-1 α también está involucrado en la apoptosis inducida por hipoxia mediante dos mecanismos mediados por p53 y BNIP3. Se sugiere que HIF-1 α estabiliza el gen supresor tumoral p53 uniéndose a él, y por lo tanto inhibiendo a Mdm2, una ubiquitina ligasa que habitualmente marca a p53 para su degradación proteolítica (Chen et al., 2003).

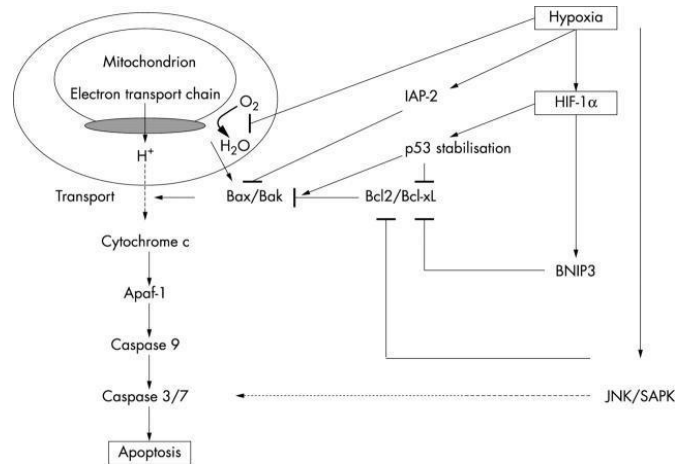


Figura 4. Vías de señalización de hipoxia y apoptosis. Representación esquemática de las vías de señalización inducidas por hipoxia que conducen a apoptosis. Las líneas en negrita indican interacciones directas, las líneas discontinuas representan interacciones indirectas (Figura modificada de: Greijer et al., 2004).

En las zonas peri-necróticas hipóxicas, se sobreexpresa BNIP3 (*Bcl-2 19 kilodalton interacting protein 3*) que induce la apoptosis por unión e inhibición de Bcl-2 y Bcl-xL (Sowter et al., 2001). El HIF-1 α está implicado en la expresión de BNIP3, actuando como factor de transcripción.

En contraste con estos datos, también se ha sugerido que la hipoxia puede provocar metástasis e invasión (Rankin et al., 2016). La hipoxia permite que las células superen el ambiente inhóspito en el que se encuentran mediante el metabolismo y la regulación del pH (Brahimi-Horn et al., 2007; Swietach et al., 2007).

Las células cancerosas también generan ATP mediante fermentación (Brahimi-Horn et al., 2007). Este es un proceso mucho más simple; sin embargo, no es tan eficiente, resultando en un número reducido de moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada. Las células tumorales son capaces de compensar esta situación aumentando la cantidad de transportadores de glucosa, la tasa de glucólisis y la conversión de glucosa en piruvato. Esto se logra a través de la regulación con HIF-1 de dos enzimas clave: la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1) y la lactato deshidrogenasa A (LDH-A) (Kim et al, 2006, Fantin et al, 2006). PDK1 inhibe la piruvato deshidrogenasa encargada de dirigir el piruvato al ciclo del ácido tricarboxílico, asociado en la mitocondria a la fosforilación oxidativa, y la LDH-A que convierte el piruvato en lactato en la fermentación. Por lo tanto, basándose en la regulación positiva de HIF-1 de LDH-A y PDK1, la respiración mitocondrial es reprimida y la glucólisis anaerobia aumenta. Esto hace que la respiración sea menos eficiente, pero permite que la supervivencia de las células cancerosas en hipoxia sea mayor (Gordan et al., 2007; Semenza et al., 2013).

La fermentación implica que las células tienen que superar la acidosis metabólica producida por el paso de piruvato a ácido láctico que genera una disminución del pH extracelular (Swietach et al., 2007). Sin embargo, basándose en la regulación positiva de varios transportadores de membrana, las células cancerosas son capaces de mantener un pH intracelular normal (Alfarouk et al., 2014; Amith et al., 2015).

Las condiciones de hipoxia pueden iniciar la diseminación metastásica y la invasión. En estas circunstancias restrictivas de oxígeno se produce la pérdida de E-cadherina, proteína necesaria para que se formen las uniones adherentes entre células vecinas. La E-catenina tiene un papel paradójico en la progresión tumoral. Aunque la adquisición de un fenotipo tumoral invasivo se ha asociado con una pérdida de E-catenina durante el proceso de transición epidérmica mesenquimal, hay estudios que muestran que los tumores son bastante heterogéneos y la pérdida de E-cadherina no siempre se asocia con un mayor comportamiento invasivo. Del mismo modo el mantenimiento de la expresión de la cadherina-E no es un perjuicio para la invasión y metástasis (Chu et al., 2013).

1.1.4 Resistencia a fármacos inducida por hipoxia

Un obstáculo importante en el tratamiento del cáncer es la resistencia primaria o adquirida a la quimioterapia. Esta resistencia puede deberse a una amplia variedad de razones multifactoriales, por ejemplo, células que debido a un metabolismo inadecuado del fármaco lo expulsan a través de bombas de eflujo (Gatti et al., 2005). Durante décadas se ha observado como la hipoxia reduce el efecto de varios agentes quimioterapéuticos, así como la radioterapia (Gray et al., 1953, Roizin-Towle et al., 1978). La mayoría de los fármacos contra el cáncer funcionan dirigiéndose a células que proliferan rápidamente, sin embargo, como se mencionó anteriormente, la hipoxia puede inducir la detención del ciclo celular, inhibiendo automáticamente la eficacia de este tratamiento. La mayoría de los nuevos productos terapéuticos siguen dependiendo de la focalización en células proliferantes. La comprensión de los mecanismos de resistencia a fármacos inducida por hipoxia es importante en la creación de terapias que superen este efecto y se ha demostrado que HIF está implicado en este proceso de resistencia (Lv et al., 2015; Ai et al., 2016; Shan et al., 2016).

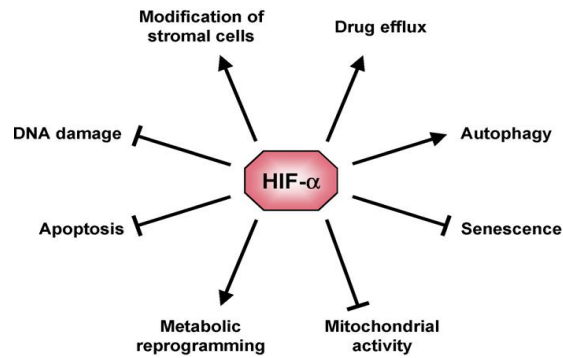


Figura 6. Resistencia a fármacos mediada por HIF- α . Este diagrama muestra los mecanismos implicados en la resistencia a los fármacos mediada por HIF- α , incluyendo el aumento de bombas de eflujo de fármacos y la reprogramación del metabolismo de fármacos, así como la inhibición de la apoptosis y la senescencia. (Figura de: Rohwer et al., 2011).

La estabilización hipóxica de HIF-1 es capaz de activar el gen MDR1 (gen de resistencia a múltiples fármacos 1) MDR1 codifica un transportador llamado P-gp (glicoproteína P residente en la membrana) que actúa como una bomba de eflujo de fármaco dependiente de ATP. Por lo tanto, la P-gp puede reducir el nivel de agentes quimioterapéuticos celulares tales como los alcaloides de la vinca y el paclitaxel (Gottesman et al., 2002; Chen et al., 2014).

Como se ha mencionado anteriormente HIF-1 es capaz de inducir la apoptosis; sin embargo, también es capaz de jugar el papel contrario y resistir la apoptosis mediante la estabilización de NF- κ -B (factor nuclear inducido por hipoxia Kapa Beta) que activa los genes anti-apoptóticos. Como un gran número de fármacos contra el cáncer alcanzan eficacia por dañar el ADN y desencadenar la apoptosis, si se inhibe este mecanismo se observa resistencia a los fármacos.

El daño del ADN es detectado por la vía DDR (Respuesta al daño en el DNA), que se encarga de asegurar que el genoma permanezca estable y que el ADN mutado o dañado no sea replicado. Muchos de los genes implicados en la reparación del daño del ADN tienen papeles adicionales en la tumorigénesis, sobre todo cuando actúan como cofactores transcripcionales (Broustas et al., 2014). Aunque defectos en estos genes están causalmente conectados a la iniciación tumoral, su papel en la progresión es más controvertido y parece depender del tipo de tumor. Las vías DDR también son importantes en la reparación del ADN después del tratamiento quimioterapéutico. Por lo tanto, si la vía está mutada, es mucho más probable que la célula no sobreviva al tratamiento. Hay estudios que muestran la implicación de HIF-1 en la resistencia a tratamiento con agentes inductores de rotura de doble cadena mediante la regulación negativa de la topoisomerasa II α , implicada en el proceso de reparación (Rohwer et al., 2011).

1.2. Agentes miméticos de hipoxia

La respuesta celular a la hipoxia es principalmente impulsada a través de la activación de la vía HIF-1 (Fandrey et al., 2009). En normoxia, el oxígeno regula la subunidad HIF-1 α , que se degrada rápidamente en el proteasoma. La hipoxia inhibe la prolil hidroxilasa (PHD) causando la estabilización de la subunidad HIF-1 α en el citoplasma. Este mecanismo ha permitido desarrollar una amplia variedad de inhibidores del dominio de la prolil hidroxilasa (PHD), que conducen a una estabilización de HIF-1 α . Estos inhibidores, llamados agentes miméticos de hipoxia (HMA), permiten crear un estrés químico e hipóxico (Chartard et al., 2017) siendo sus resultados comparables a los obtenidos por reducción de los niveles de oxígeno atmosférico (An WG et al., 1998; Hirsilä et al., 2005).

