Hipoxia en la malignidad del cáncer. Revisión.

Francisco Arvelo y Carlos Cotte.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Oxígeno, hipoxia, cáncer, HIF-1, angiogénesis, metástasis.

Resumen. La hipoxia es una característica común en los tumores sólidos, contribuyendo local y sistémicamente a la progresión tumoral, además de la falta de respuesta a la radioterapia y quimioterapia, lo cual provoca un incremento en la probabilidad de recurrencia de un tumor. El factor de transcripción HIF-1 es el mayor regulador de la adaptación del tumor a la hipoxia, induciendo la expresión de muchos genes que permiten a las células sobrevivir en estas condiciones. Los eventos dependientes de HIF-1 que están implicados en la progresión tumoral son múltiples, destacando la proliferación, el metabolismo de la glucosa, la angiogénesis y la metástasis. Es fundamental investigar más acerca de los mecanismos de acción del factor HIF-1 ya que es factible encontrar inhibidores que puedan usarse terapéuticamente contra el cáncer. En este trabajo se hace una revisión del papel que desempeña el factor HIF-1 en la hipoxia, así como su implicación en la angiogénesis y la metástasis.

Hypoxia in cancer malignity. Review.

Invest Clin 2009; 50(4): 529 - 546

Key words: Oxygen, hypoxia, cancer, HIF-1, angiogenesis, metastasis.

Abstract. Hypoxia is a common characteristic of solid tumors. It contributes to local and systemic tumor progression, as well as the lack of response to radio and chemotherapy, therefore increasing the probability of tumor recurrence. The HIF-1 transcription factor is the main regulator of tumor adaptation to hypoxia stress, stimulating the expression of many genes that allow cells to survive under these conditions. Products dependent on HIF-1 factor are involved in processes of tumor progression, such as proliferation, glucose

metabolism, ph-acidosis, angiogenesis and metastasis. It has become increasingly necessary to gain knowledge on the HIF-1 mechanisms of action, since it is possible to find inhibitors that could be used therapeutically against cancer. In this review, a summary is given on the role that the HIF-1 factor plays in hypoxia, as well as its implications on angiogenesis and metastasis.

Recibido: 25-09-2008. Aceptado: 18-06-2009.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas respiratorio y cardiovascular hacen posible la adecuada provisión y distribución de oxígeno (O_2) en todo el organismo, permitiendo que las células, por medio de la fosforilación oxidativa, adquieran la energía necesaria para funcionar adecuadamente y así mantener sus niveles homeostáticos. Por ello, tanto la función y viabilidad celular como la integridad funcional y estructural de los tejidos y órganos dependen del constante y adecuado suministro de O_2 . Por el contrario, si hay reducción en su disponibilidad, causada por alteraciones respiratorias o circulatorias, tal situación no podrá ser tolerada, ni siquiera por cortos períodos de tiempo, provocándose escasez de la energía que es producida por la glicólisis anaeróbica. En el caso de ocurrir lo contrario, una excesiva acumulación de O_2 , se pueden ocasionar lesiones en las células debido a la acumulación de especies reactivas de O_2 , (ROS en inglés), capaces de oxidar macromoléculas tan fundamentales como lo son las proteínas y los ácidos nucleicos. Es por estas razones que las células poseen un sistema para detectar los cambios de O_2 , que les permite regular, de forma muy efectiva, su equilibrio, respondiendo a las variaciones mediante mecanismos protectores y adaptativos que evitan o minimizan el daño a los tejidos (1). La adaptación a la baja tensión de oxígeno en células y tejidos lo que se conoce como hipoxia, promueve la inducción transcripcional de una serie de genes que participan tanto en la angiogénesis, el metabolismo del hierro y

la glucosa, como en la supervivencia y la proliferación celular. Lo que media esta respuesta es un factor sensible al oxígeno que se expresa ubicuamente en todos los tejidos del organismo, el cual ha sido bastante estudiado (2). La hipoxia, al provocar una baja en el potencial energético de las células, hace que el O_2 necesario para la fosforilación oxidativa disminuya a nivel celular (3). Tal disminución es detectada por un complejo mecanismo de reacciones sensibles a su descenso, cuyo resultado final será la estabilización de un factor de transcripción denominado "factor inducible por hipoxia", (HIF-1 en inglés), el cual estimulará la expresión de un gran número de genes que harán posible la adaptación de las células a las condiciones de hipoxia (4, 5). La irrigación sanguínea es fundamental para todos los tejidos, por lo que la ausencia de una red vascular adecuada interferirá con el crecimiento, bien sea en tejidos normales o tumorales, estando el mismo limitado por la mayor o menor capacidad del O_2 de poderse difundir para llegar adecuadamente a las células. En el caso específico de la hipoxia tumoral, ella es considerada como uno de los más graves problemas terapéuticos en el paciente con cáncer, esto hace que los tumores sean más resistentes a la quimioterapia y la radioterapia. A este respecto, los estudios clínicos y experimentales muestran que la ausencia de oxígeno en el interior del tumor modifican su potencial maligno (6).

Todo indica que los tumores se desarrollan preferentemente en las regiones hipóxicas, donde los mecanismos de respues-

ta a la falta de O_2 se convierten en factores fundamentales en algunos de los eventos de la progresión tumoral, como lo son la angiogénesis, la infiltración y la metástasis. En todos estos fenómenos destaca, en primer lugar, la angiogénesis, que es el mecanismo utilizado para responder a las necesidades metabólicas de crecimiento de un tumor, siendo su ausencia una etapa limitante de la progresión tumoral y la metástasis. La angiogénesis es así un proceso capital para el crecimiento del tumor cuando éste, en su desarrollo, va más allá de unos pocos mm de diámetro, lo cual dificulta la difusión de oxígeno y nutrientes celulares (7). Al limitarse la difusión del O_2 , las células endoteliales, tanto en tejidos sanos como no sanos, son generadoras de los nuevos vasos sanguíneos, y deben ser estimuladas para que puedan proliferar, y para que esto ocurra es necesario el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF en inglés), secretado bajo condiciones de hipoxia, que induce de esta manera, la proliferación y organización de las células endoteliales (8).

La presente revisión describe el papel que desempeña el factor HIF-1 como sensor de oxígeno, así como su implicación en la historia natural del cáncer, específicamente en el proceso de la angiogénesis y de la metástasis.

HIPOXIA

Existen la hipoxia temporal de tejidos traumatizados, durante el ejercicio, y la sepsis y la hipoxia crónica, de zonas de tejidos menos oxigenadas ocasionados por las grandes alturas, a lo cual sumamos la hipoxia presente en el campo de la patología, donde destacan por su frecuencia la isquemia tisular, la insuficiencia cardíaca, la enfermedad pulmonar y el cáncer (9).

La respuesta a la hipoxia puede sintetizarse en tres puntos:

a) Detección: sensor de oxígeno

- b) Regulación: control de la expresión genética
- c) Efector múltiple: expresión de genes y múltiples cambios funcionales, como la estimulación de moléculas vasodilatadoras hasta la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno.

