



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS - DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y
MEDICINA ORAL**

**ROL DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL HIF1 α EN LA VIABILIDAD Y
MIGRACIÓN DE QUERATINOCITOS DISPLÁSICOS ORALES**

Diego Andrés Betancur Caro

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTORES PRINCIPALES

**Dr. Vicente Torres Gómez
Dra. Montserrat Reyes Rojas**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1180495
Santiago – Chile
2021**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS - DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y
MEDICINA ORAL**

**ROL DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL HIF1 α EN LA VIABILIDAD Y
MIGRACIÓN DE QUERATINOCITOS DISPLÁSICOS ORALES**

Diego Andrés Betancur Caro

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTORES PRINCIPALES

**Dr. Vicente Torres Gómez
Dra. Montserrat Reyes Rojas**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1180495
Santiago – Chile
2021**

ÍNDICE

ÍNDICE	1
1) RESUMEN.....	3
2) MARCO TEÓRICO	4
2.1 CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS	4
2.2. DISPLASIA EPITELIAL ORAL.....	6
2.3 HIPOXIA Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER	7
2.4 HIPOXIA Y SU RELACIÓN CON EL COCE Y DEO	9
2.5 FACTORES INDUCIDOS POR HIPOXIA (HIFs)	10
2.6 HIF1 α Y SU ROL EN LESIONES MALIGNAS	12
2.7 HIF1 α Y SU ROL EN COCE Y DEO.....	13
2.8 RESUMEN DE ANTECEDENTES.....	16
3) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
3.1 HIPÓTESIS	17
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	17
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4) MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1 TIPO DE ESTUDIO	18
4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	18
4.3 MATERIALES	18
4.4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	19
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
5) RESULTADOS	23
5.1 LA HIPOXIA INDUCE LA ESTABILIZACIÓN DE HIF1 α EN CÉLULAS DOK.....	23
5.2 LA HIPOXIA DISMINUYE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DOK	23
5.3 LA HIPOXIA DISMINUYE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN DE CÉLULAS DOK	24
5.4 HIF1 α ES REQUERIDO PARA LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DOK.....	25
5.5 HIF1 α ES REQUERIDO PARA LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DOK.....	26
5.6 RESULTADOS ANEXOS	27
5.6.1 LA HIPOXIA AUMENTA LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN DE CÉLULAS OKF Y CAL27.....	27
6) DISCUSIÓN.....	29
7) CONCLUSIONES.....	38
8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

9) ANEXOS Y APÉNDICES.....	60
9.1 ANEXO 1.....	60
9.2 ANEXO 2.....	62
9.3 ANEXO 3.....	64

1) RESUMEN

Introducción: El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es comúnmente precedido por alteraciones tisulares y celulares acotadas al epitelio, denominado displasia epitelial oral (DEO), y cuyo conocimiento es aún limitado. En COCE, existen zonas que experimentan una disminución en la disponibilidad de O₂, condición conocida como hipoxia, y que también se ha reportado en DEO. Las células se adaptan a la hipoxia a través de distintos mecanismos, muchos de los cuales involucran a los factores inducidos por hipoxia (HIFs), los cuales son factores de transcripción heterodiméricos, compuestos por una subunidad α y una β , y que promueven la expresión de genes de adaptación frente a la hipoxia e involucrados en la mantención del metabolismo, viabilidad, angiogénesis, migración e invasión celular. Particularmente, los estudios se han centrado en la subunidad HIF1 α , la cual se estabiliza en hipoxia y se degrada en presencia de O₂. De esta forma, una alta expresión de HIF1 α en COCE se asocia a mal pronóstico y menor supervivencia. Interesantemente, se ha reportado la expresión de HIF1 α en muestras de DEO, y que además existe un aumento progresivo de esta expresión desde mucosa oral sana a DEO y COCE; sin embargo, no se ha reportado el rol de HIF1 α en células de DEO a través de modelos *in vitro*.

Objetivo: Determinar la viabilidad y migración de queratinocitos orales displásicos en hipoxia mediante la estabilización de HIF1 α .

Materiales y métodos: Se utilizaron células de displasia oral (DOK) cultivadas en normoxia e hipoxia durante 24 horas. Se obtuvieron extractos de proteína total y se determinó la estabilización de HIF1 α mediante Western Blot. Para evaluar viabilidad y migración se realizaron ensayos de MTS, exclusión de Azul de Tripán y Transwell. Además, se evaluó el requerimiento de HIF1 α utilizando un inhibidor de HIF1 α .

Resultados: Se observó un aumento en la estabilización de HIF1 α y una disminución en la viabilidad y migración al cultivar las células DOK en hipoxia. Por otro lado, el tratamiento con el inhibidor acentuó esta disminución en ambos procesos celulares.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que HIF1 α es requerido en estos procesos en las etapas iniciales de la carcinogénesis oral.

2) MARCO TEÓRICO

2.1 CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

La cavidad oral está cubierta por epitelio escamoso estratificado compuesto principalmente por queratinocitos orales (Nanci, 2018) y es relativamente resistente a lesiones, pero frente a la exposición a carcinogénicos y/o promotores tumorales, se pueden producir cambios en él, pudiendo generar lesiones malignas (Neville y Day, 2002).

El cáncer oral es un subtipo de cáncer de cabeza y cuello que puede surgir como una lesión de origen primario en los tejidos orales que recubren la boca, labios, encías y la lengua (Huang Liu y cols., 2014). Los tipos de cáncer que se presentan en la boca incluyen neoplasias malignas tales como osteosarcomas de los huesos maxilares, linfomas, adenocarcinomas de glándulas salivales, carcinomas de mucosa oral, entre otros, sin embargo alrededor del 90% se originan en el epitelio estratificado no queratinizado de la mucosa, por lo que son denominados Carcinomas Orales de Células Escamosas (COCE), (Dost y cols., 2014; Watanabe y cols., 2015) y representan la sexta neoplasia maligna más común en los países desarrollados (Huang Liu y cols., 2014). En general se acepta que el tabaco y el consumo de alcohol son los principales factores de riesgo para el desarrollo del COCE, sin embargo, algunos pacientes desarrollan COCE sin la exposición a estos factores de riesgo, lo cual sugiere que causas adicionales, como la predisposición genética, la dieta o presencia de virus oncogénicos, podrían ayudar a las células a escapar de los mecanismos de control de la proliferación (Xi y cols., 2009). En cuanto a sus tasas de mortalidad, sólo entre el 40-50 % de los pacientes sobreviven a los 5 años (Fronie y cols., 2013), sin embargo, el pronóstico mejora frente a un diagnóstico precoz al ser tratado antes de la infiltración de nodos linfáticos (Sciubba, 2001; Van der Waal, 2009). Se ha propuesto que la naturaleza invasiva y metastásica de COCE es una consecuencia de su adaptación al microambiente hipóxico que se genera en su estructura debido a su acelerada proliferación y función vascular anormal (Eckert y cols., 2011).

EL COCE es frecuentemente precedido por lesiones cuyo diagnóstico histopatológico es de displasia epitelial oral (DEO), la cual corresponde a

alteraciones celulares y tisulares en el epitelio oral, que revelan una modificación en la maduración celular del epitelio y un aumento de la actividad proliferativa (Van der Waal, 2009; El-Naggar y cols., 2017). Por lo tanto, el COCE requiere de una progresión a través de etapas potencialmente malignas, previo a la invasión real; iniciando con la DEO, continuando en el carcinoma in situ (CIS) y culminando en COCE (Watanabe y cols., 2015) (Figura 1).