Hay varios HMA que están utilizándose en investigación. La dimetiloxalilglicina (DMOG), desferrioxamina (DFO) y L-mimosina (L-MIM) estabilizan HIF-1 α , induciendo así una respuesta celular hipóxica que implica al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Fraisl et al., 2009). Los tres HMA (DMOG, DFO, y L-MIM) inhiben la degradación de HIF-1 α a través de la inhibición de la PHD, pero difieren en los mecanismos involucrados. Mientras que el DMOG imita el 2-oxoglutarato, un cofactor de PHD, el DFO es un quelante de Fe²⁺, que es esencial para la actividad de la PHD (Fraisl et al., 2009). El DFO se usa clínicamente en la terapia de quelación con hierro para tratar la sobrecarga de hierro por ejemplo en pacientes talasémicos (Hershko et al., 2005). El MIM bloquea el sitio activo de la PHD y también los quelatos Fe²⁺.

Existen otros inhibidores de PHD como la hidralazina, un vasodilatador utilizado para tratar la hipertensión grave, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio y pre-eclampsia (Duscher et al., 2015). La hidralazina también muestra una capacidad para inducir de manera transitoria la sobreexpresión de HIF-1 α , inhibiendo la actividad de PHD (Fraisl et al., 2009). Pero sin duda, uno de los inhibidores de PHD que mejor se conoce y más se utiliza es el Cloruro de Cobalto (CoCl₂). Este compuesto compite con la actividad de iones bivalentes y suprime la formación de hemoglobina oxigenada (Rovetta et al., 2013; Chen et al., 2017). En sistemas de cultivo celular, el CoCl₂ inhibe la actividad PHD a través del reemplazo de Fe por Co, haciendo que esta enzima no pueda marcar a HIF-1 α para su degradación, dando lugar a un estado intracelular similar a la hipoxia fisiológica (Yuan et al., 2003; Cervellati et al., 2014). Por ello, las células tratadas con CoCl₂ se usan a menudo como controles en experimentos *in vitro* de señalización de hipoxia (Gray 2005).

1.3. 5-Fluorouracilo (5-FU)

5-FU es un análogo de uracilo con el hidrógeno C-5 reemplazado por un átomo de flúor. 5-FU tiene dos rutas diferentes de citotoxicidad, la primera basada en la incorporación de fluoronucleótidos en lugar de uracilo normal en ARN y ADN, y la segunda es la inhibición de la timidilato sintasa que sintetiza nucleótidos.

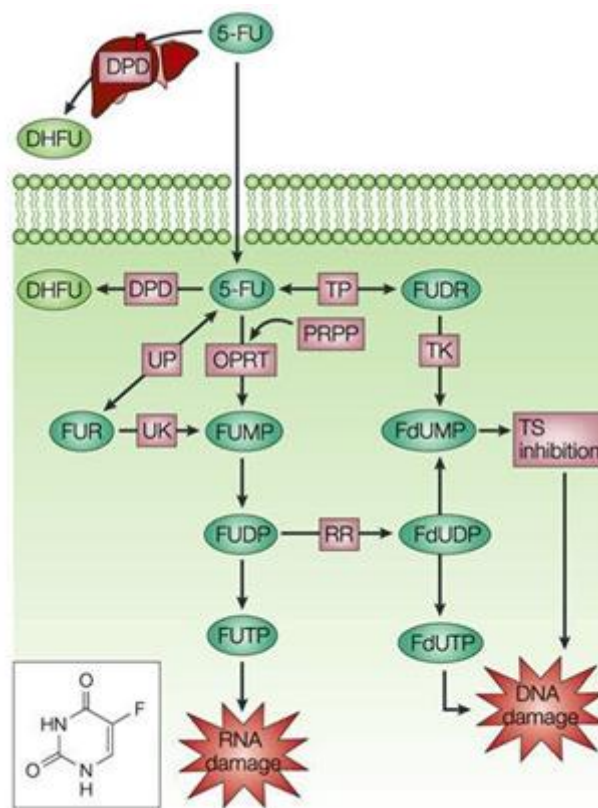


Figura 7. Metabolismo del 5-Fluorouracilo (5-FU). El 5-Fluorouracilo (5-FU) se convierte en fluoridina trifosfato (FUTP), trifosfato de fluordeoxiuridina (FdUTP) y monofosfato de fluordeoxiuridina (FdUMP) que, a través de un metabolismo adicional, son capaces de causar daño en el ARN y ADN al incorporar una base errónea en la secuencia. Sin embargo, el 80% del 5-FU administrado se descompone por la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) en el hígado. (Figura modificada de Longley et al., 2003).

El 5-FU se ha utilizado como tratamiento quimioterapéutico durante más de 40 años tras observarse que en hepatomas de rata, las células cancerosas usaban uracilo más rápidamente que los tejidos normales, haciendo de la síntesis de uracilo una diana para el tratamiento farmacológico (Rutman et al, 1954). Ahora se utiliza en una amplia variedad de cánceres como el de pecho, tracto digestivo, cabeza, cuello, y predominantemente en la mayoría de los cánceres colorrectales (Bracht et al., 2010). Los resultados son alentadores, especialmente

cuando se usan con tratamientos quimioterapéuticos más recientes, como el oxaliplatino y la leucovorina y el cetuximab (Fernandez-Plana et al, 2014). Sin embargo, todavía hay problemas con la resistencia a 5-FU, por lo que las nuevas estrategias y una mejor comprensión de los mecanismos de resistencia siguen siendo necesarios.

5-FU entra en la célula por el mismo mecanismo de transporte facilitado por el que entra el uracilo (Wohlhueter et al, 1980). Una vez dentro de la célula, se metaboliza en diferentes moléculas activas: fluorouridina trifosfato (FUTP), fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP) y fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) capaces de inhibir la timidilato sintasa e interrumpir la síntesis de ARN (Longley et al., 2003).

En la célula, la timidilato sintasa cataliza la reducción de desoxiuridina monofosfato (dUMP) (usando 5,10-metilenotetrahidrofolato (CH₂THF) como donador de metilo) a desoxitimidina monofosfato (dTMP), esto produce el timidilato requerido para la reparación y replicación del ADN.

El 5-FU es capaz de inhibir este proceso mediante la unión de FdUMP al sitio de unión de nucleótidos de la timidilato sintetasa. Al inhibir la timidilato sintasa también conduce a una acumulación de dUMP que se cree que aumenta los niveles de desoxiuridina trifosfato (dUTP). La dUTP junto con el FdUTP, producido a partir del metabolismo de 5-FU, pueden ser incorporados incorrectamente al ADN (Aherne et al. Al, 1996). La vía normal de reparación de la escisión no es capaz de reparar correctamente el ADN en presencia de altos niveles de dUTP y FdUTP, produciendo así más daño al ADN y dando como resultando muerte celular (Weber et al, 2000).

Además de inhibir la timidilato sintetasa, 5-FU es capaz de interrumpir la síntesis de ARN. El metabolito FUTP de 5-FU, se incorpora erróneamente en el ARN, interrumpiendo su función, lo que puede conducir a la muerte celular (Kufe et al, 1981; Glazer et al, 1982).

Diferentes estudios han analizado los niveles establecidos de hipoxia fisiológica y los efectos que tienen, sin embargo, ningún estudio individual ha comparado cómo las células cancerosas responden a un agente quimioterápico como el 5-Flourauracilo (5-FU) utilizando agentes miméticos de hipoxia como el CoCl₂, para imitar las condiciones fisiológicas. Debido a las diferentes zonas de hipoxia dentro de un tumor, la comprensión de cómo esto puede influir en las terapias con fármacos anticancerosos es un paso importante para poder tratar eficazmente las regiones hipóxicas.

Objetivos

Existen estudios que confirman que la hipoxia en tumores incrementa la resistencia de las células cancerosas al tratamiento con radiación y a la quimioterapia. Las subpoblaciones isquémicas dentro de diferentes tipos tumorales influyen en la respuesta de esas células frente a agentes quimioterapéuticos, indicando que la administración y captación del agente quimioterapéutico se ve afectada por la hipoxia, ya que algunos de estos agentes requieren oxígeno para generar radicales libres que contribuyan a la citotoxicidad.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto del cloruro de cobalto (CoCl_2) como agente inductor de hipoxia mimética sobre la sensibilidad de la línea celular humana de cáncer cervical HeLa al agente quimioterapéutico 5- fluorouracilo (5-FU).

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

1. Evaluar el efecto del tratamiento con CoCl_2 en la línea celular HeLa para desarrollar un modelo mimético de hipoxia.
2. Evaluar la dosis-respuesta de 5-FU sobre la viabilidad de la línea celular HeLa.
3. Estudiar el efecto de la hipoxia mimética sobre la sensibilidad a 5-FU.
4. Estudiar si la muerte celular apoptótica está implicada en la sensibilidad inducida por CoCl_2 a 5-FU en células HeLa.

3. Material y métodos

3.1 Línea celular HeLa y condiciones de cultivo

Para este estudio se utilizó la línea celular de cáncer cervical humano HeLa obtenida originalmente de la ATCC (American Type Culture Collection). Los cultivos se mantuvieron en medio Gibco™ Advanced DMEMF/12 (DMEM) (GIBCO, Invitrogen, Paisley, UK) suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (v/v), Penicilina/Estreptomicina 100µg/ml y L-glutamina a 0,1 mM (10% DMEM) a 37°C y 5% CO₂.

3.2 Ensayos de viabilidad celular

Para realizar el recuento celular se utilizó un hemocitómetro y Azul de Tripán (Sigma, Dorset, UK) diluido al 10%. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5x10⁴ células/ml en un volumen final de 100 µl de medio, 24 horas antes de ser expuestas a los tratamientos.