El sistema regulador está modulado directamente por el sensor y el elemento organizador principal, que es el factor HIF-1. En cuanto al sensor de oxígeno, en los últimos años se han hecho avances notables para dilucidar su mecanismo de acción, basándose los estudios en su propiedad de activar la señalización vía factor HIF-1. Los modelos existentes involucran a diferentes moléculas como responsables de dicho mecanismo, tales como, las hidroxilasas, PHDs (prolyl hydroxylase domain en inglés) que utilizan 2-ceto-glutarato como sustrato, que al ser reguladas por el O_2 , son fundamentales y cumplen las premisas para ser consideradas como el sensor principal de oxígeno (10). En la estructura de estas proteínas, de grupo prostético tipo heme, el Fe^{2+} puede ser sustituido por otros metales como el Co^{2+} o el Ni^{2+} , causando un bloqueo en la capacidad hidroxilasa de la enzima y por lo tanto una inhibición de la degradación de HIF-1 (11). Otro tipo de regulación se atribuye a las especies reactivas de oxígeno, ROS, principalmente el superóxido O_2^- y el peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , con un papel modulador muy importante que se ejerce de dos maneras: a) la enzima NADPH oxidasa es la responsable de la producción de ROS, que en condiciones de normoxia induce la degradación de HIF-1; b) la producción de ROS en la mitocondria en condiciones de hipoxia induce la estabilización de HIF-1 (12). Los mecanismos celulares de ambas formas de regulación todavía no se han dilucidado, por lo que es otro punto fundamental en torno a la hipoxia que todavía debe ser investigado.

En la respuesta a la hipoxia, la diferencia entre los tejidos y órganos no proviene de su dotación genética, sino de la expresión particular de los genes en cada tipo celular, haciendo que los factores de transcripción actúen para orientar y adaptar, creando patrones definidos de respuesta para la proliferación, el crecimiento, la migración y la supervivencia. Esa misma respuesta requiere un alto nivel de coordinación, por lo que su mecanismo incluye todo un conjunto de cambios que van desde la expresión enzimática que adecúan la producción de energía frente a una menor disponibilidad de oxígeno, hasta la activación de mecanismos de autoeliminación de células por hacerseles imposible sobrevivir en circunstancias hostiles extremas. Todos los organismos, a todos los niveles, poseen mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis del O₂, esenciales para la producción de energía y la supervivencia.

En los mamíferos la respuesta a la hipoxia es compleja e incluye, entre otras, adaptaciones de la funciones respiratoria y hemodinámica, metabolismo intermedio, y función renal. Estas adaptaciones se muestran en cambios hormonales, de mediadores y de actividad enzimática, e implican variaciones en la expresión de una serie de genes entre los que destaca el factor de crecimiento del endotelio vascular, (VEGF en inglés). En esta revisión misma se destaca por su importancia, el incremento en la expresión de VEGF en condiciones de hipoxia, el cual ocurre a través de mecanismos moleculares de aumento de transcripción y/o estabilización del ARNm. Esta regulación transcripcional está mediada por la unión de HIF-1 a secuencias específicas localizadas en el promotor del VEGF constituida por las bases: -RCGTG- (13). La respuesta a la hipoxia es integral, y cubre todos los aspectos necesarios para abastecer de O₂ a las células y conseguir su utilización más eficaz. La identificación de genes que se acti-

van por HIF-1 ha aumentado ampliamente e incluyen muchos cuyas proteínas participan en múltiples funciones dirigidas a favorecer la oxigenación tisular, como lo son el metabolismo energético, la proliferación y viabilidad celular, la eritropoyesis, el remodelado vascular la angiogénesis y la apoptosis.

En los tratamientos contra el cáncer es fundamental evitar la hipoxia tumoral, ya que el O₂ es un potente radio-sensibilizador, por lo que evitarla o neutralizarla asegurará una mayor destrucción de la masa tumoral.

Existe una serie de factores que aumentan o disminuyen la radio-sensibilidad celular, siendo muy importante el “efecto oxígeno”, ya que, el oxígeno es el radio-sensibilizador más universal y potencia la acción de las radiaciones en todo tipo de células, lo cual tiene un valor terapéutico muy grande. Si se administra oxígeno en el momento de la radiación, dicho efecto es máximo.

Se han publicado dos teorías para explicar el efecto radio-sensibilizador del oxígeno:

- El oxígeno potencia la formación de radicales libres.
- Muchos de los cambios químicos que se producen como resultado de la irradiación son reversibles si el oxígeno no está presente.

Se ha demostrado que los pacientes con cáncer presentan un alto porcentaje de anemia leve antes de la radioterapia, y después del tratamiento la anemia se hace más severa. Se ha demostrado que al tratar tanto la hipoxia como la anemia en los pacientes con cáncer, se consigue un mayor control local regional del tumor, una mayor supervivencia y una mejor calidad de vida, así como un menor número de recidivas.

Actualmente, también para combatir la hipoxia, se están realizando ensayos clínicos en los que se promueve el aumento de la hemoglobina, y se utilizan técnicas que

aumentan su concentración, como pueden ser las transfusiones de hematíes, los tratamientos con eritropoyetina, etc. También se pueden incrementar los niveles de O₂ mediante el uso de la cámara hiperbárica (14-16).

FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA

El factor de transcripción HIF-1, al ser inducido por la hipoxia, modula numerosos genes que regulan la misma. El HIF-1 es un heterodímero de 120 kDa constituido por tres sub-unidades α : las HIF-1 α , HIF-2 α y la HIF-3 α (17), más una sub-unidad β conocida con el nombre de translocador nuclear del receptor Ah, Arnt, de 80 kDa, los cuales organizan proteínas nucleares constitutivas (18). Ambas sub-unidades contienen un dominio denominado bHLH, (siglas en inglés de basic helix-loop-helix), y un dominio de interacción proteína-proteína PAS, (siglas de Per Arnt Sim) (19). Los miembros de la familia bHLH, HIF-1 α y HIF-1 β se dimerizan para formar un complejo que se une al ADN en una secuencia conocida con el nombre de elemento de respuesta a la hipoxia, denominado en inglés HRE.