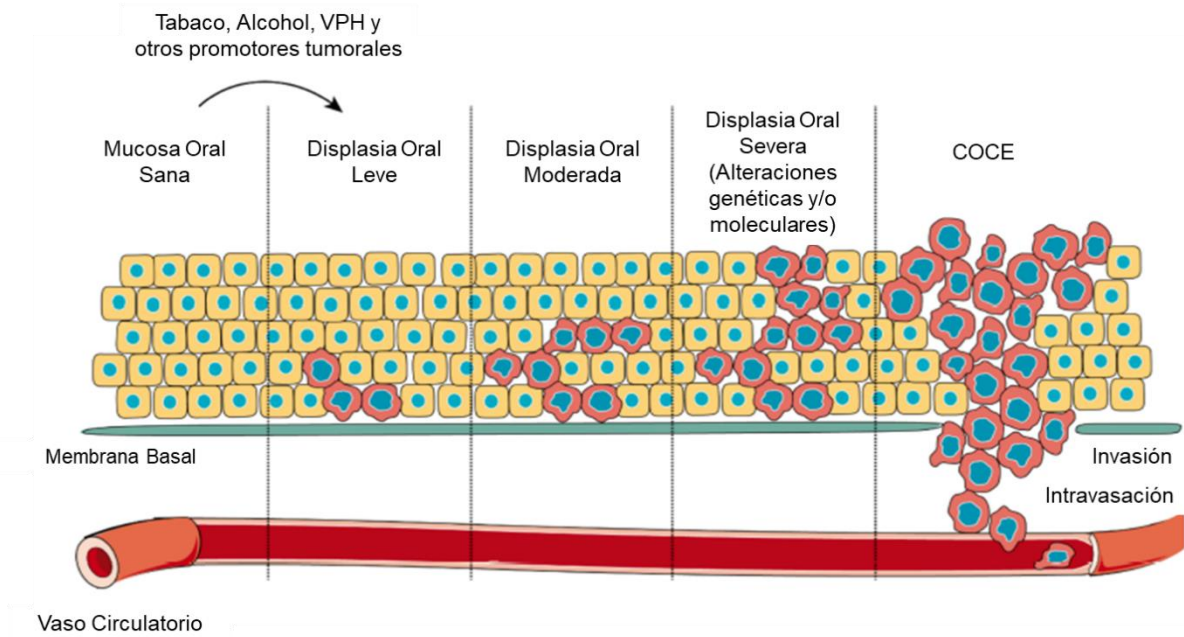


Figura 1. Modelo de Carcinogénesis Oral (adaptado de Reyes y cols., 2020). La mucosa oral sana es una capa estratificada de células epiteliales dispuestas sobre una membrana basal que separa las células epiteliales del tejido conectivo y los vasos sanguíneos. Cuando la mucosa oral se enfrenta a factores de riesgo tumorales, como el tabaco, el alcohol, el virus papiloma humano (VPH) u otros, las células de las capas más profundas sufren alteraciones morfológicas en forma y tamaño. Este nuevo estado representa una respuesta de adaptación frente a una estimulación dañina, que se conoce como displasia oral. La displasia oral puede clasificarse en leve, moderada o severa, según la extensión de la lesión y la presencia de marcadores moleculares inducidos como resultado de la expresión genética alterada. La displasia oral se considera la etapa previa del carcinoma oral de células escamosas (COCE) y el predictor más fuerte de transformación maligna en cáncer. Durante el COCE, cambios fenotípicos masivos afectan a todas las capas epiteliales y se extiende sobre el borde del tejido, con rupturas de la membrana basal, en un proceso que permite la invasión del tejido conectivo y su incorporación a los vasos sanguíneos (intravasación).

2.2. DISPLASIA EPITELIAL ORAL

La DEO es considerada como un término de diagnóstico histopatológico (Watanabe y cols., 2015) y se puede presentar en desórdenes potencialmente malignos, siendo la leucoplasia y la eritroplasia las lesiones más comúnmente asociadas a displasia (Speight, 2007; Watanabe y cols., 2015). El análisis histopatológico de las biopsias de estos desórdenes potencialmente malignos es el “Gold standard” para el diagnóstico de displasia (Speight, 2007; Aguirre y Aguirre, 2008).

En el año 2005 la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó histológicamente la displasia oral según su grado de diferenciación en **leve**, **moderada** y **severa**, y las características de cada una están íntimamente ligadas a los cambios en la arquitectura epitelial y presencia de atipias celulares, las cuales van aumentando en las capas del epitelio, a medida que la displasia va progresando (El-Naggar y cols., 2017). Es así como, en la DEO **leve** se observan cambios citológicos y arquitectónicos acotados al tercio inferior del epitelio, en DEO **moderada** al tercio medio y en DEO **severa** al tercio superior (Speight, 2007). El grado de displasia es la mejor guía para estimar la potencial progresión de las lesiones orales, aumentando el riesgo de transformación maligna a medida que aumenta el grado de DEO. Por lo tanto, el diagnóstico de DEO está asociado con una mayor tasa de desarrollo de cáncer invasivo, la cual varía considerablemente según distintos estudios, con una fluctuación que va desde el 2% al 36%, siendo estas diferencias debidas en parte, al tiempo de seguimiento de las lesiones (Dost y cols., 2014; van der Waal, 2014; Martínez y cols., 2016).

Se han realizado múltiples intentos para diagnosticar y categorizar de manera uniforme la escala continua de cambios en los tejidos asociados a DEO (Dost y cols., 2014). De esta forma, se han propuesto distintos marcadores específicos para identificar y clasificar estas DEO (Zhang y cols., 2013; Fang y cols., 2015), pero debido al limitado conocimiento de las alteraciones moleculares y la evolución desde las etapas más tempranas hasta las más avanzadas, el diagnóstico histopatológico de las DEO aún es complejo y subjetivo (Reyes y cols., 2019).

La comprensión de la biología de estos desórdenes potencialmente malignos con diagnóstico histopatológico de DEO, y en especial su relación con la adaptación a microambientes hipóxicos, podría servir para enfrentar su tratamiento de mejor manera y permitiría mejorar la tasa de supervivencia debido al diagnóstico y manejo en el estado “pre-canceroso” (Dost y cols., 2014; Watanabe y cols., 2015). Por lo tanto, la DEO es una lesión potencialmente maligna que debiera ser tratada como si progresara a carcinoma oral (Watanabe y cols., 2015; El-Naggar y cols., 2017).

2.3 HIPOXIA Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER

El oxígeno molecular (O_2) es requerido en el metabolismo aeróbico para mantener la bioenergética intracelular y tiene un papel fundamental como captador de electrones en múltiples reacciones orgánicas e inorgánicas (Pereira y cols., 2013). El aire ambiental tiene una composición de 21% de O_2 (150 mm Hg), 78% de N_2 y <1% de CO_2 y la mayoría de los tejidos de los mamíferos presentan una disponibilidad entre 2%-9% de O_2 (en promedio a 40 mm Hg) (Jing y cols., 2019). Por lo tanto, la condición de hipoxia es definida usualmente como cualquier situación en donde haya disponibilidad de $\leq 2\%$ de O_2 , mientras que la hipoxia severa o anoxia se define como $\leq 0,02\%$ de O_2 (Bertout y cols., 2008).