Para el ensayo de dosis respuesta con CoCl₂, se utilizaron dos placas por tiempo de exposición al químico y un total de 7 repeticiones por concentración de CoCl₂ por placa. Se utilizaron 8 concentraciones diferentes de CoCl₂ (10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 µM) y 4 tiempos de exposición diferentes (16 h, 24 h, 48 h y 72 h).

Para el ensayo de dosis respuesta con 5-FU, también se utilizaron dos placas por tiempo de exposición y un total de 7 repeticiones por concentración de 5-FU por placa. También se usaron 8 concentraciones diferentes de 5-FU (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 µM) y unos tiempos de exposición de 24 h, 48 h y 72 h.

Basándonos en los datos obtenidos en los ensayos de dosis respuesta anteriores, se seleccionaron las concentraciones y los tiempos de exposición que se ajustaban a la DL50 (Dosis letal media) en ambos compuestos para realizar el siguiente ensayo de viabilidad. Esta vez las células fueron expuestas a 3 condiciones por placa. La primera condición fue 200 µM de CoCl₂ durante 72 h. La segunda fue 5 µM de 5-FU durante 24 h y la tercera fue la exposición combinada de 200 µM de CoCl₂ durante 72 h y 5 µM de 5-FU durante 24 h. Se realizaron un total de 7 repeticiones por tratamiento y por placa. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

En todos los experimentos se utilizó una exposición a glucosa 10mM e hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% como controles positivo y negativo de crecimiento celular.

3.2.1 Ensayo de Quimiosensibilidad – MTT

La supervivencia celular tras el tratamiento con las diferentes drogas y tiempos se estimó utilizando Bromuro de 3-(4,5-dimethyl-2- thiazolyl) - 2,5 - diphenyltetrazol (MTT).

El MTT (Sigma, Dorset, UK) es una sal de tetrazolio de color amarillo y soluble en agua. Cuando el MTT se reduce, su anillo de tetrazolio se escinde y forma un formazano insoluble de color púrpura. Esta reducción se da por acción de enzimas deshidrogenasas, tales como las que se pueden encontrar en las mitocondrias de células vivas. Utilizando isopropanol, se consigue diluir el formazano formado y así medir la absorbancia de su color púrpura a 560 nm con un lector de placas. La absorbancia obtenida es proporcional al número de células viables.

Tras las horas de incubación necesarias en cada experimento, se aspiró el volumen total de medio presente en los pocillos y se sustituyó por 50 µl de MTT a 1 mg/ml disuelto en 1% de medio DMEM previamente calentado a 37°C. Las placas se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Tras el periodo de incubación, se retiró el medio de los pocillos y se procedió a disolver los cristales de color púrpura formados en el interior de las células viables con 100 µl de isopropanol por pocillo. Para medir la absorbancia a 560 nm se utilizó el lector de placas Modulus Microplate (Turner Biosciences, Promega, Southampton, UK).

3.2.3 Ensayo de apoptosis - Caspasa-3/7.

Previamente al inicio del ensayo se sembraron en 2 placas de 96 pocillos aptas para luminiscencia 5×10^4 células/ml en un volumen final de 100 µl de medio DMEM por pocillo y se dejaron crecer a 37°C y 5% CO₂. 24 h después, las células fueron tratadas con 100 µl de 200 µM de CoCl₂, 5 µM de 5-FU y la combinación de ambos. Se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 5 h y 24 h antes de realizar el ensayo de apoptosis. 4 h antes de realizar el ensayo, se añadió a cada placa un tratamiento con camptotecina 6 µM en medio DMEM como control de apoptosis. Cada condición se ensayó por triplicado. Para el estudio de activación de las caspasas se utilizó el kit *ApoTox-Glo™ Triplex Assay* (Promega, Southampton, UK.). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se transfirieron 10 ml de *Caspase-Glo® 3/7 Buffer* a una botella ámbar con el *Caspase-Glo® 3/7 Substrate* liofilizado. Se mezcló por agitación hasta que el sustrato quedó completamente disuelto (unos 20 segundos) obteniendo así el reactivo *Caspase-Glo® 3/7* que se mantuvo a 4°C hasta el momento de su utilización cuando se colocó a temperatura ambiente. Tras las horas de incubación necesarias se aspiraron 50 µl de medio de cada pocillo y se añadieron 50 µl de reactivo *Caspase-Glo® 3/7* que da como resultado la lisis celular, seguido por

la escisión de caspasa del sustrato y la generación de una señal luminiscente. La luminiscencia es proporcional a la cantidad de actividad de caspasa presente.

Las placas se incubaron a 37°C y se tomó la medida de luminiscencia 1h después de añadir el reactivo *Caspase-Glo*[®] 3/7 utilizando el lector de placas GloMax[®] 96 Microplate Luminometer (Promega Southampton, UK) a 400 nm (excitación) y 505 nm (emisión).

3.3. Toma de imágenes al microscopio

Con el objetivo de completar con datos cualitativos los resultados cuantitativos obtenidos con los ensayos de viabilidad celular, se procedió a la toma de imágenes de todos los tratamientos inmediatamente antes de realizar el ensayo de MTT en el caso de los experimentos de dosis-respuesta del CoCl₂ y el 5-FU y durante la incubación con MTT en el caso del experimento combinado de los dos químicos. Se realizaron un total de dos fotografías por tratamiento y la selección de los campos fotografiados se realizó al azar utilizando el microscopio invertido digital *EVOS*[®] *FL system* (Thermo Fisher scientific, UK) bajo un objetivo de 20x aumentos.

3.4. SDS-PAGE y Western Blot

Para obtener los extractos celulares, los cultivos expuestos a los diferentes tratamientos crecidos durante 24 h se lavaron con 1 ml de PBS 1X durante 30 segundos, seguido de la adición de 500 µl de buffer Laemli 2X a 100°C. El raspado celular se transfirió a un tubo de 2 ml y se mantuvo a 4°C hasta su utilización. La electroforesis se realizó en geles prefabricados de poliacrilamida al 10% (Mini-PROTEAN[®]Precast gels, *BIO-RAD Laboratories*, uk.) e incubación de las muestras a 100°C en tampón de carga durante 5 minutos. Los ensayos se realizaron utilizando material de electroforesis y fuente de alimentación de *BIO-RAD Laboratories* (UK).

La electroforesis se realizó a 150V durante 1 hora, tras la cual se realizó una transferencia de gel a membrana de PVDF durante 1 hora a 100V. Tras la transferencia, la membrana fue bloqueada en PBST con leche al 3% durante una hora y a continuación se añadió el anticuerpo primario *Hydroxy-HIF-1α (Pro564) (D43B5) XP Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, UK)* a la concentración sugerida por el fabricante de 1:1000 en PBS-Tween 1X con leche en polvo al 3%(P/V) y se incubó durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se realizaron tres lavados de la membrana de 10 minutos cada uno con en TBST y se añadió el anticuerpo secundario, *Goat-Anti-Rabbit HRP (Horse radish peroxidase)* (Sigma, UK), a la concentración especificada por el fabricante de 1:4000 en TBST con leche al 5%. Previo al revelado se realizaron tres lavados de la membrana de 10 minutos cada uno en PBST y se

reveló utilizando como reactivo de detección *ECL plus Western Blotting detection system*(GE healthcare, UK) en el equipo de visualización *Fusion SL* (Peg labs, UK). Como proteína de control de carga endógena se utilizó actina beta.

3.5. Gráficos y estadísticas

Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron utilizando Microsoft Excel 2016 y GraphPad Prism versión 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Se realizó el test de análisis de varianza One Way ANOVA junto al test Tukey-Kramer Post-Hoc para determinar las diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos. Se estableció un nivel alfa de 0,05 como límite de significación en todas las pruebas estadísticas. Los gráficos fueron creados a partir de los valores medios de las medias y SEM (Error Estándar de la Media).

4. Resultados

4.1. Uso del CoCl_2 para desarrollar un modelo de hipoxia mimética

Con el fin de obtener el patrón de dosis respuesta que presentan las células HeLa frente a CoCl_2 , Las células fueron tratadas con 8 concentraciones diferentes de CoCl_2 (10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 μM) durante 4 períodos de tiempo diferentes (16 h, 24 h, 48 h y 72 h) a 37°C y 5% CO_2 .

Tras los tiempos de incubación mencionados se realizó el ensayo de MTT. Los resultados se muestran en la Figura 8.

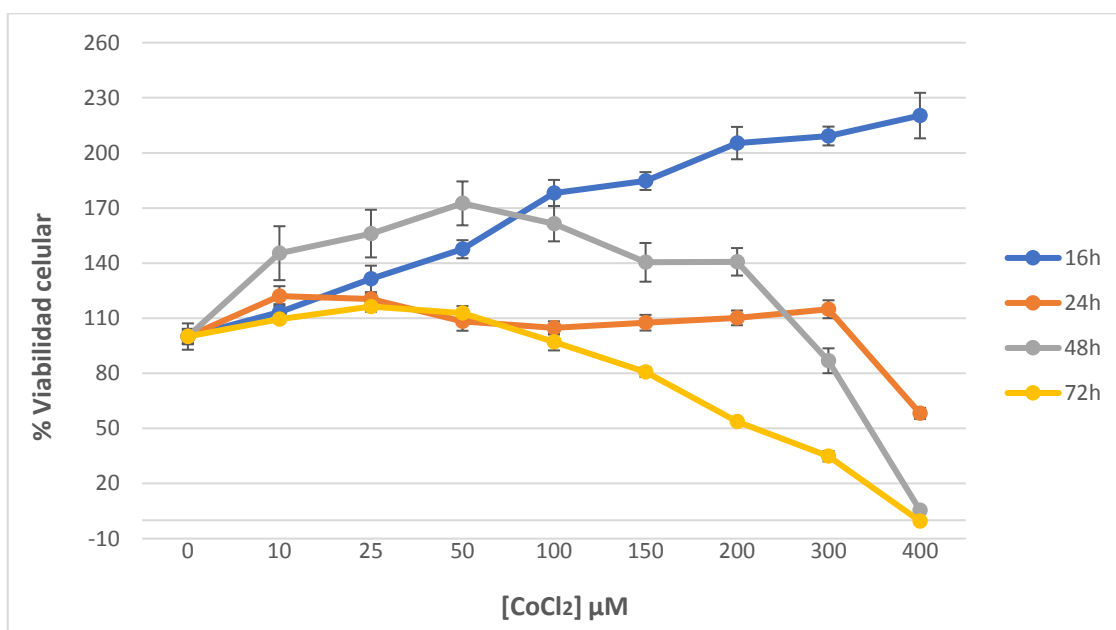


Figura 8. % Viabilidad de las células HeLa expuestas al Cloruro de cobalto durante diferentes tiempos de exposición. Las células fueron tratadas con 8 concentraciones de CoCl_2 (10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 μM) durante 4 períodos de tiempo diferentes (16 h, 24 h, 48 h y 72 h). La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de MTT. Los datos están expresados como porcentajes de las medias \pm SEM de un experimento independiente con 7 réplicas por condición.