Bajo condiciones de normoxia, HIF- α es la unidad limitante del complejo, ya que es esencialmente indetectable debido a su rápida degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma (20), la cual es mediada por la proteína supresora de tumores VHL (von Hippel-Lindau, en inglés) (21, 22). La proteína VHL es un componente de la ligasa E3, implicada en la degradación de una familia de factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF en inglés), que activan la expresión de genes que inducen la angiogénesis, como lo es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF en inglés). La mayor parte de las mutaciones de VHL impide la degradación de HIF en condiciones normóxicas, y predispone a la formación de lesiones hiper-vasculares y tumo-

res renales (23). Para que el complejo HIF-1 sea funcional, la proteína HIF-1 α debe ser inducida, bien sea vía su estabilización o por mecanismos transcripcionales y traduccionales. Es importante señalar que HIF-1 α posee otros dominios funcionales importantes para la regulación de la actividad de este complejo (24), es extremadamente inestable en la normoxia, por lo que el mismo es hidroxilado sobre residuos específicos en su dominio de degradación dependiente del O₂ (ODDD en inglés). Una vez que el HIF-1 α es hidroxilado, es blanco del proteosoma para su degradación (25, 26). La regulación de la actividad de HIF-1 también se puede llevar a cabo por los dominios de transactivación de HIF-1 α que se encuentran en los dominios amino y carboxiloterminales (N-TAD y C-TAD). La activación del factor HIF-1 es regulada a numerosos niveles, con los cambios intracelulares del O₂ como estímulo principal (27), pero existen otros factores no relacionados con la hipoxia que pueden intervenir en la regulación, entre los que tenemos: la insulina, el factor de crecimiento epidermal EGF y el factor de crecimiento de plaquetas PDGF, a los cuales se suman las citocinas, tales como el factor- α de la necrosis tumoral y la interleuquina 1 β , que pueden aumentar la expresión del factor HIF-1. Todo sugiere la importancia de la activación de este factor durante algunos procesos anormales, como la inflamación y la tumorigénesis (28).

Hay múltiples genes que son blanco del factor HIF-1, ya que son regulados en caso de hipoxia, entre los que tenemos:

- a) De la proliferación celular y apoptosis (29,30):
 - factor de crecimiento-2 de la insulina IGF-2;
 - factor de crecimiento transformante- α TGF α ;
 - factor de crecimiento transformante- β , TGF β

- b) De la regulación de pH (31):
 - anhidrasa carbónica IX, CAIX
- c) Del metabolismo del Hierro (32):
 - transferrina
- d) De la eritropoyesis (33):
 - eritropoyetina, Epo
- e) Del metabolismo de la matriz extracelular (34):
 - metaloproteinasa-2, MMP2
- f) De la inflamación (35):
 - interleuquina-8, IL-8
- g) Del metabolismo de la glucosa (36):
 - transportador-1 de la glucosa, Glut1;
 - transportador-3 de glucosa, Glut3;
 - lactato deshidrogenasa A, LDHA;
 - aldolasa, fosfofructoquinasa L, PFKL
- h) De la resistencia a las drogas (37):
 - multidroga resistencia-1, MDR1
- i) De la angiogénesis (38-40):
 - factor de crecimiento vascular endotelial VEGF, VEGF-receptor-1, VEGF-R1/Flt1, VEGF-receptor-2, y VEGF-R2/Flk1;
 - factor- β de crecimiento derivado de las plaquetas PDGF β ;
 - angiopoyetina-2 Ang2;
 - inhibidor del activador del plasminógeno-1 PAI1.

La respuesta de HIF-1 es específica tanto para la hipoxia como para el estímulo por factores de crecimiento, que es la vía que se relaciona con la necesidad de proveer una mayor oferta de oxígeno en tejidos en expansión celular, lo cual lleva a preguntarnos si la célula responde a la caída energética de forma idéntica a cuando hay falta de oxígeno. Los datos disponibles parecen indicar 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 (41, 42). En células tubulares renales (LLC-PK1), la hipoxia no extrema no causa depleción de ATP, lo cual refleja la eficiente adaptación de la producción energética ante la disminución de oxígeno (41). No se

han realizado estudios similares con bloqueo de HIF-1, pero es probable que HIF-1 sea en gran parte responsable de la citada eficiencia, lo cual crearía nuevas posibilidades terapéuticas.

Las acciones cito-protectoras abarcan múltiples tipos celulares y respuestas sistémicas, siendo HIF-1 un factor transcripcional clave en una respuesta génica compleja, desarrollada a múltiples niveles. Se ha observado en ratones que episodios breves de hipoxia intermitente inducen la producción de EPO, la cual protege al corazón del daño apoptótico por isquemia; por el contrario, en animales que no expresan HIF-1, esta respuesta no ocurre, al no estimarse la producción de EPO con la hipoxia (43).

PATOLOGÍA TUMORAL Y FACTOR HIF-1

El rápido crecimiento de los tumores hace que su incremento de tamaño no se acompañe de un desarrollo vascular adecuado, lo que genera zonas de hipoxia en el interior de la masa tumoral. Esta hipoxia activa el factor 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 (44). En algunos casos la resistencia al tratamiento, independientemente de la hipoxia, 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, aún en normoxia (45, 46). 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 (47). Si bien el incremento de HIF-1 en los tumores es una realidad, no se han desarrollado medios terapéuticos basados en su bloqueo específico, por lo cual se hace necesario un mayor esfuerzo en las investigaciones al respecto. Por ejemplo,

aún 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 gran interés es el posible papel de HIF-1 en la adaptación metabólica de los tumores, en los que la glucólisis anaerobia no se inhibe en presencia de formación de ATP por vía aeróbica, situación que puede relacionarse en forma directa con el efecto protector del HIF-1 sobre las células tumorales. Por otra parte, en los tumores, el factor HIF-1 se encuentra marcadamente activado, lo cual se relaciona con una mayor agresividad del tumor. Otra posible explicación de los efectos de HIF-1 sobre los tumores proviene de datos 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 (48).

ANGIOGÉNESIS

Ha sido demostrado que los tumores malignos pueden inducir el proceso de la angiogénesis por medio de la liberación de una serie de factores, y que los tumores vascularizados tienen una alta propensión a producir metástasis, en contraposición a los tumores poco vascularizados o los carcinomas “*in situ*” (49, 50). El proceso de la angiogénesis involucra tres funciones celulares bien caracterizadas: 1) la motilidad; 2) la proteólisis y 3) la proliferación, las cuales exigen condiciones metabólicas adecuadas, dependientes de un suficiente suministro de oxígeno para obtener la energía necesaria que exigen las células para cumplir todas sus funciones.

Existe una serie de eventos bajo los cuales la angiogénesis puede iniciarse, la

cual está determinada por un balance de factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos, donde la hipoxia juega un rol primario como disparador de la misma al incrementar la actividad de HIF1, y por tanto los niveles de VEGF. En el caso del cáncer, al ser muchos de sus tratamientos citotóxicos, ellos pueden cambiar la oxigenación de los tumores y hacer que ello pueda influenciar la respuesta angiogénica del tumor. La regulación oncogénica de la angiogénesis también ha sido sugerida, bien sea sola o trabajando en combinación con la hipoxia. Por ejemplo, la sobre-regulación de H-RAS y el receptor de factor de crecimiento epidermal, EGFR, y la inactivación del gen supresor de tumores, TP53, pueden incrementar la tasa de síntesis de HIF-1 a un nivel tan alto que sobrepasa la capacidad de la vía de degradación para eliminarlo. La sobre-regulación de VEGF es también un disparador para la iniciación de la angiogénesis de las metástasis “dormidas” y el inhibidor de la angiogénesis, la trombospondina 1 puede inhibir la actividad de VEGF promoviendo la no proliferación celular en los focos metastásicos. Por otro lado, la hipoxia incrementará la actividad de regulación de HIF1, en tanto que VEGF disminuirá la regulación del trombospondina creando un medio ambiente favorable a la angiogénesis. El desarrollo vascular depende de regulaciones moleculares que ocurren tanto en el tejido sano como en el patológico (51), y son dependientes de señales paracrinas que inducen la formación, proliferación, migración y estructuración de las células vasculares para la formación de pequeños y grandes vasos. En los primeros participan dos tipos de células fundamentales: las endoteliales y los pericitos; en los segundos actúan las células endoteliales y las células musculares lisas (52).