La capacidad de las células cancerosas para adaptarse a condiciones adversas del microambiente tumoral, como la privación de nutrientes o la hipoxia, es esencial para la supervivencia del tumor (Eckert y cols., 2011), siendo uno de los principales mecanismos que permiten la adaptación a hipoxia, aquellos mediados por los factores inducidos por hipoxia (HIFs) (Bertout y cols., 2008; Pereira y cols., 2013). Dentro de los tumores sólidos existen regiones que experimentan privación leve a severa de O_2 debido a su proliferación acelerada, además de una función vascular anormal (Pereira y cols., 2013; Walsh y cols., 2014). Estudios histopatológicos sugieren que las células tumorales están expuestas a una gradiente de O_2 que disminuye gradualmente a partir de una oxigenación eficiente, cerca del estroma peritumoral, hasta cercano a la anoxia en las zonas que bordean las regiones necróticas en el centro del tumor (Bache y cols., 2008; Simon y cols., 2008) (Figura 2). Este estrés hipóxico induce la expresión de un conjunto de genes que regulan la homeostasis del suministro de

oxígeno (Feron, 2009; Ayala y cols., 2010). Dentro de los carcinomas de cabeza y cuello se ha reportado una disminución en la disponibilidad de O_2 a menor diferenciación histopatológica (Li y cols., 2012). **Sin embargo, el efecto de la hipoxia en el inicio y progresión del COCE no ha sido completamente estudiado.**

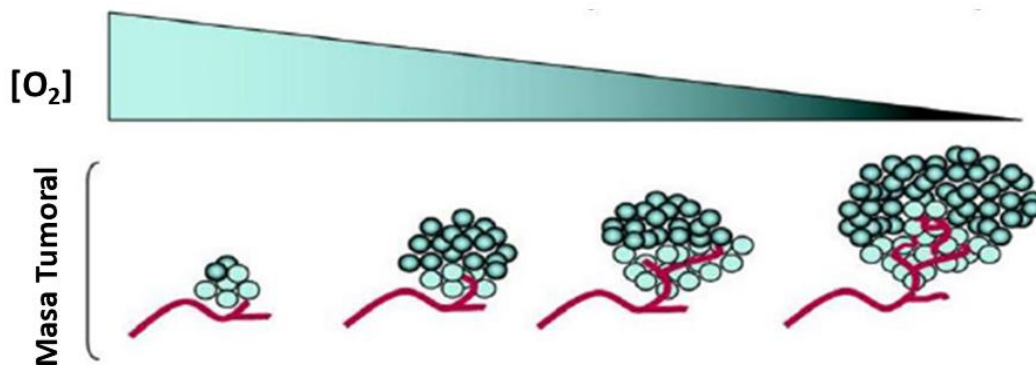


Figura 2. Concentración de O_2 en tumores sólidos (adaptado de Rivas, 2018). A medida que aumenta el tamaño de la masa tumoral, la concentración de oxígeno molecular disminuye, afectando principalmente a las células tumorales más lejanas a la fuente de irrigación.

Durante la mayor parte del siglo XX, la investigación sobre hipoxia se centró en la respuesta que existe frente al tratamiento del cáncer (Bertout y cols., 2008). Las regiones hipóxicas están asociadas a un metabolismo celular alterado, como también a una resistencia aumentada a la radiación y a la quimioterapia (Moeller y cols., 2004; Jing y cols., 2019). La ineficiente oxigenación tumoral es un predictor de mal pronóstico en múltiples lesiones malignas y es independiente al tratamiento realizado (Chan y Giaccia, 2007). En pacientes con cáncer de cabeza y cuello en etapa IV tratados con radiación con o sin quimioterapia, se asoció una menor supervivencia cuando hay menor oxigenación en el tumor, confirmando la influencia del grado de oxigenación en el pronóstico de estos pacientes (Rudat y cols., 2001). Por lo tanto, la búsqueda de estrategias terapéuticas debe considerar el grado de hipoxia del tumor para obtener un mejor resultado frente a casos de cáncer de cabeza y cuello (Walsh y cols., 2014).

2.4 HIPOXIA Y SU RELACIÓN CON EL COCE Y DEO

El tabaco es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de cáncer oral (Dissanayaka y cols., 2012), donde este riesgo aumenta entre 3 a 5 veces en pacientes fumadores (Gandini y cols., 2008). Estudios han relacionado a más del 50% de los casos de desórdenes potencialmente malignos con el consumo de tabaco (Bokor-Bratić, 2003). El humo del tabaco contiene químicos carcinogénicos, que son metabolizados por enzimas oxidativas llegando a formar especies reactivas de oxígeno, que se unen al ADN y causan posteriores mutaciones en él (Parise, 2000; Choudhari y cols., 2013). Por otra parte, el humo del tabaco causa vasoconstricción periodontal aguda de la encía e inhibe la angiogénesis, debido a la nicotina (Scott y Singer, 2004). Se ha observado que pacientes fumadores exhiben menor disponibilidad de O₂ en la mucosa oral en comparación a no fumadores (Hanioka y cols., 2000), lo que podría deberse a que repetidas respuestas vasoconstrictivas pequeñas debido al humo del tabaco podrían contribuir a una disfunción vascular gingival (Mavropoulos y cols., 2003).

Por otra parte, se evaluó la absorción de hemoglobina oxigenada mediante reflectancia difusa en distintas muestras de mucosa oral sana (MOS), DEO y COCE (Mallia y cols., 2008). La absorción fue más prominente en voluntarios sanos, y estas absorciones se volvieron menos pronunciadas en DEO y mínimas en COCE, lo que sugiere una disminución en la disponibilidad de O₂ a medida que esta patología progresa (Danielson, 1996; Mallia y cols., 2008). Por otro lado, se ha reportado que en DEO y COCE existe un cambio en la expresión de transportadores de glucosa de transmembrana (GLUT), situación que sugiere un cambio en el metabolismo dependiente de O₂ (Zhang y cols., 2013; Angadi y Angadi, 2015). Los GLUT, son proteínas de membrana que facilitan el transporte de glucosa dentro de las células, ayudando a regular el metabolismo celular, especialmente en tejidos donde el suministro de energía es inadecuado (Carvalho y cols; 2011). Mientras que en MOS no se ha reportado la expresión de GLUT-3 y GLUT-4, ésta sí ha sido detectada en muestras de DEO (Feitosa y cols., 2018); además, existe un aumento en la expresión de GLUT-1 en muestras de DEO en comparación a MOS (Angadi y Angadi, 2015; Pereira y cols., 2016), lo que sugiere un cambio en el método de obtención de energía por

parte de las células desde fosforilación oxidativa a glicólisis, debido a la menor disponibilidad de O₂ (Zhang y cols., 2013; Angadi y Angadi, 2015). Por último, se ha observado que la enzima anhidrasa carbónica IX (CA-IX), la cual es responsable de mantener el equilibrio ácido-base en el citoplasma, especialmente ante la acidosis metabólica presente en la hipoxia (Zhang y cols., 2017), está sobre-expresada en muestras de DEO, en comparación a MOS (Pérez-Sayáns y cols., 2014; Pérez-Sayáns y cols., 2015). Si bien, no se han realizado estudios *in vivo* que evalúen los niveles de O₂ disponibles en DEO; estos distintos marcadores de hipoxia nos permiten inferir que existe un menor grado de disponibilidad de oxígeno en DEO.

Por lo tanto, **comprender los mecanismos moleculares asociados al inicio y progresión del cáncer oral, sobre todo aquellos vinculados a la hipoxia tumoral y su adaptación a través de HIFs, puede facilitar la identificación de nuevos marcadores predictivos y de pronóstico**, además de nuevos objetivos terapéuticos para el tratamiento del cáncer oral (Eckert y cols., 2012).