Como se muestra en la Figura 8, se observó valores crecientes de citotoxicidad con el aumento de los tiempos de exposición frente a CoCl_2 . Los valores más altos de citotoxicidad se registraron a las 72h de tratamiento, siendo la dosis letal media (LD 50) de 200 μM de CoCl_2 . Los períodos de exposición de 24 h y 48 h muestran una DL50 más elevada. Curiosamente, el menor tiempo de exposición de 16 horas a CoCl_2 no mostró sensibilidad a CoCl_2 .

Los datos cualitativos mostrados en la Figura 9, muestran los cambios celulares macroscópicos asociados con el aumento de la muerte celular observada con dosis y tiempos de exposición

crecientes de CoCl_2 . Los datos cualitativos se correlacionan bien con los datos cuantitativos del ensayo de MTT mostrados en la Figura 8. Como se muestra en la Fig. 9, el tipo de muerte celular observada potencialmente puede deberse a la apoptosis ya que se pueden observar cuerpos apoptóticos.

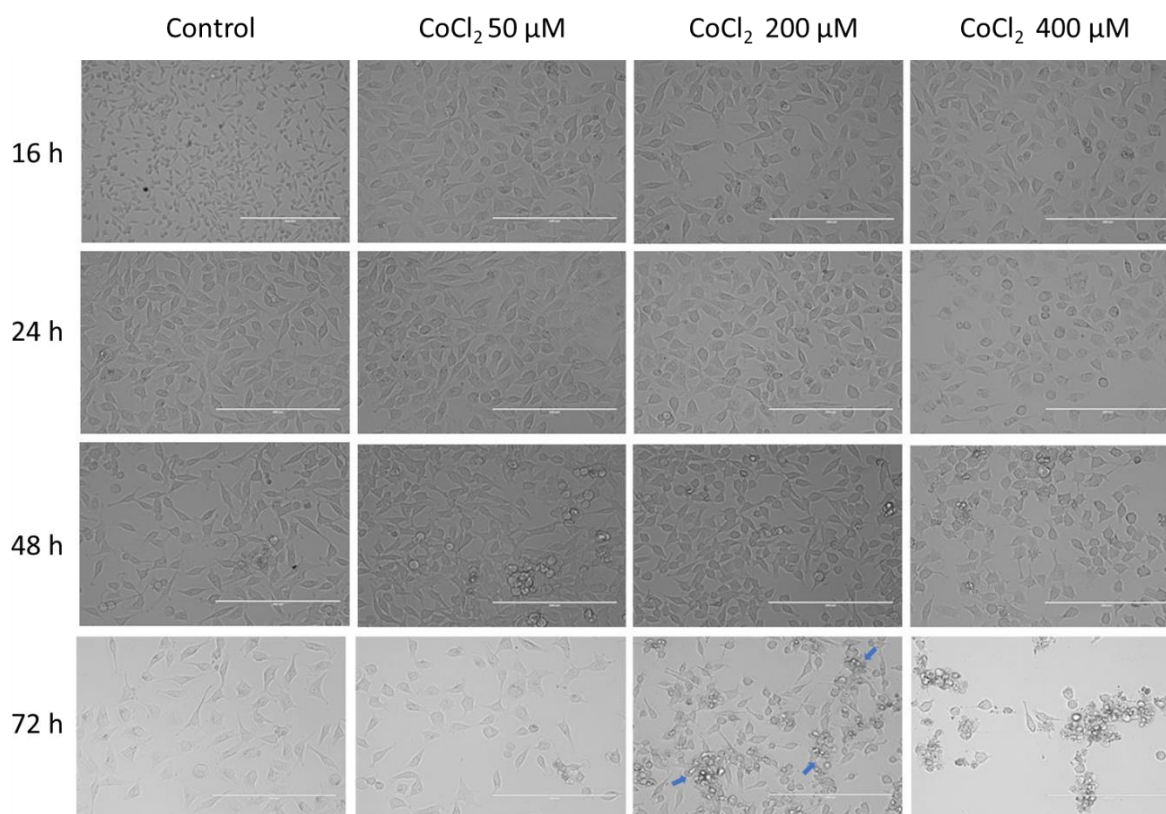


Figura 9. Imágenes de las concentraciones más representativas de CoCl_2 a los diferentes tiempos de exposición. Los campos fotografiados se tomaron al azar utilizando un microscopio invertido y un objetivo de 20x aumentos. Las flechas de color azul señalan la presencia de cuerpos apoptóticos.

4.2. Ensayo de dosis-respuesta para el 5-FU

Las células HeLa fueron tratadas con 8 concentraciones de 5-FU (10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 μM) e incubadas a 37°C y 5% CO_2 durante 24 h, 48 h y 72 h. Los datos obtenidos del ensayo de MTT realizado tras los periodos de incubación se muestran en la Figura 10. En esta Figura se muestra que concentraciones muy bajas de 5-FU son capaces de mostrar una citotoxicidad muy alta en las células a la exposición más baja de 24 h. Basándonos en los resultados de MTT que aparecen en la gráfica de la Figura 10, se determinó la LD50 para el 5-FU en 5 μM con un periodo de exposición de 24 h.

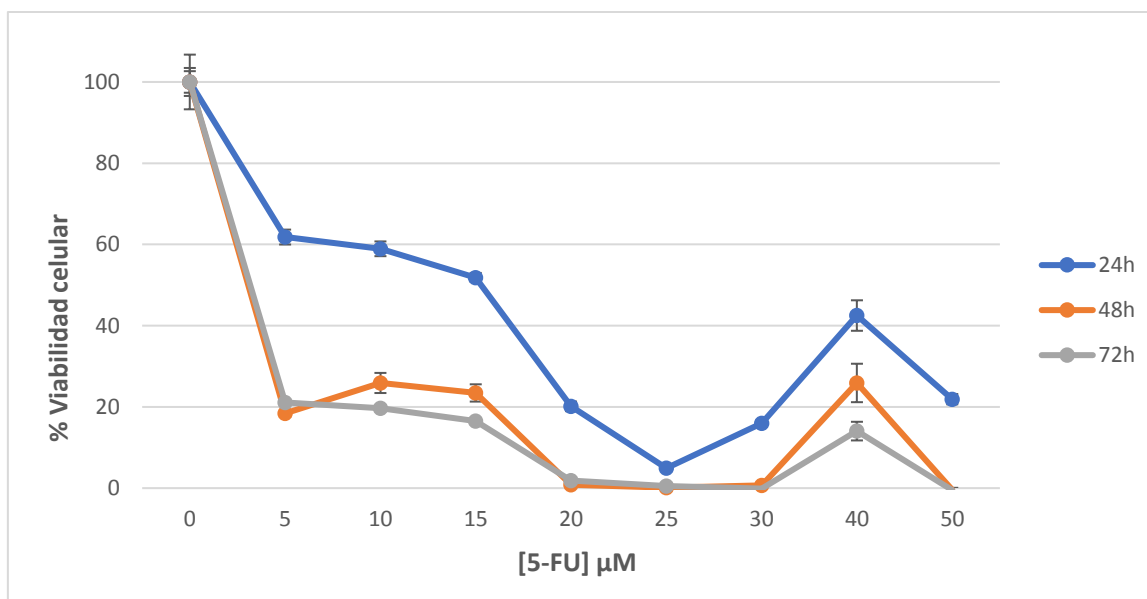


Figura 10. Viabilidad de las células HeLa tras el tratamiento con 5-FU a diferentes tiempos de exposición. Las células fueron tratadas con 8 concentraciones de 5-FU (10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 μM) durante 4 periodos de tiempo diferentes (16 h, 24 h, 48 h y 72 h). La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de MTT. Los datos están expresados como porcentajes de las medias \pm SEM de un experimento independiente con 7 réplicas por condición.

La viabilidad celular a las concentraciones más altas de 25-50 μM mostró fluctuaciones y tendría que explorarse más utilizando ensayos alternativos para la proliferación celular (por ejemplo, el ensayo BrdU).

Los datos cualitativos mostrados en la Figura 11, muestran los cambios celulares macroscópicos asociados con el aumento de la muerte celular observado con dosis y tiempos de exposición crecientes con 5-FU. Los datos cualitativos están bien correlacionados con los datos cuantitativos obtenidos en el ensayo de MTT mostrados en la Figura 10. Sin embargo, los cambios morfológicos macroscópicos son diferentes a los observados con la exposición a CoCl_2 , concretamente una presencia poco clara de cuerpos apoptóticos.