Una serie de factores solubles, receptores y moléculas de la matriz extracelular juega un papel preponderante en la morfo-

génesis de la red vascular, estando la expresión de estos factores bajo el control molecular a nivel celular, que se conoce como encendedor angiogénico (angiogenic switch en inglés), y la hipoxia es un factor esencial para su funcionamiento (53). Por otra parte, un gran porcentaje de genes, inducidos luego de la respuesta a la hipoxia, está implicado en las diversas etapas de la angiogénesis, y son los que regulan el factor de crecimiento vascular endotelial VEGF, que es uno de los factores más importantes al ser el regulador de la formación de los nuevos vasos sanguíneos (54). En el caso particular de los tumores malignos, la presencia de la hipoxia en el seno de sus tejidos, es uno de los factores esenciales para que ocurra la angiogénesis tumoral, al activarse el factor HIF-1, lo cual hará posible proveer de O₂ a las células cancerosas, y mantener su equilibrio homeostático en un medio hipóxico, lo cual favorecerá su crecimiento, la invasión y la neo-vascularización, todo lo cual va a llevar a la metástasis (55). Como contrapartida, en el caso de la etapa embrionaria, recordemos que los precursores de las células endoteliales, angioblastos, se aglutinan y forman una primera red de capilares en el proceso conocido como vasculogénesis, la cual posibilitará la angiogénesis, que a partir de vasos sanguíneos preexistentes, será la responsable del desarrollo de los capilares adicionales (56).

El factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF, es el prototipo de molécula pro-angiogénica que está constituida por:

- una familia de seis factores de crecimiento denominados VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E;
- tres factores de crecimiento placentario, PLGF;
- tres receptores denominados VEGFR1 (flt1), VEGFR2 (KDR/Flk1) y VEGFR3 (FLt4).

El factor VEGF-A se une a VEGFR2 y VEGFR1; el factor VEGF-B se une solamen-

te a VEGFR1; el factor VEGF-C y el factor VEGF-D se unen preferencialmente a VEGFR3; finalmente las PLGF se unen a VEGFR1.

De la familia VEGF, la molécula VEGF-A es la mejor caracterizada, está compuesta de seis isoformas (57, 58), y una de sus características principales es la capacidad de inducir permeabilidad vascular que conduce a un depósito de fibrina en la matriz extracelular, la cual sirve de soporte para la migración de las células endoteliales (59). En el caso de los receptores de VEGF, los VEGFR, son tres tiroxina-quinasastransmembrana que se localizan preferencialmente en las células endoteliales (60).

Por otra parte, es importante destacar que el encendedor angiogénico no depende solamente de la hipoxia, sino también de la transformación oncogénica. La activación del oncogén *RAS* induce la expresión de VEGF e inhibe el de la trombospondina (61).

La expresión de VEGF es regulada por una serie de factores tales como la hipoxia, el estrés oxidativo, el supresor de genes, las citocinas y los factores de crecimiento. Existen otros factores que no solo estimulan las células endoteliales, sino también a los pericitos, entre ellos se encuentran el factor de crecimiento de los fibroblastos, (FGF en inglés), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF en inglés), y las angiopoyetinas (62).

Los estudios genómicos comparativos han demostrado que los vasos linfáticos son genéticamente diferentes a los vasos sanguíneos (63), y que la linfoangiogénesis juega un papel importante en la metástasis, habiéndose determinado la influencia que tiene VEGF-C y VEGF-D, así como el receptor 3 del VEGF (VEGFR3) (64). También se ha demostrado que los factores de crecimiento de fibroblastos, tales como FGF1 y FGF2, inducen la linfangiogénesis (65). El gen *PROX1* induce la expresión de FGF3, lo

que trae como consecuencia el aumento de sensibilidad de los vasos linfáticos por los factores de crecimiento de fibroblastos (66). Por otro lado es importante señalar que el bloqueo de la linfoangiogénesis por la inhibición de antagonistas de VEGFR-3, inhibe la metástasis (67).

Las integrinas de las células endoteliales también contribuyen a la regulación de la angiogénesis y la linfoangiogénesis. Las integrinas son proteínas transmembrana compuestas por diferentes sub-unidades capaces de formar más de 20 heterodímeros diferentes que unen tanto proteínas de la matriz extracelular como ligandos de la superficie celular a través de secuencias peptídicas cortas (68). Es importante señalar que los vasos quiescentes expresan un tipo de integrinas, mientras que los vasos que experimentan angiogénesis expresan tipos distintos. Por otra parte, una serie de proteasas extracelulares, que se encuentran física y funcionalmente conectadas con las integrinas proangiogénicas, que también intervienen en el proceso (69)..

En el caso particular de la expresión de la integrina denominada avb3, la misma es mínima en el endotelio en reposo, pero durante la angiogénesis aumenta notablemente y la inhibición de su interacción con su ligando es inductora de la apoptosis endotelial. De esta forma, avb3 actúa como un biosensor para facilitar la muerte celular cuando el endotelio interacciona con una matriz extracelular "inapropiada", lo cual facilita una morfogénesis vascular correcta y evita la formación de vasos, lo que indica que es un importante blanco terapéutico (70).

Las enzimas proteolíticas tales como las metaloproteasas y sus inhibidores, y el activador del plasminógeno, controlan la angiogénesis, destacando, adicionalmente, que estas moléculas deben estar presentes a concentraciones críticas para promover la invasión, y es por ello necesaria la presencia

de inhibidores, tal como por ejemplo, el inhibidor de la metaloproteasa MMP2 (TIMP2), presente en la superficie celular para poder ejercer la actividad proteolítica (71). Durante la migración de las células endoteliales, el bFGF induce la expresión del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) y del tipo tisular (t-PA); del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1) y del receptor de u-PA.

Una vez que las células endoteliales se activan por acción del estímulo angiogénico, su fenotipo cambia notablemente, produciéndose un cambio de su forma plana a redondeada, a lo cual se suma la liberación de una serie de proteasas que le permitirán disolver su membrana basal. Aunque se han implicado proteasas de diversas familias en el proceso de la angiogénesis, las que parecen tener un papel más importante son el activador de plasminógeno y las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs). Adicionalmente, el factor VEGF también estimula, en las células endoteliales, la producción de los activadores de plasminógeno y de sus inhibidores.