2.5 FACTORES INDUCIDOS POR HIPOXIA (HIFs)

Los factores inducidos por hipoxia (HIFs) son factores de transcripción heterodiméricos, conformados por una subunidad α y una subunidad β (Wang y cols., 1995). Al dimerizar estas subunidades, se unen a elementos de respuesta a hipoxia (HRE) ubicados en el promotor de múltiples genes blanco que generan una respuesta frente a la hipoxia (Semenza, 2010) (Figura 3). A pesar de que los HIFs son mediadores cruciales en la respuesta frente a la hipoxia, se han descrito vías independientes de HIF que responden a cambios en la disponibilidad de O₂ (Bertout y cols., 2008). En mamíferos existen tres genes descritos que codifican variantes de la subunidad α y son regulados de manera similar por la disponibilidad de O₂. HIF1 α y HIF2 α son los más descritos en la literatura (Simon y Keith, 2008), siendo HIF1 α de expresión ubicua, mientras que HIF2 α y HIF3 α se encuentran en tejidos específicos (Gu y cols., 1998; Wiesener y cols., 2003). En condiciones de hipoxia, HIF1 α incrementa sus niveles por estabilización (ver más adelante), dimerizando con la subunidad HIF1 β , situación

que lleva a su unión a HRE de genes diana (Griffiths y cols., 2007), promoviendo la activación de la transcripción de éstos (Bertout y cols., 2008) (Figura 3).

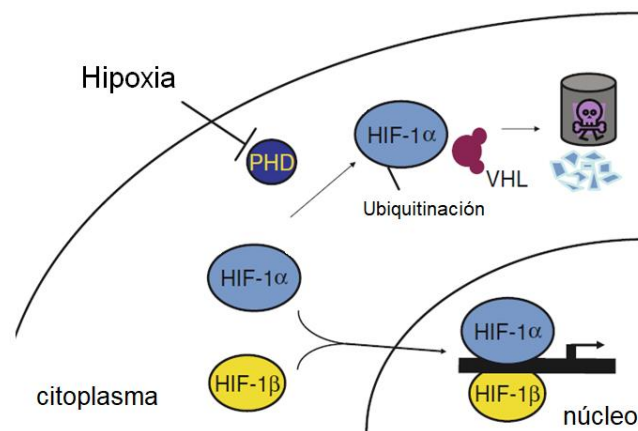


Figura 3. Estabilización de HIF1 α por hipoxia (adaptado de Chan y Giaccia, 2007). En condiciones normóxicas, la subunidad α es hidroxilada por prolil hidroxilasas (PHD). Esto permite la interacción con la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL), que dirige a HIF1 α al proteosoma para su degradación. Por otro lado, la función de las PHD es oxígeno-dependiente y es inhibida en hipoxia, lo que conduce a la estabilización de HIF1 α y a su unión con la subunidad β . El dímero conformado por HIF1 α y HIF1 β ingresa al núcleo, uniéndose a elementos de respuesta a hipoxia de genes blanco para activar la transcripción de ellos y producir una respuesta frente a la hipoxia.

La actividad de HIF1 α y su unión al ADN son rápidamente inducidas en hipoxia (1% O₂), y decaen de igual forma frente a la re-oxigenación de las células a niveles ambientales de O₂ (21%) (Jiang y cols., 1996). Así, se ha demostrado que la estabilidad de la subunidad α es regulada por medio de una región de 200 aminoácidos llamado dominio de degradación oxígeno-dependiente (ODD) (Huang y cols., 1998). En células expuestas a O₂, HIF1 α es hidroxilada, ubiquitinada y posteriormente degradada por el proteosoma 26S (Kaelin y Ratcliffe, 2008), mientras que, en hipoxia, esta degradación es bloqueada debido a la inhibición de las enzimas prolil hidroxilasas (PDH) sensibles a O₂ (Sutter y cols., 2000), situación que lleva a la estabilización de HIF1 α e incremento en sus niveles (Semenza, 2012) (Figura 3). De esta forma, la estabilización de HIF1 α tiene como consecuencia la expresión de genes asociados a la proliferación y supervivencia celular (Gunaratnam, 2003), cambios metabólicos (Semenza, 2011) y la activación de vías que promueven la migración e invasión celular (Erler

y cols., 2006; Krishnamachary 2006; Chan y Giaccia, 2007; Zhang y cols., 2012). Por su parte, HIF1 β es expresado constitutivamente y no es dependiente de los niveles de O₂ (Bertout y cols., 2008).

2.6 HIF1 α Y SU ROL EN LESIONES MALIGNAS

En numerosos estudios se ha reportado la sobre-expresión de HIF1 α en una amplia gama de tumores malignos humanos (Bertout y cols., 2008). La acumulación de esta proteína se ha asociado a una menor supervivencia de los pacientes de cáncer cervical (Birner y cols., 2000), de mamas (Schindl y cols., 2002), oligodendroglioma (Birner y cols., 2001 a), cáncer de ovario (Birner y cols., 2001 b), endometrio (Sivridis y cols., 2002) y carcinoma de células escamosas orofaríngeo (Aebbersold y cols., 2001). Por otra parte, se ha descrito que HIF1 α activa la vía de señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) / receptor de factor de crecimiento epidermal (EGF-R) en células de carcinoma renal sometidas a hipoxia (Gunaratnam, 2003), además de disminuir la expresión de E-cadherina, produciendo la pérdida de uniones célula-célula e incrementando su potencial migratorio e invasivo (Zhang y cols., 2012). Además, se ha descrito que la activación de HIF1 α aumenta la secreción de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR) en carcinogénesis prostática y de mamas (Bos y cols., 2005; Berger y cols., 2003; Kimbro y Simons, 2006).

La proteína supresora de tumores von Hippel–Lindau (vHL) cumple la función de reconocimiento de un complejo multi-proteico que se dirige a HIF1 α para la poliubiquitinación y su posterior degradación (Zhang y cols., 2014) (Figura 3). Este proceso se ve inhibido en células en ambientes hipóxicos, lo que conlleva a la estabilización de HIF1 α , su translocación al núcleo y expresión de sus genes blanco (Bertout y cols., 2008). Estudios previos demostraron que células de carcinoma renal con ausencia de vHL expresan constitutivamente HIF1 α y HIF2 α , así como también muchos genes blanco de HIF (Maxwell y cols., 1999); mientras que en ensayos de inmunohistoquímica en donde se evaluó la

expresión de esta proteína en biopsias de COCE, hubo casos en donde hubo una nula expresión de vHL (Zhang y cols., 2014).

Estudios de nuestro laboratorio han evaluado el rol de HIF1 α en la migración e invasión en células de melanoma murino y adenocarcinoma de colon humano concluyendo que HIF1 α induce la expresión de moléculas promigratorias, como Caveolina-1 (CAV-1) (Castillo-Bennett y cols., 2018), y que, por otro lado, estimula la actividad de GTPasas claves en la migración celular, como RAC1 y Rab5 (Silva y cols., 2016). Además, en células de cáncer de mama y de cabeza y cuello, HIF1 α inducido por hipoxia genera un incremento en la expresión de distintas metaloproteinasas de la matriz (MMP) y lisil oxidasas (LOX), proteínas que degradan y remodelan la matriz extracelular respectivamente, lo que promueve la migración e invasión celular (Erler y cols., 2006). **Por lo tanto, los estudios realizados en diversos modelos celulares de cáncer han llevado a la propuesta de que HIF1 α es un factor directamente asociado con el potencial migratorio e invasivo en células tumorales. Si esta relación se presenta ya en lesiones tempranas, aún se desconoce.**

2.7 HIF1 α Y SU ROL EN COCE Y DEO

Se ha postulado que una alta expresión de HIF1 α en COCE sería un marcador pronóstico de una peor respuesta a radioterapia y de menor supervivencia (dos Santos y cols., 2012; Li y cols., 2012; Zhou y cols., 2017; Han y cols., 2020). Además, se han descrito polimorfismos genéticos de HIF1 α que serían un factor para la susceptibilidad de desarrollo y metástasis de cáncer oral (Chen y cols., 2009).