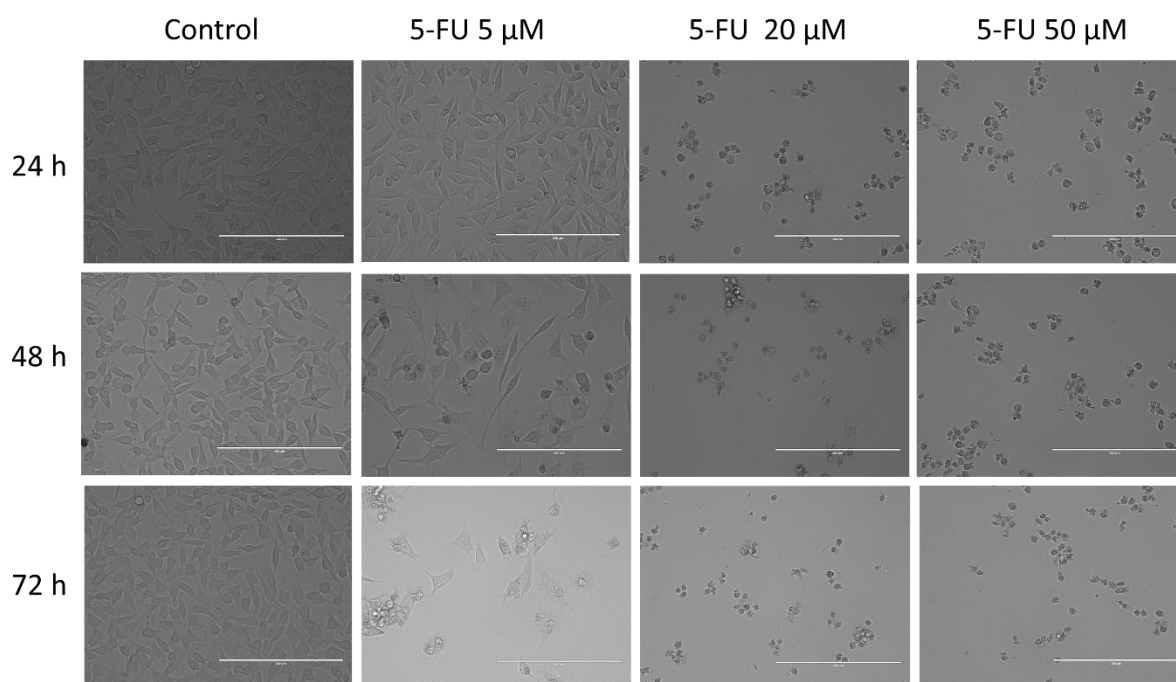


Figura 11. Imágenes de las concentraciones más representativas de 5-FU a los diferentes tiempos de exposición. Los campos fotografiados se tomaron al azar utilizando un microscopio invertido y un objetivo de 20x aumentos. Las flechas de color azul señalan la presencia de cuerpos apoptóticos

4.3. Efecto de la hipoxia mimética sobre la viabilidad con 5-FU

Como se muestra en la Figura 12, la muerte celular fue cerca del 40% y 10% con los tratamientos individuales de CoCl_2 o 5-FU. Sin embargo, la combinación de ambos resultó en una muerte celular significativamente aumentada (50%). Esto sugiere que siendo el CoCl_2 más citotóxico en comparación con el 5-FU, la sensibilidad a 5-FU se incrementó en presencia de CoCl_2 .

Las imágenes de la Figura 13, están tomadas después de la conversión intracelular del MTT en cristales de formazano. Como se muestra en la Figura 13, la presencia de cristales fue más baja en las células tratadas con la combinación de CoCl_2 y 5-FU, en comparación con los controles sin tratar o con los tratamientos de 5-FU / CoCl_2 solos.

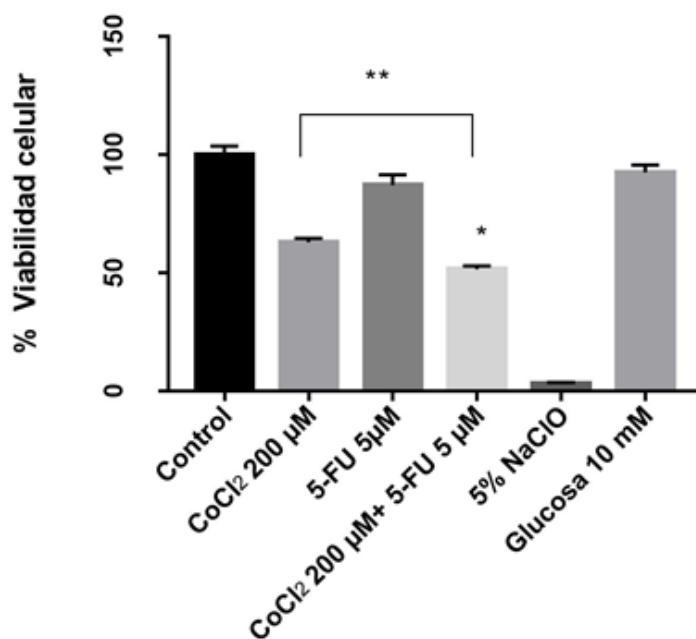


Figura 12. Viabilidad de las células Hela tras el tratamiento con CoCl₂ durante 72 h y 5-FU durante 24 h. La viabilidad celular fue determinada usando el ensayo de MTT. Los datos son expresados como porcentajes del control (no exposición a químicos). Los valores son representados como medias \pm SEM de tres experimentos independientes, conteniendo cada uno 7 réplicas por condición. * Diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ (entre el tratamiento combinado y el tratamiento con CoCl₂), ** Diferencias estadísticamente significativas $P < 0.001$.

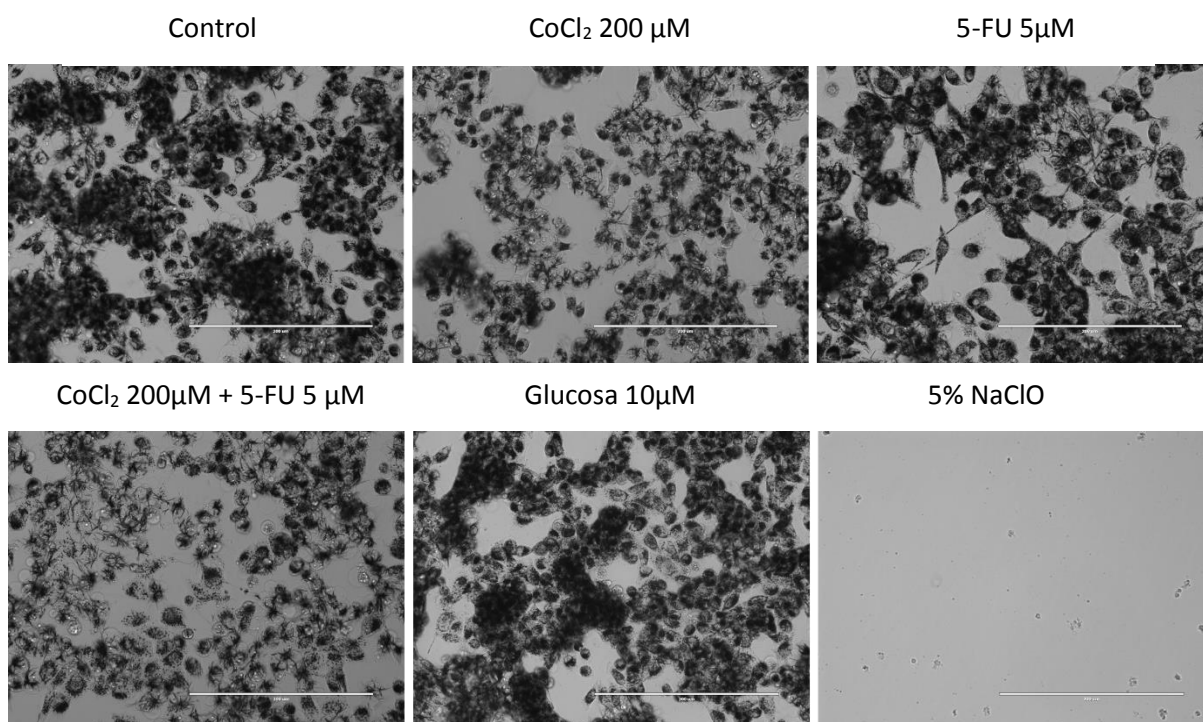


Figura 13. Imágenes representativas de las células Hela tras el tratamiento con CoCl₂ durante 72 h y 5-FU durante 24 h. Las imágenes fueron tomadas tras la conversión intracelular del MTT en cristales de formazano. Los campos fotografiados se tomaron al azar utilizando un microscopio invertido y un objetivo de 20x aumentos.

4.4. Ensayo de apoptosis - Caspasa-3/7

Como se muestra en las Figuras 9 y 11, el tipo de muerte celular podría ser debido a la apoptosis como se deduce por la presencia de cuerpos apoptóticos. Para identificar el mecanismo de muerte celular, el siguiente experimento examinó los niveles de caspasa 3/7 en células HeLa tratadas con hipoxia mimética y 5-FU.