Con respecto a las MMPs, se han implicado en fenómenos que requieren la angiogénesis, tales como lo son la artritis y la cicatrización de heridas. Algunos de los factores angiogénicos, tales como VEGF, bFGF, IL-1 y TNF- α estimulan la producción de MMP-1, MMP-3 y MMP-9 por las células endoteliales; adicionalmente, algunos inhibidores de MMPs son inhibidores de la angiogénesis tanto *in vivo* como *in vitro* (72, 73).

Durante la angiogénesis, la acción degradadora, ejercida por las enzimas proteolíticas, está implicada en, por lo menos, tres pasos de este proceso: a) degradación de la membrana basal, b) migración, c) formación del lumen vascular.

Estas enzimas también pueden modular la actividad de los factores angiogénicos, bien sea por la activación directa de ci-

toquinas latentes, tales como el TGF- β , o de forma indirecta, liberando citoquinas unidas a la matriz extracelular, tales como el b-FGF (74).

METÁSTASIS

Dos son los procesos que definen la malignidad de un tumor: El primero es la capacidad de sus células para invadir e infiltrar los tejidos adyacentes y el segundo el poder migrar y crecer en tejidos distantes, proceso conocido como metástasis. Estrictamente, estos procesos no son exclusivos del cáncer, sino que también se producen en tejidos sanos, como es la invasión del trofoblasto durante el embarazo o la salida de leucocitos del torrente sanguíneo hacia los focos de infección (diapédesis leucocitaria) (75).

Los fenómenos de la infiltración y la metástasis no son de carácter puramente mecánico, ya que las células no entran casualmente en el torrente sanguíneo para provocar la aparición de los focos metastásicos, para que ello ocurra es necesario que se produzcan importantes cambios genéticos en el tumor, con la expresión de genes que codifican proteínas que permiten la separación de las células vecinas, romper la membrana basal y viajar por el torrente sanguíneo (76). Es evidente que estos procesos y cambios genéticos son de gran complejidad, y se producen en fases muy tempranas del desarrollo del tumor, en su mayoría durante la etapa de crecimiento asintomático del mismo.

Las características clínicas en el cáncer son claramente entendidas al considerarse la principal limitación que se encuentra para la curación de un paciente: enfrentar la heterogeneidad tanto de los tumores primarios como de sus metástasis. En un tumor maligno existen diferentes sub-poblaciones celulares con distintos grados de diferenciación, proliferación y capacidad me-

tastásica, a lo cual hay que sumar la compleja e incierta respuesta a los tratamientos (77). Siempre habrá que considerar que las sub-poblaciones o clones celulares se van adaptando y seleccionando en función de los cambios del medio ambiente, tales como hipoxia, tipo de agentes citotóxicos, radiación, etc.

En el proceso de desarrollo de la metástasis no todos los clones generados son iguales, lo cual se hace evidente durante su crecimiento por una heterogeneidad observable en su comportamiento, reflejando no solo la que afecta al tumor primario, sino también a las metástasis. Tal heterogeneidad se debe principalmente a la inestabilidad genética de las células tumorales y a la selección de sub-poblaciones mutantes durante el desarrollo y fases del proceso tumoral. Entre los factores que contribuyen a esta inestabilidad destacan las mutaciones del oncogén p53, los genes implicados en la reparación del ADN, los genes de la apoptosis y los genes que intervienen en la regulación del ciclo celular, entre otros (78).

El estudio de la angiogénesis es, en la historia natural del cáncer, de gran importancia, ya que la creación de una nueva red capilar marcará un antes y un después en la evolución de cualquier tumor. Al hacerse el crecimiento más rápido ante el aumento de la fracción de células proliferativas inducidas por una mayor accesibilidad al oxígeno y nutrientes, se facilita la diseminación tumoral, jugando todo ello un papel fundamental en la infiltración y la metástasis (79). Tanto la hipoxia en sí, como las alteraciones genéticas en la cascada de señalización conducen a una expresión constitutiva del factor HIF-1 con la consecuente neovascularización que facilita la dispersión del tumor (80).

Estudios inmuno-histoquímicos señalan que HIF-1 y HIF-2 se encuentran sobre-expresados en los tumores primarios y las metástasis en el cáncer humano, donde

su nivel de expresión es el resultado de la hipoxia, y está correlacionado tanto con la angiogénesis tumoral como con la mortalidad (81). La progresión tumoral y la invasión, están asociadas con el incremento de la capacidad de las células tumorales de promover la remodelación de la matriz extracelular, aumentar la migración celular y romper la membrana basal. Estos fenómenos son posibles por la acción del factor HIF-1, que induce una serie de genes entre los que se encuentran aquellos que sintetizan la vimentina (82), la fibronectina (83), las queratinas (84), la metaloproteasa-2 (MMP2) (85), la catepsina D (86) y el receptor de la urokinasa plasminógeno (uPAR) (87).

Hay otros factores que promueven la migración que también están bajo la inducción de HIF-1, tales como el receptor citoquina CXCR4 (88), y el receptor tirosina quinasa del oncogen c-Met (89).

En un tumor pueden existir áreas de hipoxia aguda y crónica, la primera se encuentra cerca de los vasos sanguíneos, lo cual hace que las células tumorales tengan acceso directo a ellos, facilitando por tanto la metástasis, ello en contraposición a las células en áreas de hipoxia crónica. Por otra parte, los vasos linfáticos tienden a localizarse en la periferia de los tumores, por lo que la hipoxia aguda promueve en la periferia del tumor la invasión y la migración de las células tumorales vía los vasos linfáticos, lo cual incrementa la metástasis en los nódulos linfáticos (90, 91).

Ha sido bien establecido que muchos tumores humanos desarrollan un micro-ambiente fisiopatológico durante su crecimiento, caracterizado por una red microvascular irregular que hacen posible regiones de células hipóxicas. Por otra parte, hay una sustancial heterogeneidad en la proporción de células hipóxicas en cada tumor, debido al desarrollo estocástico de su vascularización (92).

Existen sistemas de reconocimiento intercelular que hacen factible que las células de un mismo tejido se adhieran entre sí, lo cual es condición indispensable para la estabilización de la arquitectura tisular. Dos clases diferentes de moléculas de adhesión celular, CAMs (*cell adhesion molecules*) operan en la mayoría de los animales multicelulares, un grupo es calcio dependiente, en tanto que el otro no lo es. En los tejidos de los vertebrados, las cadherinas son las moléculas responsables de la adhesión intercelular, la mayoría son glucoproteínas de transmembrana que contienen sitios de unión al calcio, por lo cual ellas son dependientes de este elemento (93). Las primeras tres cadherinas descubiertas fueron nombradas de acuerdo con el tejido del cual se aislaron. La E-cadherina se obtuvo de las células epiteliales, la N-cadherina de las células nerviosas y la P-cadherina de la placenta. La molécula de adhesión intercelular E-cadherina (CDE) es un elemento esencial responsable del mantenimiento de la homeostasis y arquitectura de los epitelios, jugando un papel fundamental en el proceso de invasión tumoral (94), por lo que su pérdida de expresión o función está directamente asociada a la adquisición de la capacidad invasiva (95). Adicional a ello, también se ha identificado una serie de factores de transcripción que actúan como represores de la expresión del gen CDE, que participa de forma directa, en la adquisición del fenotipo invasivo (96).