En células de COCE con alto grado de invasividad *in-vitro*, se presentó una expresión aumentada de HIF1 α en normoxia y menor grado de degradación cuando eran cultivadas en ambiente hipóxico y luego re-oxigenadas, en comparación a células de COCE menos invasivas (Cohen y cols., 2004). Además, mediante ensayos *in vitro*, en células de COCE de lengua expuestas a hipoxia y tratadas con un inhibidor de la expresión de HIF1 α , se produjo una inhibición de la proliferación celular y se indujo la apoptosis de éstas (Zhang y

cols., 2004). En otra línea celular de COCE, se documentó que el tratamiento con metformina disminuye la expresión de HIF1 α , situación que se debe al aumento en la expresión de PDH y que viene acompañada de una inhibición en la proliferación celular y aumento en el número de células apoptóticas (Guimarães y cols., 2016), lo que sugiere el importante rol de HIF1 α en la mantención de la viabilidad de estas células (Brennan y cols., 2005). Por otro lado, estudios de inmunohistoquímica en muestras de COCE mostraron que la expresión de HIF1 α se correlaciona con la del factor de crecimiento endotelial vascular C (VEGF-C) y el proceso de angiogénesis (Liang y cols., 2008).

La importancia de estos hallazgos recae en que múltiples estudios han descrito que ocurriría un cambio angiogénico en etapas pre-malignas de varios cánceres humanos y que esto se debería a la estabilización de HIF1 α , el cual aumenta la expresión de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Guo y cols., 2018), induciendo la formación de vasos sanguíneos irregulares (Katsuta y cols., 2005). Interesantemente, también se estudió la expresión de HIF1 α en muestras de COCE, DEO y MOS y se observó un aumento significativo desde MOS a DEO moderada y severa aumentando aún más en COCE (Lin y cols., 2008) (Figura 4). Por otro lado, en dos estudios independientes y similares al anterior, se evaluó la expresión de HIF1 α en biopsias de distintas etapas de COCE de humanos y ratones, en donde se describió que la tasa de expresión positiva de HIF1 α aumentó progresivamente desde mucosa oral sana hasta DEO y posteriormente COCE; sugiriendo que la expresión de HIF1 α es un evento temprano en la carcinogénesis oral (Guo y cols., 2018; Patel y cols., 2019). Debido a esto, surge la interrogante de conocer el rol que cumple HIF1 α en displasia oral y en su progresión a lesiones malignas.

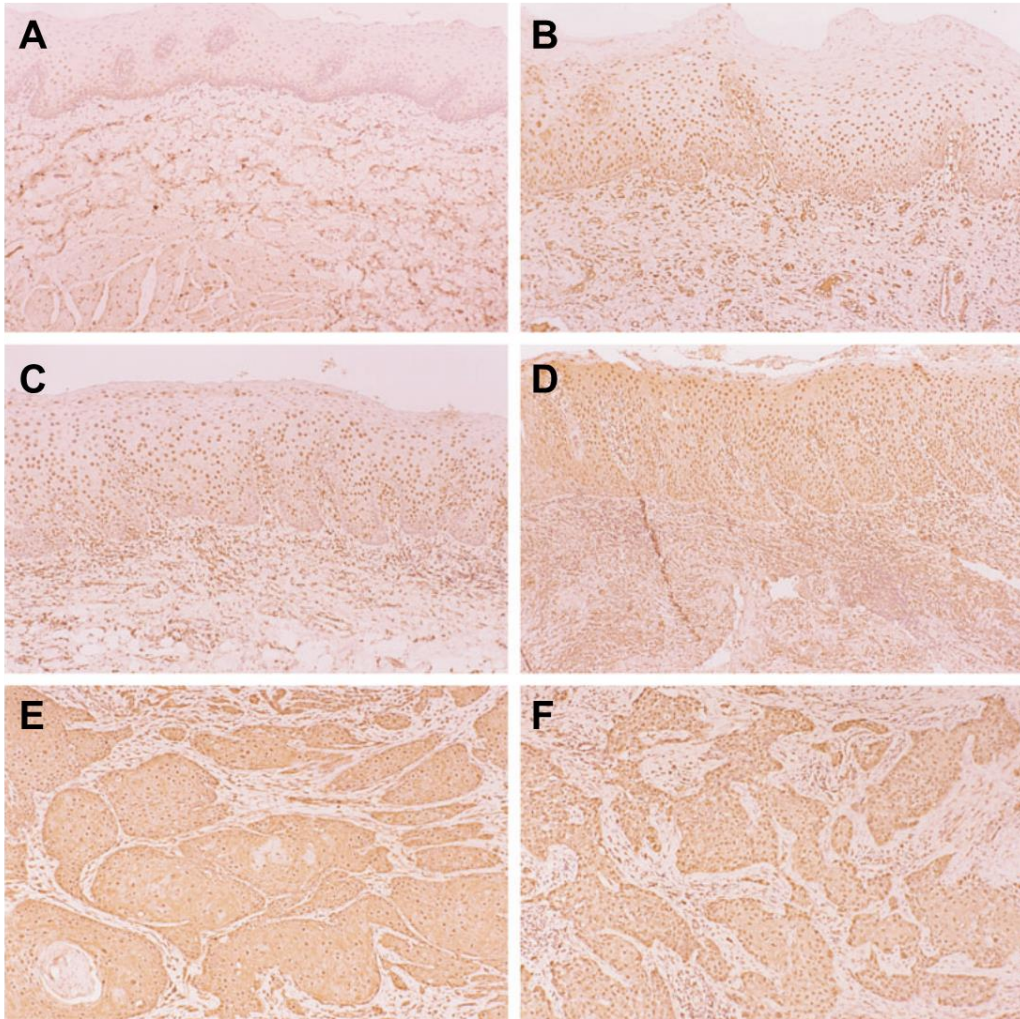


Figura 4. Inmunohistoquímica para HIF1 α en distintas etapas de la carcinogénesis oral (adaptado de Lin y cols., 2008). (A) Mucosa oral sana que muestra una tinción de HIF1 α nuclear débil en los dos tercios inferiores de las células epiteliales suprabasales pero no en las células basales. (B) Displasia epitelial oral leve que exhibe tinción nuclear moderada de HIF1 α en casi todas las células epiteliales exceptuando algunas células basales, parabasales y superficiales. (C) Displasia epitelial oral moderada que muestra una fuerte tinción de HIF1 α en casi todas las células epiteliales excepto en algunas células basales, parabasales y superficiales. Las células inflamatorias crónicas y las células endoteliales en la lámina propia también tienen una fuerte tinción nuclear de HIF1 α . (D) Displasia epitelial oral severa que muestra una fuerte tinción nuclear y citoplasmática de HIF1 α en casi todas las células epiteliales. Las células inflamatorias crónicas y las células endoteliales de la lámina propia también tienen una fuerte presencia nuclear de HIF1 α . (E) Carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado que exhibe tinción nuclear fuerte y citoplasmática moderada de HIF-1 α en todas las células cancerígenas. (F) Carcinoma bucal de células escamosas moderadamente diferenciado que muestra tinción nuclear fuerte y citoplasmática moderada de HIF1 α en todas las células cancerosas. Las células inflamatorias crónicas en el estroma también tienen una tinción nuclear moderada de HIF1 α .