Los experimentos preliminares no mostraron ningún cambio en los niveles de las caspasas efectoras después de 24 horas de exposición a ambos fármacos. Sin embargo, la inducción apoptótica es un proceso muy rápido, comenzando a las pocas horas del proceso que se está desencadenando (Elmore et al., 2007). Por lo tanto, para evaluar el tiempo de inducción de caspasas, el ensayo se llevó a cabo 5 horas después de la co-exposición a los fármacos (datos mostrados en la Tabla 1). Como se muestra en la Tabla 1, la iniciación de la caspasa 3/7 comenzó a las 5 horas de exposición al tratamiento y se redujo a los niveles basales en 24 horas. Como era de esperar, los ensayos de MTT realizados en el mismo intervalo de tiempo no mostraron ninguna diferencia significativa. La apoptosis fue determinada por los niveles de Caspasa3 y 7. Los datos se muestran como porcentajes de controles (sin tratamiento) con SEM para los diferentes tratamientos y tiempos de exposición para un experimento independiente con 3 réplicas por condición.

Tabla 1. Niveles de Caspasa 3 y 7 en hipoxia mimética y 5-FU.

	5 h	SEM	24 h	SEM
Control	100	1230,756	100	174,0857
5-FU 5µM	103,6887	2575,048	93,11292	501,7165
CoCl2 µM	137,5041	5929,281	80,26211	539,2598
CoCl2 µM + 5-FU 5µM	152,2376	2879,035	14,59252	343,7745
Camptotecina 6 µM	240,6881	19287,69	136,8969	949,7694

4.5. SDS-PAGE y Western Blot

Se realizó un estudio piloto para determinar si la hipoxia mimética generada con CoCl_2 también induce cascadas de señalización celular mediadas por HIF-1 α . HIF-1 α es un factor de transcripción dependiente de oxígeno que se estabiliza post-traduccionalmente en condiciones hipóxicas. Como se muestra en la Figura 14, se observó que el nivel de HIF-1 α se incrementaba ligeramente después de una exposición de 24 horas a CoCl_2 , pero no con exposición a 5-FU. Se sabe que HIF-1 α se estabiliza muy pronto después de la exposición a la hipoxia, por lo tanto, los lisados celulares se obtuvieron después de una exposición de 24 horas a CoCl_2 en presencia o ausencia de 5-FU. Esto sugiere que la hipoxia inducida por CoCl_2 activa una ruta de señalización dependiente de HIF-1 α . Sin embargo, los datos deberán repetirse para confirmar este estudio piloto.

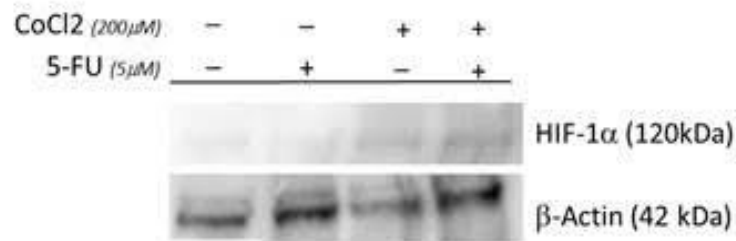


Figura 14. Estabilización de HIF-1 α con CoCl_2 en presencia y ausencia de 5-FU. La presencia de HIF-1 α fue determinada por Western Blot. La banda de HIF-1 α se detecta a 120KDa. Los resultados pertenecen a un solo experimento independiente.

5. Discusión

Una característica común a la mayoría de los tumores es que se encuentran en un microambiente donde la demanda energética es alta y la oferta vascular está disminuida, lo que produce la creación de áreas centrales de hipoxia. Estas zonas hipóxicas se consideran un factor clave del microambiente tumoral ya que favorecen la supervivencia de las células tumorales y la resistencia a la quimioterapia y la radioterapia (Toffoli et al., 2008). Estudios experimentales y clínicos han demostrado que la hipoxia intra-tumoral participa en el proceso de crecimiento invasivo y metástasis (Chu et al., 2016). Comprender los mecanismos que la hipoxia genera es de un gran interés ya que nos ayudaría a entender mejor la evolución tumoral y a desarrollar tratamientos más efectivos.

5.1 Efecto del agente inductor de hipoxia CoCl_2 en la viabilidad celular

El cloruro de cobalto (CoCl_2) se ha utilizado *en vivo* e *in vitro* como agente mimético de hipoxia (Ahn et al., 2007; Ciavarella et al., 2016). Varios trabajos han indicado que tanto el CoCl_2 como la hipoxia regulan un grupo similar de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, la eritropoyesis, el transporte de hierro, el control del tono vascular y la angiogénesis (Ji et al., 2006; Ke y Costa, 2006; Vengellur et al., 2003). El CoCl_2 puede imitar las condiciones de hipoxia a través de cambios transcripcionales de algunos genes incluyendo el factor inducible de hipoxia-1 α (HIF-1 α) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Yoo et al., 2016). También es capaz de promover la diferenciación de las células madre mesenquimales a osteoblastos y condrocitos (Yoo et al., 2016), inhibir la muerte celular por apoptosis de las células de hepatoma HepG2 (Bae et al., 2012) e inducir la apoptosis en diferentes tipos celulares (Zou et al., 2002; Jung y Kim, 2004; Guo et al., 2006) como en células C6 de glioma de rata, macrófagos alveolares humanos y células neuronales PC12. Sin embargo, la sensibilidad a CoCl_2 varía entre los diferentes tipos de células.

En este trabajo hemos utilizado el CoCl_2 para generar un modelo mimético de hipoxia en la línea celular de cáncer cervical humana HeLa. Los resultados del experimento con Bromuro de 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) - 2,5 - diphenyltetrazol (MTT) (Figura 8) prueban que la línea celular HeLa muestra sensibilidad a una exposición de CoCl_2 200 μM durante 72h. Las imágenes de microscopía sugieren que el mecanismo de muerte celular que experimentan es por apoptosis ya que se observan cuerpos apoptóticos en ellas. Estos datos se relacionan con los datos bibliográficos nombrados anteriormente ya que, la exposición a CoCl_2 a periodos cortos de tiempo (16 h), además de no afectar a la viabilidad celular, parece que facilita la proliferación ya que se observa mayor densidad celular en las células tratadas con CoCl_2 que en el control sin

tratar habiendo sido expuestos al mismo periodo de tiempo. Esto sería concorde con la propuesta inhibición de la apoptosis previamente comentada (Bae et al., 2012). El ensayo de MTT tiene sus limitaciones, nos permite sólo observar si una célula es viable o no, pero no nos da información de si una célula es capaz de replicar su DNA. Sería interesante realizar otro tipo de ensayos en este mismo tiempo de tratamiento, por ejemplo, el ensayo mitogénico de cristal violeta, citometría de flujo o el ensayo de BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina) para detectar la síntesis de ADN.

5.2 Efecto de la hipoxia mimética sobre la viabilidad con 5-FU

El 5-FU induce efectos citotóxicos ya que produce daños en el DNA celular desencadenando apoptosis (Mhaidat et al., 2014). En diferentes líneas celulares de cáncer colorrectal se ha mostrado que el tratamiento con CoCl_2 induce una mayor resistencia celular al tratamiento con 5-FU (Tan et al., 2006; López-Sánchez et al., 2014; Yang et al., 2016) pero no hay referencias de artículos donde se haya estudiado este efecto en células HeLa.

Como se muestra en la Figura 12, la muerte celular fue cerca del 40% y 10% con CoCl_2 y 5-FU por si solos. La combinación de ambos resultados en un 50% de muerte celular, lo que sugiere un simple efecto aditivo de los dos agentes. Los resultados del experimento de caspasas 3 y 7 recogidos en la tabla 1. confirman que el mecanismo de muerte celular que experimentan las células HeLa tratadas con la combinación de CoCl_2 y 5-FU es la apoptosis.

El HIF-1 α es un importante factor de transcripción y un regulador clave de las respuestas adaptativas a la hipoxia, incluyendo la activación de vías de señalización y genes regulados por ellas, que promueven la supervivencia celular y alteran las características biológicas de los tumores (Sharp et al., 2004). En condiciones de normoxia, el HIF-1 α es rápidamente degradado por el proteosoma, pero en condiciones de hipoxia se produce la estabilización de HIF-1 α evitando su degradación.

Los resultados obtenidos en el experimento de Western blot (Figura 14), mostraron un ligero aumento del nivel de HIF-1 α después de una exposición de 24 horas a CoCl_2 , pero no con exposición a 5-FU. Estos datos indican nuevamente que 24 horas de tratamiento con el agente mimético de hipoxia CoCl_2 pueden promover la supervivencia celular. Estos resultados sugieren que una vía de señalización dependiente de HIF-1 α , se activa mediada por la hipoxia inducida por CoCl_2 como se observa en otras líneas celulares, por ejemplo, la línea celular U251 de glioblastoma humana (Okail 2010). Sin embargo, los datos del experimento de Western blot son preliminares, y será necesario realizar una serie de repeticiones para poder confirmar este dato.

En vivo, dentro del microambiente tumoral existen dos tipos principales de hipoxia. La hipoxia crónica, debida a la limitada distancia de difusión de oxígeno y la hipoxia cíclica o intermitente, que se debe principalmente a las alteraciones temporales en la perfusión y variación del flujo sanguíneo en la microvasculación (Lee et al, 2014). En este estudio nos hemos centrado en la generación de un modelo mimético de hipoxia constante con CoCl_2 en las células HeLa, por lo que sería de gran interés para futuros trabajos, diseñar un modelo de hipoxia mimética intermitente y estudiar el efecto que podría ejercer en la sensibilidad a 5-FU de las células HeLa

6. Conclusiones

1. El tratamiento con cloruro de cobalto (CoCl_2) en la línea celular humana de cáncer cervical HeLa, ha resultado ser un modelo válido de hipoxia mimética.
2. Este es el primer estudio que muestra que el tratamiento combinado con el agente mimético de hipoxia CoCl_2 y el agente quimioterapéutico 5-FU en la línea celular humana de cáncer cervical HeLa, produce un efecto aditivo en la muerte celular.
3. Los datos obtenidos señalan que la muerte celular mediada por el CoCl_2 se debe a apoptosis, aunque son necesarios estudios adicionales para confirmar este dato.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a la Dra. Momna Hejmadi por todo el tiempo dedicado, toda la paciencia y todos los ánimos que me ha brindado durante el desarrollo de este trabajo. Le agradezco profundamente que siempre haya tenido la puerta abierta para mí incluso en los fines de semana. Ha sido un placer trabajar bajo su orientación y aprender día a día de su experiencia como profesional.