Una de las características de las células tumorales es la pérdida de inhibición de la proliferación por contacto, lo que permite que las células crezcan en cultivo formando focos. Esta propiedad está originada, al menos en parte, por la pérdida de expresión de CDE asociada a la activación de una vía de señalización intracelular en la que participa la β -catenina (97).

La E-cadherina desempeña un papel central en el control de la transición epite-

lio mesenquimal o trans-diferenciación (TEM), ya que la pérdida de su expresión o función está correlacionada con la capacidad de las células epiteliales de adoptar una morfología invasiva y migratoria típicamente mesenquimal (98). La TEM es un proceso complejo, generalmente reversible, que comienza con la rotura de las uniones intercelulares y la pérdida de polaridad apico-basal, típica de las células epiteliales, las cuales se transforman en células tipo fibroblástico con características migratorias e invasivas. Este proceso ocurre “*in vivo*” durante el desarrollo embrionario y en algunos mecanismos, patológicos o no, como la reparación de heridas o la progresión tumoral (99).

Existen evidencias que sugieren que la hipoxia juega un papel importante en los cambios que ocurren en las uniones intercelulares, por lo cual ella estaría envuelta en la iniciación de la progresión tumoral (100). En la hipoxia la activación del factor HIF-1 está asociada con la pérdida de la expresión de la E-cadherina, habiéndose encontrado en el cáncer renal la mutación en el gen supresor von Hippel Lindau (VHL), que conduce a una activación del factor HIF-1 con la consecuente supresión de la expresión de la E-cadherina (101). El mecanismo por el cual la hipoxia inactiva la expresión de la E-cadherina está controlado a nivel transcripcional por el factor nuclear denominado Snail/Slug, por lo que su activación suprime la expresión de E-cadherina (102). El factor de transcripción Snail actúa como un potente represor de la expresión de E-cadherina y por tanto como inductor de la transición epitelio-mesenquimal (103). Las enzimas lisil-oxidasa 2 (LOXL2) y 3 (LOXL3) interactúan y cooperan en la expresión de la E-cadherina mediada por el factor Snail, el cual posee dos lisinas, la Lys 98 y la Lys 137, muy importantes para su estabilidad, cooperación con la lisil-oxidasa y para su función en el con-

trol de las transiciones epitelio-mesenquimales.

La sobre-expresión de las enzimas LOXL2 o LOXL3, en células epiteliales, induce el proceso de migración celular, lo cual sugiere que la sobre-expresión de estos mismos genes, u otros con funciones equivalentes, podría jugar algún papel en la metástasis de tumores del tejido epitelial (104). Estas evidencias sugieren que las enzimas lisil-oxidasa (LOX) son responsables de las propiedades invasivas de las células tumorales hipóxicas inducidas por el factor HIF1 (105, 106).

Por otra parte, el modulador HDAC6 de TGF- β 1 induce la transición epitelio-mesenquimal, y juega un papel crítico en la progresión tumoral (107). La represión de los genes E-cadherina puede ocurrir a través de la inducción de Slug por intermedio de TGF- β 1 (108, 109).

El factor de transcripción Twist es un regulador de la gastrulación, y está implicado como mediador de la metástasis en el cáncer (110), por lo que la co-expresión de HIF1, Twist y Snail, en tumores primarios, promueve la metástasis en respuesta a hipoxia intra-tumoral (111).

Las células tumorales expresan integrinas que transmiten al interior de las células, señales promotoras del crecimiento, y su activación es consecuencia de su interacción con moléculas de la matriz extracelular. Tanto los receptores de los factores de crecimiento, como las integrinas, activan la vía intracelular de transmisión de señales Sos-Ras-Raf-MAPK (112). Hay que destacar que la proteína Ras se encuentra alterada en el 25% de los tumores humanos, transmitiendo señales de crecimiento, aunque no reciba el estímulo de las moléculas que la preceden en la vía de transmisión de señales. Esta vía, en la que interviene la proteína Ras, está conectada con otras vías de transmisión de señales, las cuales aumen-

tan la proliferación celular y la capacidad de supervivencia de la célula.

La idea de que el exceso de proliferación tumoral es una consecuencia de la activación de señales de crecimiento en la propia célula tumoral es cierta, pero sería una simplificación si dejara de considerarse la participación de señales de crecimiento adicionales. Una característica muy importante de las células tumorales es la capacidad de utilizar, en su provecho, señales paracrinas del tumor y señales endocrinas del organismo, tales como las señales paracrinas de los fibroblastos y de las células endoteliales (113, 114).

En conclusión, éstas y muchas otras investigaciones muestran la importancia fundamental del factor HIF-1 como sensor de oxígeno en el organismo, específicamente en la biología de la célula maligna y el papel preponderante que desempeña en la progresión tumoral. Esto hace necesario que se profundice aún más en su estudio para así alcanzar un mayor conocimiento de sus mecanismos de acción y se haga un mayor énfasis en los estudios farmacológicos que puedan asegurar la utilización de inhibidores de la actividad del factor HIF-1 a fin de inhibir la angiogénesis y la metástasis en los tumores sólidos más frecuentes.

REFERENCIAS

1. **Acker H.** The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005; 360:2201-2210.
2. **Ke Q, Costa M.** Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1469-1480.
3. **Semenza GL.** Hypoxia, clonal selection, and role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35:71-103.
4. **Brahimi-Horn C, Pouyssegur J.** The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer* 2006; 93:E73-E80.
5. **Clottes E.** Hypoxia-inducible factor 1: regulation, involvement in carcinogenesis and target for anticancer therapy. *Bull Cancer* 2005; 92:119-127.
6. **Vaupel P, Mayer A.** Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer metastasis* 2007; 26:225-239.
7. **Bikfalvi A.** Angiogenèse tumorale. *Bulletin Cancer* 2003; 90:449-458.
8. **Conway EM, Colle D, Carmeliet P.** Molecular mechanism of blood vessel growth. *Cardiovas* 2001; 49:507-521
9. **Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B.** Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:425-437
10. **Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF.** Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988; 242:1412-1415.
11. **Maxwell P, Salnikow K.** HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol The.* 2004; 3:29-35.
12. **Michiels C, Minet E, Mottet D, Raes M.** Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:1231-1242
13. **Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE.** Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:5680-5684
14. **Harrison LB.** Radiotherapy-associated anemia: the scope of the problem. *The Oncologist* 2000; 5:1-7.
15. **Cella D.** Factors influencing quality of life in cancer patients: anemia and fatigue. *Semin Oncol* 1998; 25:43-46.
16. **Bus R S.** The significance of anemia in clinical radiation therapy. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12:2047-2050.
17. **Wang GL, Semenza GL.** Purification and characterization of hypoxia-inducible factor-1 *J Biol Chem* 1995; 1:1230-1237.
18. **Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL.** Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of HIF-1. *J Biol Chem* 1996; 271:17771-17778.
19. **Wang GL, Jiang BH, Rue E, Semenza GL.** Hypoxia inducible factor-1 is a Basic-he-