2.8 RESUMEN DE ANTECEDENTES

- El carcinoma oral de células escamosas (COCE) generalmente es precedido por un estadio de alteraciones tisulares y celulares acotadas a la capa epitelial, denominada displasia epitelial oral (DEO).
- Tanto en COCE, como en DEO, se ha descrito la presencia de hipoxia o bajo suministro de O₂.
- Diversos tumores malignos, entre ellos COCE, presentan un incremento en la expresión del factor inducible por hipoxia, HIF1 α , el cual favorece la expresión de genes de respuesta frente a hipoxia y que está asociado a una menor sobrevida.
- Una alta expresión de HIF1 α en COCE es pronóstico de una peor respuesta a la radioterapia y menor sobrevida.
- Se ha reportado la expresión de HIF1 α en muestras de DEO y existe un aumento de esta expresión desde mucosa oral sana a DEO y aún más en COCE.
- Sin embargo, no se ha reportado el rol de HIF1 α en células de DEO a través de modelos *in vitro*.

3) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

La hipoxia promueve la viabilidad y migración de queratinocitos orales displásicos mediante la estabilización de HIF1 α .

3.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar la viabilidad y migración de queratinocitos orales displásicos en hipoxia mediante la estabilización de HIF1 α .

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar el efecto de normoxia e hipoxia en la expresión de HIF1 α en queratinocitos orales displásicos.
- b) Establecer el efecto *in-vitro* de la hipoxia en la viabilidad y migración de queratinocitos orales displásicos.
- c) Evaluar el requerimiento de HIF1 α en la viabilidad y migración de queratinocitos orales displásicos sometidos a hipoxia.

4) MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio experimental *in vitro*.

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cada objetivo específico, se planteó el siguiente diseño experimental:

Objetivo específico 1: Se determinó la estabilización de HIF1 α en condiciones de hipoxia. Queratinocitos orales displásicos (DOK, dysplastic oral keratinocytes) fueron cultivados en normoxia (condición control) o hipoxia (condición experimental) durante 24 h. Posteriormente, se evaluó la expresión de HIF1 α mediante Western Blot.

Objetivo específico 2: Para evaluar la viabilidad y migración en células DOK, se realizaron ensayos de exclusión de Azul de Tripán, MTS y Transwell. El grupo experimental fueron células incubadas en hipoxia (24 h), mientras que el grupo control fueron células incubadas en normoxia (24 h).

Objetivo específico 3: Para evaluar el requerimiento de HIF1 α se utilizó un inhibidor de HIF1 α . Se analizaron cuatro grupos de células DOK; 2 cultivados en hipoxia durante 24 h, uno en presencia del inhibidor y el otro en presencia del vehículo (condición control solvente). Los otros dos grupos fueron cultivados en normoxia de 24 h, uno en presencia del inhibidor y el otro del vehículo (condición control solvente). En estos cuatro grupos se evaluó viabilidad y migración mediante los ensayos ya descritos.

4.3 MATERIALES

a) *Líneas celulares:*

En base a los objetivos planteados es que se necesitó del siguiente tipo celular:

1. Queratinocitos orales displásicos (DOK): Se utilizó la línea celular de queratinocitos orales displásicos de Sigma–Aldrich (94122104), los cuales fueron aislados de un hombre de 57 años de edad, diagnosticado con COCE en el dorso de la lengua. La displasia remanente fue graduada entre leve y moderada, removida y usada para iniciar un cultivo primario que dio origen a DOK.

b) Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

1. Anticuerpo monoclonal de ratón anti-HIF1 α (#610958) de BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ).
2. Anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina (A5316) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).
3. Anticuerpo secundario policlonal de cabra, anti-ratón (#074-1806) acoplado a HRP de Laboratorios KPL (Washington, DC).

c) Medio de cultivo:

Se utilizó medio DMEM alto en glucosa, suplementado con penicilina (10,000 U/ml) y estreptomycinina (10 μ g/mL), 20% FBS, y 5 μ g/mL de hidrocortisona (células DOK 94122104).

d) Otros

1. Inhibidor de HIF1 α (#sc-205346) de Santa Cruz Biotechnology Laboratories (Santa Cruz, CA).

4.4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1. - *Cultivo celular*

Las células DOK fueron cultivadas en medio DMEM - alto en glucosa, suplementado con penicilina (10,000 U/mL) y estreptomycin (10 µg/mL), 20% FBS, y 5 µg/ml de hidrocortisona (células DOK 94122104); e incubadas a 37 °C y 5% CO₂ (Reyes y cols., 2019).

2.- Hipoxia

Las células DOK fueron cultivadas en una cámara modular de incubación (MIC-101 Billups-Rothenberg Inc., Del Mar, CA) sellada herméticamente por 24 h. Esta cámara es un modelo ampliamente usado para inducir condiciones hipóxicas *in vitro*. La cámara se llenó con una mezcla de gases certificada (1% O₂, 5% CO₂ y 94% N₂) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Linde Chile). La humedad fue asegurada en la cámara colocando una placa de Petri plástica con 10 mL de PBS. Todas las células expuestas a hipoxia fueron incubadas con medio expuesto a hipoxia por al menos 12 h antes de la incubación en la cámara (Silva y cols., 2016).

3.-Inhibición de HIF1α

Se utilizó el inhibidor farmacológico de HIF1α C₂₆H₂₉NO₅ (3 - [[2- [4- (2-adamantil) fenoxi] acetil] amino] -4-hidroxibenzoato de metilo) (#sc-205346) de Santa Cruz Biotechnology Laboratories. Se incubaron células DOK en normoxia e hipoxia por 24 h en presencia de vehículo DMSO (control) o el inhibidor de HIF1α (10 µM) (Rivas y cols., 2020).

4.- Western blot

Las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y homogenizadas en 0,2 mM de tampón HEPES (pH 7,4) que contiene 0,1% SDS, inhibidor de fosfatasa (1 mM Na₃VO₄), como también múltiples inhibidores de proteasas. Los extractos de proteínas totales (50 µg/pocillo) fueron separados por electroforesis en geles SDS de poliacrilamida y luego transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en Tween-PBS 0,1% y luego

se les aplicaron los anticuerpos primarios. Los anticuerpos primarios unidos se detectaron con anticuerpos secundarios anti-ratón y el sistema EZ-ECL (Castillo-Bennett y cols., 2018).

5.- Ensayo de migración

La migración fue evaluada en cámara Boyden (Transwell) cubierta de fibronectina (Transwell Costar, 6,5-mm de diámetro, tamaño de poro 8 μ m). Las células (100.000 células por condición) fueron re-suspendidas en 100 mL de medio libre de suero, y sembradas en la parte superior de los insertos Transwell lo que les permitió migrar hacia las cámaras inferiores que contienen medio suplementado con 10% de suero. Después de 2,5 h, los insertos fueron removidos, lavados y las células que migraron hacia el lado inferior de los insertos fueron teñidas con cristal violeta 0,1% en metanol al 2% y cuantificadas en microscopio invertido (Mendoza y cols., 2018).

6.- Ensayo de viabilidad

Ensayo MTS

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células por pocillo e incubadas por 24 h bajo normoxia e hipoxia en medio completo. La densidad óptica fue medida con el kit MTS®, midiendo la absorbancia a 490 nm, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI, US) (Silva y cols., 2016).

Ensayo de exclusión Azul Tripán

Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^5 células por pocillo bajo normoxia e hipoxia en medio completo. Luego, las células fueron recolectadas, re-suspendidas y teñidas con azul de tripán (células muertas permeables) para ser cuantificadas en microscopio (Silva y cols., 2016).