También me gustaría agradecer a la Dra. María Esperanza Cerdán Villanueva por su inmejorable disposición ante las dudas que durante la realización de este trabajo me surgieron, por sus correcciones en tiempo récord y por las valiosas observaciones que ha aportado.

Gracias a ellas la realización de este trabajo ha sido posible.

Referencias

- Aherne, G. W., Hardcastle, A., Raynaud, F. & Jackman, A. L. Immunoreactive dUMP and TTP pools as an index of thymidylate synthase inhibition; effect of tomudex (ZD1694) and a nonpolyglutamated quinazoline antifolate (CB30900) in L1210 mouse leukaemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 51, 1293–1301 (1996).
- Ai Z, Lu Y, Qiu S, Fan Z. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeting HIF-1-regulated cancer metabolism. *Cancer letters.* 2016;373(1):36-44. doi:10.1016/j.canlet.2016.01.009.
- Alfarouk KO, Verduzco D, Rauch C, et al. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. *Oncoscience.* 2014;1(12):777-802.
- Amith SR, Fong S, Baksh S, Fliegel L. Na (+)/H (+)exchange in the tumour microenvironment: does NHE1 drive breast cancer carcinogenesis?. *Int J Dev Biol.* 2015;59(7-9):367-77. doi: 10.1387/ijdb.140336lf.
- An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature.* 1998;392:405–408. doi: 10.1038/32925.
- Bae S, Jeong HJ, Cha HJ, Kim K, Choi YM, An IS, Koh HJ, Lim DJ, Lee SJ and An S. The hypoxia-mimetic agent cobalt chloride induces cell cycle arrest and alters gene expression in U266 multiple myeloma cells. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE* 30: 1180-1186, 2012.
- Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *The EMBO Journal.* 2003;22(16):4082-4090. doi:10.1093/emboj/cdg392.
- Binbin Han, Jiwen Wang, Jia Gao, Shana Feng, Yu Zhu, Xuexiang Li, Ting Xiao, Jun Qi, Wei Cui. DJ-1 as a potential biomarker for the early diagnosis in lung cancer patients. *umor Biology Vol 39, Issue 6 First published date: June-27-2017.*
- Bong-HyunAhn, . Mi Hee Park, Young HanLee, Do SikMin. Up-regulation of cyclooxygenase-2 by cobalt chloride-induced hypoxia is mediated by phospholipase D isozymes in human astrogloma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research Volume 1773, Issue 12, December 2007, Pages 1721-1731.*
- Bracht K, Nicholls AM, Liu Y, Bodmer WF. 5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency. *British Journal of Cancer.* 2010;103(3):340-346. doi:10.1038/sj.bjc.6605780.
- Bracht K, Nicholls AM, Liu Y, Bodmer WF. 5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency. *British Journal of Cancer.* 2010;103(3):340-346. doi:10.1038/sj.bjc.6605780.
- Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J (2007) Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 581:3582–3591.
- Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., & Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 85(12), 1301-7. doi:10.1007/s00109-007-0281-3.

Broustas CG, Lieberman HB. DNA Damage Response Genes and the Development of Cancer Metastasis. *Radiation research*. 2014;181(2):111-130. doi:10.1667/RR13515.1.

Burroughs SK, Kaluz S, Wang D, Wang K, Van Meir EG, Wang B. Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics. *Future medicinal chemistry*. 2013;5(5):10.4155/fmc.13.17. doi:10.4155/fmc.13.17.

C Hershko, G Link, A M Konijn, Z Cabantchik. Objectives and Mechanism of Iron Chelation Therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1054, 124-135. 2005.

Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 α . *Molecular cell*. 2010;40(4):509-520. doi:10.1016/j.molcel.2010.10.030.

Cervellati F, Muresan X, Sticozzi C, et al. Comparative effects between electronic and cigarette smoke in human keratinocytes and epithelial lung cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. 2014;28(5):999-1005. doi:10.1016/j.tiv.2014.04.012.

Chatard M, Puech C, Perek N, Roche F. Hydralazine is a Suitable Mimetic Agent of Hypoxia to Study the Impact of Hypoxic Stress on In Vitro Blood-Brain Barrier Model. *Cell Physiol Biochem*. 2017 Jul 24;42(4):1592-1602. doi: 10.1159/000479399

Chen D, Li M, Luo J, et al. Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem* 2003;278:13595-8.

Chen J, Ding Z, Peng Y, et al. HIF-1 α Inhibition Reverses Multidrug Resistance in Colon Cancer Cells via Downregulation of MDR1/P-Glycoprotein. *Zmijewski M, ed. PLoS ONE*. 2014;9(6):e98882. doi:10.1371/journal.pone.0098882.

Chu CY1, Jin YT1, Zhang W1, Yu J2, Yang HP2, Wang HY1, Zhang ZJ1, Liu XP2, Zou Q1. CA IX is upregulated in CoCl₂-induced hypoxia and associated with cell invasive potential and a poor prognosis of breast cancer. *Int J Oncol*. 2016 Jan;48(1):271-80. doi:10.3892/ijo.2015.3253. Epub 2015 Nov 19.

Chu K, Boley KM, Moraes R, Barsky SH, Robertson FM. The Paradox of E-Cadherin: Role in response to hypoxia in the tumor microenvironment and regulation of energy metabolism. *Oncotarget*. 2013;4(3):446-462.

Ciavarella C, Fittipaldi S, Pasquinelli G. CoCl₂ Administration to Vascular MSC Cultures as an In Vitro Hypoxic System to Study Stem Cell Survival and Angiogenesis. *Methods Mol Biol*. 2016;1516:309-317. doi: 10.1007/7651_2016_350.

De Oliveira JT, Ribeiro C, Barros R, et al. Hypoxia Up-Regulates Galectin-3 in Mammary Tumor Progression and Metastasis. *Seagroves T, ed. PLoS ONE*. 2015;10(7):e0134458. doi:10.1371/journal.pone.0134458.

Desireddi JR, Farrow KN, Marks JD, Waypa GB, Schumacker PT. Hypoxia Increases ROS Signaling and Cytosolic Ca²⁺ in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells of Mouse Lungs Slices. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010;12(5):595-602. doi:10.1089/ars.2009.2862.

Duscher D, Maan ZN, Whittam AJ, Sorkin M, Hu MS, Walmsley GG, Baker H, Fischer LH, Januszyk M, Wong VW, Gurtner GC. Fibroblast-Specific Deletion of Hypoxia Inducible Factor-1 Critically Impairs Murine Cutaneous Neovascularization and Wound Healing. *Plast Reconstr Surg*. 2015 Nov;136(5):1004-13. doi: 10.1097/PRS.0000000000001699.

- F. Rovetta, A. Stacchiotti, F. Faggi et al., "Cobalt triggers necrotic cell death and atrophy in skeletal C2C12 myotubes," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 271, no. 2, pp. 196–205, 2013.
- Fandrey J, Gassmann M. Oxygen sensing and the activation of the hypoxia inducible factor 1 (HIF-1)-invited article. *Med Biol*. 2009;648:197-206. doi: 10.1007/978-90-481-2259-2_23.
- Fantin VR, St-Pierre J, Leder P (2006) Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9:425–434.
- Fernandez-Plana J, Pericay C, Quintero G, et al. Biweekly cetuximab in combination with FOLFOX-4 in the first-line treatment of wild-type KRAS metastatic colorectal cancer: final results of a phase II, open-label, clinical trial (OPTIMIX-ACROSS Study). *BMC Cancer*. 2014;14:865. doi:10.1186/1471-2407-14-865.
- Folkman J and Shing Y *Angiogenesis J Biol Chem* 1992, 267:10931- 10934.
- Folkman J What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990, 82:4-6.
- Fraisl P, Mazzone M, Schmidt T, Carmeliet P. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell*. 2009 Feb;16(2):167-79. doi: 10.1016/j.devcel.2009.01.003.
- Gatti, L., Zunino, F., 2005. Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods Mol. Med.* 111, 127–148.
- Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & Development*. 2004;18(18):2183-2194. doi:10.1101/gad.1243304.
- Glazer, R. I. & Lloyd, L. S. Association of cell lethality with incorporation of 5-fluorouracil and 5-fluorouridine into nuclear RNA in human colon carcinoma cells in culture. *Mol. Pharmacol.* 21, 468–473 (1982).
- Goda N, Ryan HE, Khadivi B et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2003;23:359-369.
- Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer cell*. 2007;12(2):108-113. doi:10.1016/j.ccr.2007.07.006.
- Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E., 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48–58.
- Gray, L.H., Conger, A.D., Ebert, M., Honrsey, S., Scott, O.C., 1953. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br. J. Radiol.* 26, 638–648.
- Greijer, a E., & van der Wall, E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of clinical pathology*, 57(10), 1009-14. doi:10.1136/jcp.2003.015032.
- Guo M , Song LP, Jiang Y, Liu W, Yu Y, Chen GQ. Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1alpha independent mechanisms. *Apoptosis*. 2006 Jan;11(1):67-77.
- Hay N, Sonenberg N (2004). "Upstream and downstream of mTOR". *Genes Dev* 18 (16): 1926–45.

Heacock, C.S. and Sutherland, R.M. 1990. Enhanced synthesis of stress proteins caused by hypoxia and relation to altered cell growth and metabolism. *Br. J. Cancer* 62: 217–225.

Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med.* 1997 Feb;3(2):177-82.

Hilda Mujcic, Anika Nagelkerke, Kasper M.A. Rouschop, Stephen Chung, Naz Chaudary, Paul N. Span, Blaise Clarke, Michael Milosevic, Jenna Sykes, Richard P. Hill, Marianne Koritzinsky and Bradly G. Wouters. Hypoxic Activation of the PERK/eIF2 α Arm of the Unfolded Protein Response Promotes Metastasis through Induction of LAMP3. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0526 Published November 2013.

Hirsilä M, Koivunen P, Xu L, Seeley T, Kivirikko KI, Myllyharju J. Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. *FASEB J.* 2005 Aug;19(10):1308-10. Epub 2005 Jun 7.

Hockel M, Vaupel P. Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol* ;28(suppl 8):36-41.2001b.

Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* ; 93:266-276. 2001a.

Hubbi ME, Kshitiz, Gilkes DM, et al. A Nontranscriptional Role for HIF-1 α as a Direct Inhibitor of DNA Replication. *Science signaling.* 2013;6(262):ra10. doi:10.1126/scisignal.2003417.

Ji Z, Yang G, Shahzidi S, et al: Induction of hypoxia-inducible factor-1 α overexpression by cobalt chloride enhances cellular resistance to photodynamic therapy. *Cancer Lett* 244: 182-189, 2006.

Jung JY, Kim WJ. Involvement of mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism in CoCl₂-induced apoptosis of rat PC12 cells. *Neurosci Lett.* 2004 Nov 23;371(2-3):85-90.

Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006 Nov;70(5):1469-80. Epub 2006 Aug 3.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV (2006) HIF- 1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3:177–185.

Klimova, T., & Chandel, N. S. (2008). Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell death and differentiation*, 15(4), 660-6. doi:10.1038/sj.cdd.4402307.

Koshiji, Minori & Kageyama, Yukio & A Pete, Erin & Horikawa, Izumi & Barrett, Carl & Huang, Eric. (2004). HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *The EMBO journal.* 23. 1949-56. 10.1038/sj.emboj.7600196.

Koumenis C, Alarcon R, Hammond E et al. Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol* 2001;21:1297-1310.

Koumenis, C., Naczki, C., Koritzinsky, M., Rastani, S., Diehl, A., Sonenberg, N., Koromilas, A., and Wouters, B.G. 2002. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2. *Mol. Cell. Biol.* 22: 7405–7416.

Kufe, D. W. & Major, P. P. 5-Fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 256, 9802–9805 (1981).

Lee C-T, Boss M-K, Dewhirst MW. Imaging Tumor Hypoxia to Advance Radiation Oncology. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2014;21(2):313-337. doi:10.1089/ars.2013.5759.

Littlewood TJ. The impact of hemoglobin levels on treatment outcomes in patients with cancer. *Semin Oncol* 2001;28(suppl 8):49-53.

Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature reviews. Cancer*, 3(5), 330-8. doi:10.1038/nrc1074.

Lopez-Sánchez LM, Jimenez C, Valverde A, et al. CoCl₂, a Mimic of Hypoxia, Induces Formation of Polyploid Giant Cells with Stem Characteristics in Colon Cancer. *Maki CG, ed. PLoS ONE.* 2014;9(6):e99143. doi:10.1371/journal.pone.0099143.

Lv Y, Zhao S, Han J, Zheng L, Yang Z, Zhao L. Hypoxia-inducible factor-1 α induces multidrug resistance protein in colon cancer. *OncoTargets and therapy.* 2015;8:1941-1948. doi:10.2147/OTT.S82835.

Majed S.Al Okail. Cobalt chloride, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1 α in U251 human glioblastoma cell line. *Journal of Saudi Chemical Society.* Volume 14, Issue 2, April 2010, Pages 197-201.

Mhaidat nm, Bouklihacene m, Thorne rf. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase C- δ . *Oncology Letters.* 2014;8(2):699-704. doi:10.3892/ol.2014.2211.

Miikkulainen P, Högel H, Rantanen K, et al. HIF prolyl hydroxylase PHD3 regulates translational machinery and glucose metabolism in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer & Metabolism.* 2017;5:5. doi:10.1186/s40170-017-0167-y.

Prabhakar NR, Semenza GL. Oxygen Sensing and Homeostasis. *Physiology.* 2015;30(5):340-348. doi:10.1152/physiol.00022.2015.

Rankin EB, Giaccia AJ. Hypoxic control of metastasis. *Science (New York, NY).* 2016;352(6282):175-180. doi:10.1126/science.aaf4405.

Rohwer, N., & Cramer, T. (2011). Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 14(3), 191-201. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.drug.2011.03.001.

Roizin-Towle, L., Hall, E.J., 1978. Studies with bleomycin and misonidazole on aerated and hypoxic cells. *Br. J. Cancer* 37, 254–260.

Rui Chen, Ting Jiang, Yanling She, Jiehua Xu, Cheng Li, Shanyao Zhou, Huijuan Shen, Huacai Shi, and Shuang Liu. Effects of Cobalt Chloride, a Hypoxia-Mimetic Agent, on Autophagy and Atrophy in Skeletal C2C12 Myotubes. *BioMed Research International* Volume 2017, Article ID 7097580.

- Rutman, R. J., Cantarow, A. & Paschkis, K. E. Studies on 2- acetylaminofluorene carcinogenesis: III. The utilization of uracil- 2-C14 by pre-neoplastic rat liver. *Cancer Res.* 14, 119 (1954).
- Schumacker, P.T. 2003. Current paradigms in cellular oxygen sensing. *Adv. Exp. Med. Biol.* 543: 57–71.
- Schwarz G. Uber Desensibilisierung gegen Rontgen- und Radiumstrahlen. *Munchener Med Wochenschr* 1909;24:1-2.
- Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *The Journal of Clinical Investigation.* 2013;123(9):3664-3671. doi:10.1172/JCI67230.
- Semenza, Gregg L. (2007). Hypoxia and cancer. *Cancer metastasis reviews*, 26(2), 223-4. doi:10.1007/s10555-007-9058-y.
- Shan J, Xuan Y, Zhang Q, Huang J. Ursolic acid sensitized colon cancer cells to chemotherapy under hypoxia by inhibiting MDR1 through HIF-1 α . *Journal of Zhejiang University Science B.* 2016;17(9):672-682. doi:10.1631/jzus.B1600266.
- Sharp FR, Ran R, Lu A, et al. Hypoxic Preconditioning Protects against Ischemic Brain Injury. *NeuroRx.* 2004;1(1):26-35.
- Smith KA, Waypa GB, Schumacker PT. Redox signaling during hypoxia in mammalian cells. *Redox Biology.* 2017;13:228-234. doi:10.1016/j.redox.2017.05.020.
- Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, et al. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 2001;61:6669–73.
- Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL (2007) Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 26:299–310.
- T Liu, C Laurell, G Selivanova, J Lundeberg, P Nilsson and K G Wiman; Hypoxia induces p53- dependent transactivation and Fas/CD95-dependent apoptosis, *Cell Death and Differentiation* (2007) 14, 411–421.
- Tan ZM, Wu Y, Zhang HL, Xiao XZ. [CoCl₂-induced chemotherapy resistance in SW480 cells and its mechanism]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2006 Jun;31(3):345-9.
- Teicher BA, Holden SA, al-Achi A et al. Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the FSa1C murine fibrosarcoma. *Cancer Res* 1990;50:3339-3344.
- Toffoli S, Michiels C. Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours. *FEBS J.* 2008 Jun;275(12):2991-3002. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06454.x. Epub 2008 Apr 25.
- Vaupel P, Thews O, Hoekel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001;18:243-259.

Vengellur A., Woods B. G., Ryan H. E., Johnson R. S., LaPres J. J. (2003). Gene expression profiling of the hypoxia signaling pathway in hypoxia-inducible factor 1alpha null mouse embryonic fibroblasts. *Gene Expr.* 11, 181–197

Wang Y, Ma J, Shen H, et al. reactive oxygen species promote ovarian cancer progression via the hif-1 α /lox/e-cadherin pathway. *oncology reports.* 2014;32(5):2150-2158. doi:10.3892/or.2014.3448

Wang, G.L. and Semenza, G.L. 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270: 1230–1237.

Wohlhueter, R. M., Mclvor, R. S. & Plagemann, P. G. Facilitated transport of uracil and 5- fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J. Cell Physiol.* 104, 309–319 (1980).

Wortel IMN, van der Meer LT, Kilberg MS, van Leeuwen FN.. Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends Endocrinol Metab.* 2017 Aug 7. pii: S1043-2760(17)30100-5. doi: 10.1016/j.tem.2017.07.003.

Yang G, Xu S, Peng L, Li H, Zhao Y, Hu Y. The hypoxia-mimetic agent CoCl₂ induces chemotherapy resistance in LOVO colorectal cancer cells. *Molecular Medicine Reports.* 2016;13(3):2583-2589. doi:10.3892/mmr.2016.4836.

Yang M, Su H, Soga T, Kranc KR, Pollard PJ. Prolyl hydroxylase domain enzymes: important regulators of cancer metabolism. *Hypoxia.* 2014;2:127-142. doi:10.2147/HP.S47968.

Yoo HI, Moon YH, Kim MS. Effects of CoCl₂ on multi-lineage differentiation of C3H/10T1/2 mesenchymal stem cells. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology.* 2016;20(1):53-62. doi:10.4196/kjpp.2016.20.1.53.

Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn 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. doi: 10.1074/jbc.M300463200.

Zou W, Zeng J, Zhuo M, Xu W, Sun L, Wang J, Liu X. Involvement of caspase-3 and p38 mitogen-activated protein kinase in cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res.* 2002 Mar 15;67(6):837-43.