- lix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:5510-5514.
20. **Salceda S, Caro J.** Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642-22647.
 21. **Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW.** The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399: 271-275.
 22. **Maynard MA, Ohh M.** Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. *Am J Nephrol* 2004; 24:1-13.
 23. **Kaelin WG.** Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:673-682.
 24. **Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J.** Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 α requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* 2005; 17: 1-9.
 25. **Adams J.** The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Reviews* 2003; 29(Suppl 1):3-9.
 26. **Hagg M, Wennstrom S.** Activation of hypoxia-induced transcription in normoxia. *Exp Cell Res* 2005; 306:180-191.
 27. **Lauzier MC, Michaud MD, Dery MA, Richard DE.** Activation during tumor progression: implications and consequences. *Bulletin Cancer* 2006; 93:349-356.
 28. **Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T.** Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 α by insulin and interleukin-1 β involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 2002; 512:157-162.
 29. **Catrina SB, Botusan IR, Rautanene A, Catrina AI, Pyakurel P, Savu O, Axelson M, Biberfeld P, Poellinger L, Brismark K.** Hypoxic-inducible factor-1 α and hypoxia-inducible factor-2 α are expressed in Kaposi sarcoma and modulated by insulin-like growth factor I. *Clin. Cancer Res* 2006; 12:4506-4514.
 30. **Shi YF, Fena CC, Sank Q, Cheung PY, Tzanq CH, Wu RS, Yana M.** Hypoxia induces the activation of human hepatic stellate cells LX-2 through TGF- β signaling pathway. *FEBS Lett* 2007; 581(2): 203-210.
 31. **Pastorekova S, Parkkila S, Zavada J.** Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. *Adv Clin Chem* 2006; 42:167-216.
 32. **Jones DT, Trowbridge IS, Harris AL.** Effects of transferrin receptor blockade on cancer cell proliferation and hypoxia-inducible factor function and their differential regulation by ascorbate. *Cancer Res* 2006; 66:2749-2756.
 33. **Lauqsh M, Metzen E, Svensson T, Depping R, Jelkmann W.** Lack of functional erythropoietin receptors of cancer cell lines. *Int J Cancer* 2008; 122:1005-1011.
 34. **Handsley MM, Edwards DR.** Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2005; 115:849-860.
 35. **Ahn JK, Koh EM, Cha HS, Lee YS, Kim J, Bae EK, Ahn KS.** Hypoxia-induced expressions of IL-8, MMP-1 and MMP-3 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology* 2008; 47:834-839.
 36. **Airley RE, Mobasher A.** Hypoxic regulation of glucose transport anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* 2007; 53:233-256.
 37. **Zhu h, Chen XP, Luo SF, Guan J, Sank WG, Sank BX.** Involvement of hypoxia-inducible factor-1- α in multidrug resistance induced by hypoxia in HepG2 cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24:565-574.
 38. **Ljungberg BJ, Jacobsen J, Rudolfsson SH, Lindh G, Grankvist K, Rasmuson A.** Different vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-receptor 1 and -2 mRNA expression profiles between clear cell and papillary renal cell carcinoma. *BJU Int* 2006; 98:661-667.
 39. **Kuhnert F, Tam BY, Sennino B, Gray JT, Yuan J, Jonson A, Kayak NR, Mulligan RC, McDonald DM, Kuo CJ.** Soluble receptor-mediated selective inhibition of VEGF-R and PDGF-R β signaling during physiologic and tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:10185-10190.

40. Lee OH, Xu J, Fueyo J, Alonso MM, Li UD, Martin V, Jianq H, Piao Y, Liu TJ, Gomez-Manzano C. Angiopoietin-2 decreases vascular endothelial growth factor expression by modulating HIF-1 alpha levels in gliomas. *Oncogene* 2008; 27:1310-1314.
41. Eickelberg O, Seebach F, Riordan M, Thulin G, Mann A, Reidy KH, Van Why SK, Kashgarian M, Siegel N. Functional activation of heat shock factor and hypoxia-inducible factor in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2094-2101.
42. Mabjeesh NJ, Post DE, Willard MT, Kaur B, Van Meir EG, Simons JW, Zhong H. Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 2478-2482.
43. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodríguez ER, Fox-Talbot K, Lu H. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003; 108: 79-85.
44. Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30:465-468.
45. Kanno H, Kondo K, Ito S, Yamamoto I, Fujii S, Torigoe S. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic central nervous system hemangioblastomas. *Cancer Res* 1994; 54: 4845-4847.
46. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994; 7:85-90.
47. Wellmann S, Guschmann M, Griethe W, Eckert C, von Stackelberg A, Lottaz C. Activation of the HIF pathway in childhood ALL, prognostic implications of VEGF. *Leukemia* 2004; 18:926-933.
48. Semenza GL. Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer Cell* 2004; 5:405-406.
49. Warren BA. Tumor Blood Circulation: Angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental and human tumors. 1-48 ed. Peterson, H. I. 1979, CRC Press, Boca Raton, USA.
50. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
51. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS* 2005; 94:209-231.
52. Hueyonq L, Shaozonq C, Wanqzhou L, Yuejun L, Xiaoxinq L, Jinq L, Yanli W, Jinqinq L. Differentiation of the pericyte in wound healing: the precursor, the process, and the role of the vascular endothelial cell. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 346-355.
53. North S, Moenner M, Bikfalvi A. Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer Lett* 2005; 218:1-14.
54. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16:4604-4613.
55. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86:353-364.
56. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanism of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 49:507-521.
57. Underiner TL, Ruggeri B, Gingrich DE. Development of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) kinase inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy *Curr Med Chem* 2004; 11:731-745.
58. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005; 69 (Suppl 3):4-10.
59. Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control* 2002; 9:36-44.
60. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146:1029-1039.
61. Kalas W, Yu JL, Milsom C. Oncogenes and angiogenesis: down-regulation of thrombospondin-1 in normal fibroblast exposed to factors from cancer cells har-