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis estadístico de al menos 3 experimentos independientes. Las pruebas para estimar diferencias estadísticas en las distintas condiciones fueron a través de un t test no pareado. Un valor $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

5) RESULTADOS

5.1 LA HIPOXIA INDUCE LA ESTABILIZACIÓN DE HIF1 α EN CÉLULAS DOK

Una vez cultivadas las células DOK en condiciones de normoxia e hipoxia por 24 h (Silva y cols., 2016; Reyes y cols., 2019) y obtenidos los extractos de proteínas totales (Castillo-Bennett y cols., 2018), se cuantificó la expresión de HIF1 α (Figura 5). En normoxia, se observó la presencia de una expresión basal de HIF1 α (Figura 5 A), mientras que en hipoxia hubo un aumento de casi 3 veces en los niveles proteicos, siendo ese incremento estadísticamente significativo (Figura 5 A, B).

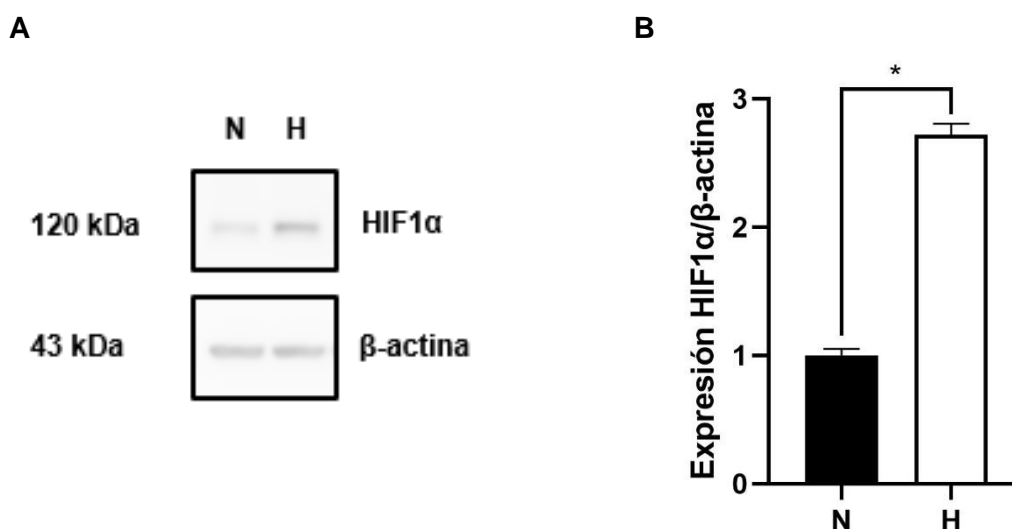


Figura 5. Cuantificación de la estabilización de HIF1 α en células DOK mediante Western blot. (A) Las células DOK fueron incubadas en normoxia (N, 21% O₂) o hipoxia (H, 1% O₂) por 24 h. Posteriormente, se obtuvo un extracto celular, y la expresión de HIF1 α fue evaluada mediante western blot. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. (B) La expresión de HIF1 α normalizada a los niveles de β -actina fue evaluada mediante densitometría. Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes (media \pm D.E.; * p <0.05).

5.2 LA HIPOXIA DISMINUYE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DOK

Una vez cultivadas las células DOK en condiciones de normoxia e hipoxia por 24 h (Silva y cols., 2016; Reyes y cols., 2019), se cuantificó la viabilidad celular a través de los ensayos de exclusión de Azul de Tripán (Figura 6 A y B) y MTS (Figura 6 C) (Silva y cols., 2016). Como se muestra en la Figura 6, se observó una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad de las células DOK frente a la condición de hipoxia.

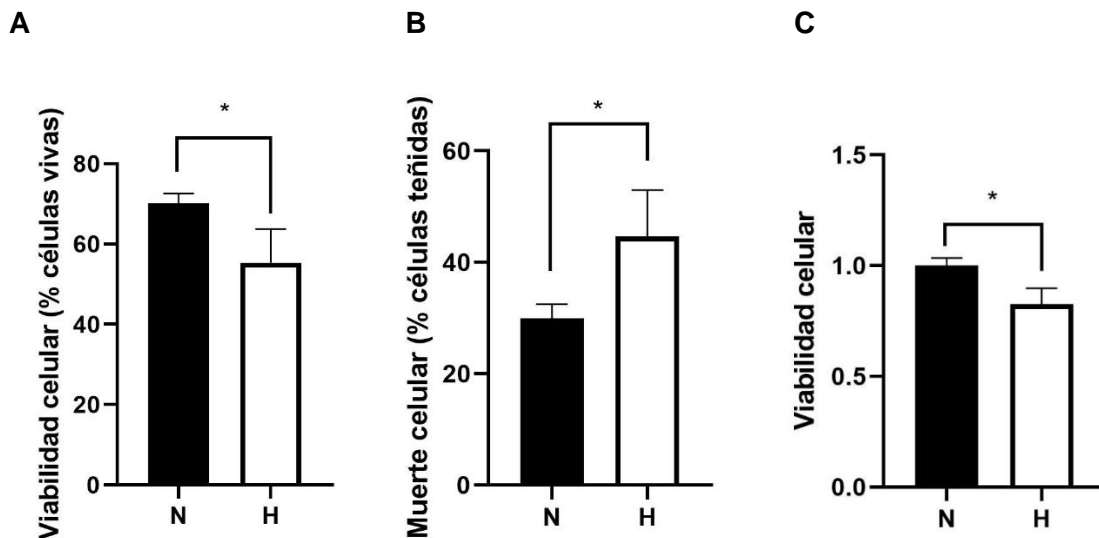


Figura 6. Cuantificación de la viabilidad celular de células DOK mediante ensayo de exclusión Azul de Tripán y MTS. (A) Luego de incubar en normoxia (N, 21% O₂) o hipoxia (H, 1% O₂) por 24 h, las células fueron teñidas con tinción Azul de Tripán para evaluar la viabilidad celular. Se cuantificó el número de células no teñidas y se obtuvo su porcentaje con respecto al número total de células (teñidas + no teñidas). (B) Se cuantificó el número de células teñidas (células muertas) y se obtuvo su porcentaje con respecto al número total de células (teñidas + no teñidas). En A y B, los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes (media ± D.E.; *p<0.05). (C) Luego de incubar en normoxia (N, 21% O₂) o hipoxia (H, 1% O₂) por 24 h, se agregó el reactivo MTS a las células, que luego de ser reducido, fue cuantificado a 490 nm de absorbancia. (Silva y cols., 2016). Se cuantificó la viabilidad normalizada a los valores obtenidos en normoxia. Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes (media ± D.E.; *p<0.05).

5.3 LA HIPOXIA DISMINUYE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN DE CÉLULAS DOK

Para determinar el efecto de la hipoxia en la migración de células DOK, cultivos celulares fueron expuestos a normoxia o hipoxia por 24 h, y posteriormente las células fueron re-suspendidas, contabilizadas respecto a su porcentaje de viabilidad, y depositadas en la parte superior de los insertos Transwell. Después de 2,5 h, las células que migraron hacia el lado inferior de los insertos fueron teñidas y cuantificadas (Mendoza y cols., 2018). Como se puede observar en la Figura 7, las células sometidas a hipoxia tuvieron una disminución estadísticamente significativa de la cantidad de células que migraron hacia el compartimiento inferior, en comparación a las células cultivadas bajo condiciones de normoxia.