- boring mutant ras. *Cancer Res* 2005; 65: 8878-8886.
62. **Bikfalvi A, Bicknell R.** Recent advances in angiogenesis, antiangiogenesis and vascular targeting. *Trends Pharmacol* 2002; 23:576-582.
63. **Hirakawa S, Hong YK, Harvey N.** Identification vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol* 2003; 162:575-586.
64. **Wissmann C, Detmar M.** Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6865-6868.
65. **Da MX, Wu Z, Tian HW.** Tumor lymphangiogenesis and lymphangiogenic growth factors. *Arch Med Res* 2008; 39:365-372.
66. **Chang LK, García-Cardena G, Farnebo F.** Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:11658-11663.
67. **Roberts N, Kloos B, Cassella M, Podgrabska S, Persaud K, Wu Y, Pytowski B, Skobe M.** Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res* 2006; 66: 2650-2657.
68. **Stupack DG.** The Biology of integrins. *Oncology* 2007; 9(Suppl 3):6-12.
69. **Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA.** Integrins in Angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:604-617.
70. **Stupak DG, Cheresch DA.** Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2004; 64: 207-238.
71. **Handsley MM, Edwards DR.** Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2005; 115:849-860.
72. **Citak EC, Oquz A, Karadeniz C, Akyurek N.** Role gelatinases (MMP-2 and MMP-9), TIMP-1 vascular endothelial growth factor (VEGF), and microvessel density on the clinicopathological behavior of childhood non-Hodgkin Lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol* 2008; 25:55-66.
73. **Du R, Lu KV, Petritch C, Liu P, Gauss R, Passequé E, Song H, Vandenberg S, Jonson RS, Werb Z, Bergers G.** HIF1 alpha induces the requirement of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008; 13(3):206-220.
74. **Vidal O, Soriano-Izquierdo A, Pera M, Elizalde JI, Palacin A, Castells A, Piqué JM, Volant A, Metges JP.** Positive VEGF immunostaining independently predicts poor prognosis in curatively resected gastric cancer patients: results of a study assessing a panel of angiogenic markers. *J Gastrointest. Surg* 2008; 12:1005-1014.
75. **De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA.** *Cancer. Principles and Practice of Oncology.* 4^a ed. Lippincott Company, 1993. Philadelphia
76. **Arvelo F, Poupon MF.** Aspectos Moleculares y Celulares de la Metástasis Cancerosa. *Acta Cient Venez* 2001; 52:304-312.
77. **Langley RR, Fidler I.** Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev* 2007; 28:297-321.
78. **Xu Y.** Induction of genetic instability by gain of function p53 cancer mutants. *Oncogene* 2008; 27:3501-3507.
79. **Kerbel RS.** Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358:2039-2049.
80. **Sullivan R, Grahan CH.** Hypoxia-driven deletion of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26:319-331.
81. **Kim W, Kaelin W.** Role of VHL gene mutation in human cancer, *J Clin Oncol* 2004; 22:4991-5004.
82. **Chiang MJ, Sun KH, Tang SJ, Deng MW, Wu YH, Sung JS, Cha TL, Sun GH.** Tumor derived tumor necrosis factor- alpha promote progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 2008; 99:905-913.
83. **He Z, Liu S, Guo M, Mao J, Hughson MD.** Expression of fibronectin and HIF-1 alpha in renal cell carcinomas: relationship to von hippel-lindau gene activation. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 152:89-94.
84. **Pan J, Mestas J, Burdick MD, Phillips RJ, Thomas GV, Reckamp K, Belperio JA, Strieter RM** Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer* 2006; 5:56-63.

85. Miyazaki Y, Hara A, Kato K, Oyama T, Yamada Y, Mori H, Shibata T. The effect of hypoxic microenvironment on matrix metalloproteinase expression in xenografts of human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2008; 32:145-151.
86. Luo Y, He DL, Ning L, Shen SL, Li L, Li X, Zhan HE, Chug LW. Over-expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha increases the invasive potency of LNCaP cells in vitro. *BJU Int* 2006; 98:1315-1319.
87. Lester RD, Jo M, Montel V, Takimoto S, Gonias SL. uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cell. *J Cell Biol* 2007; 178:425-436.
88. Wang X, Li C, Chen Y, Hao Y, Zhou W, Chen C, Yu Z. Hypoxia enhances CXCR4 expression favoring microglia migration via HIF-1 alpha activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 37(12):283-288.
89. Kitayama Y, Ide T, Ohtsuka T, Miyazaki K. Induction of hepatocyte growth factor activator gene expression under hypoxia activates the hepatocyte growth factor/c-Met system via hypoxia factor-1 in pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2008; 99:1341-1347.
90. Naz C, Hill R. Hypoxia and Metastasis. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1947-1949.
91. Das S, Skobe M. Lymphatic vessel activation in cancer. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1131:235-241.
92. Subarsky P, Hill RP. The hypoxic tumor microenvironment and metastatic progression. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20:237-250.
93. Hemler ME. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:578-585.
94. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 619-627.
95. Perl K, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998; 392:190-193.
96. Pérez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 2001; 276:27424-27431.
97. Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis a look outside the nucleus. *Science* 2000; 287: 1606-1609.
98. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998; 392:190-193.
99. Birchmeier C, Birchmeier W, Brand-Saberi B. Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat* 1996; 156:217-226.
100. Giehl K, Menke A. Microenvironmental regulation of cadherin-mediated adherens junctions. *Front Biosci* 2008; 13:3975-3985.
101. Esteban MA, Tran MG, Harten SK, Hill P, Castellanos MC, Chandra A, Raval R, O'Brien TS, Maxwell PH. Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res* 2006; 66: 3567-3575.
102. Olmeda D, Moreno-Bueno G, Flores JM, Fabra A, Portillo F, Cano A. SNAI1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *Cancer Res* 2007; 67:11721-11731.
103. Batlle E, Sancho E, Franci C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García-Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2:84-89.
104. Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KS, Vega S, Nieto MA, Cano A, Portillo R. A molecular role for Lysyl oxidase-like 2 enzyme in Snail regulation and tumor progression. *The EMBO Journal* 2005; 24: 3446-3458.
105. Manalo D, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SO, Garcia JG, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF1. *Blood* 2005; 105:659-669.
106. Erler JT, Bennewith KL, Nicilau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006; 440:1222-1226.

107. **Shan B, Yao TP, Nguyen HT.** Requirement of HDAC6 for TGF-beta1 induced epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2008; 283:21065-21073.
108. **Choi J, Park SY, Joo CK.** Transforming growth factor-beta 1 represses E-cadherin production via slug expression in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:2708-2718.
109. **Jethwa P, Naqui M, Hardy RG.** Overexpression of Slug is associated with malignant progression of esophageal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1044-1052.
110. **Yanaq MH, Wu MZ.** Direct regulation of Twist by HIF-1 alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; 10:295-305.
111. **Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinber RA.** Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* 2008; 68: 3645-3654.
112. **Medema RH, Bos JL.** The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog* 1993; 4:615-661.
113. **Wu M, Wu ZF, Merajver SD.** Rho proteins and cell-matrix interactions in cancer. *Cells Tissues Organs* 2007; 185:100-103.
114. **Parise LV, Lee J, Juliano RL.** New aspects of integrin signaling in cancer. *Semin Cancer Biol* 2000; 10:407-414.