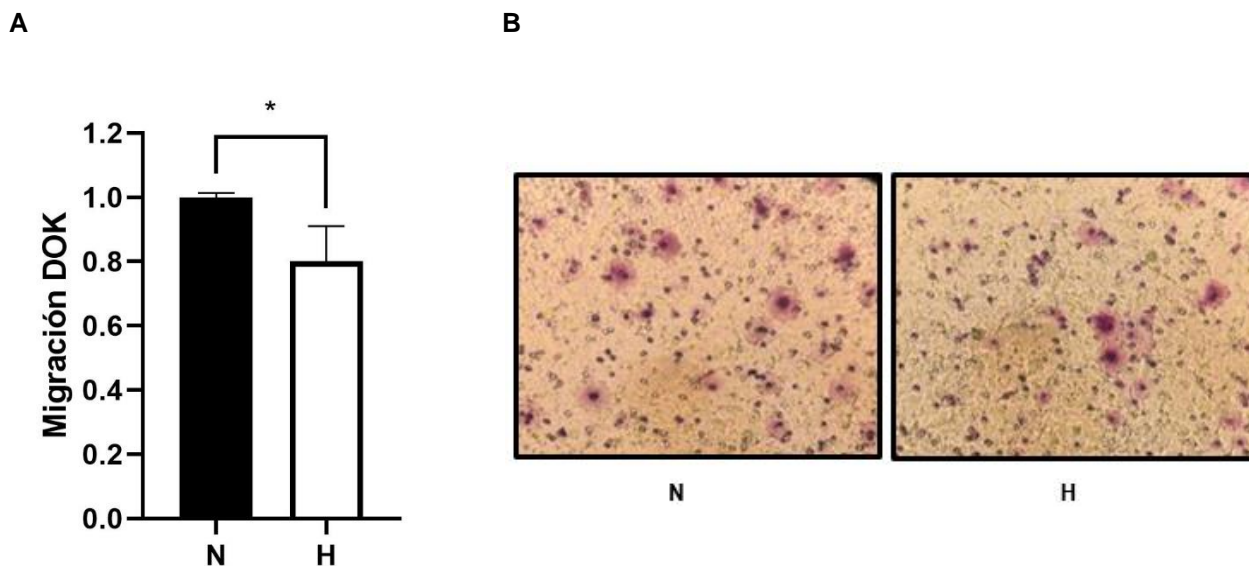


Figura 7. Cuantificación de la capacidad migratoria de células DOK mediante ensayo de Transwell. (A) Luego de incubar en normoxia (N, 21% O₂) o hipoxia (H, 1% O₂) por 24 h, las células DOK fueron resuspendidas, contabilizadas y aquellas viables fueron sembradas en cámaras transwell recubiertas con fibronectina, para permitir su migración durante 150 minutos (2 horas y 30 minutos) en condiciones de normoxia. Las células que migraron al compartimiento inferior de la cámara fueron visualizadas mediante tinción con cristal violeta. Se cuantificó la migración normalizada a los valores obtenidos en normoxia. Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes (media \pm D.E.; * p <0.05). (B) Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

5.4 HIF1 α ES REQUERIDO PARA LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DOK

Para determinar el requerimiento de HIF1 α en la viabilidad de células DOK, éstas fueron cultivadas en 4 condiciones por 24 h, según se describe a continuación: normoxia + DMSO, normoxia + inhibidor (10 μ M), hipoxia + DMSO e hipoxia + inhibidor (10 μ M). Posteriormente, se cuantificó la viabilidad celular a través de los ensayos de exclusión de Azul de Tripán (Figura 8 A) y MTS (Figura 8 B), observándose una disminución en la viabilidad celular dependiente de HIF1 α según determinación por ensayo de Azul de Tripán, mientras que según el ensayo de MTS se observó una disminución similar en todos los grupos con respecto al control.

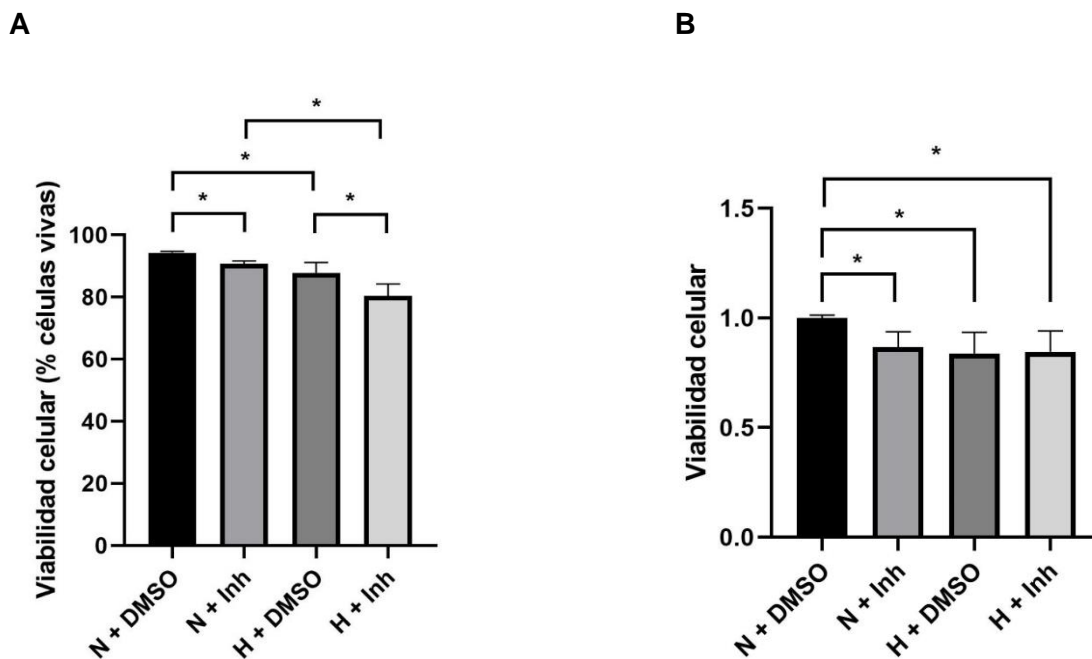


Figura 8. Cuantificación de la viabilidad celular de células DOK mediante ensayo de exclusión Azul Tripán y MTS. (A, B) Células DOK fueron incubadas en normoxia (N, 21% O₂) o hipoxia (H, 1% O₂), ya sea en presencia de DMSO (vehículo) o inhibidor, por 24 h. Posteriormente, las células fueron sometidas a análisis por tinción con Azul de Tripán (A) y MTS (B). En A, se cuantificó el número de células teñidas y se obtuvo su porcentaje con respecto al número total de células (teñidas + no teñidas). Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes (media ± D.E.; *p<0.05). En (B) se agregó sobre el cultivo celular el reactivo MTS, que luego de ser reducido fue cuantificado a 490 nm de absorbancia. La viabilidad celular fue normalizada a los valores obtenidos en normoxia + DMSO. Los datos mostrados son el promedio de 4 experimentos independientes (media ± D.E.; *p<0.05).

5.5 HIF1 α ES REQUERIDO PARA LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DOK

Para determinar el requerimiento de HIF1 α en la migración de células DOK, éstas fueron cultivadas en 4 condiciones por 24 h, según se describe a continuación: normoxia + DMSO, normoxia + inhibidor (10 μ M), hipoxia + DMSO e hipoxia + inhibidor (10 μ M). Posteriormente, las células fueron re-suspendidas, contabilizadas con respecto a su viabilidad y depositadas en la parte superior de los insertos Transwell. Después de 2,5 h, las células que migraron hacia el lado inferior de los insertos fueron teñidas y cuantificadas. Como se puede observar en la figura 9, en los grupos donde se agregó el inhibidor de HIF1 α existe una disminución de la capacidad migratoria de las células, tanto en la condición de normoxia, como en hipoxia.

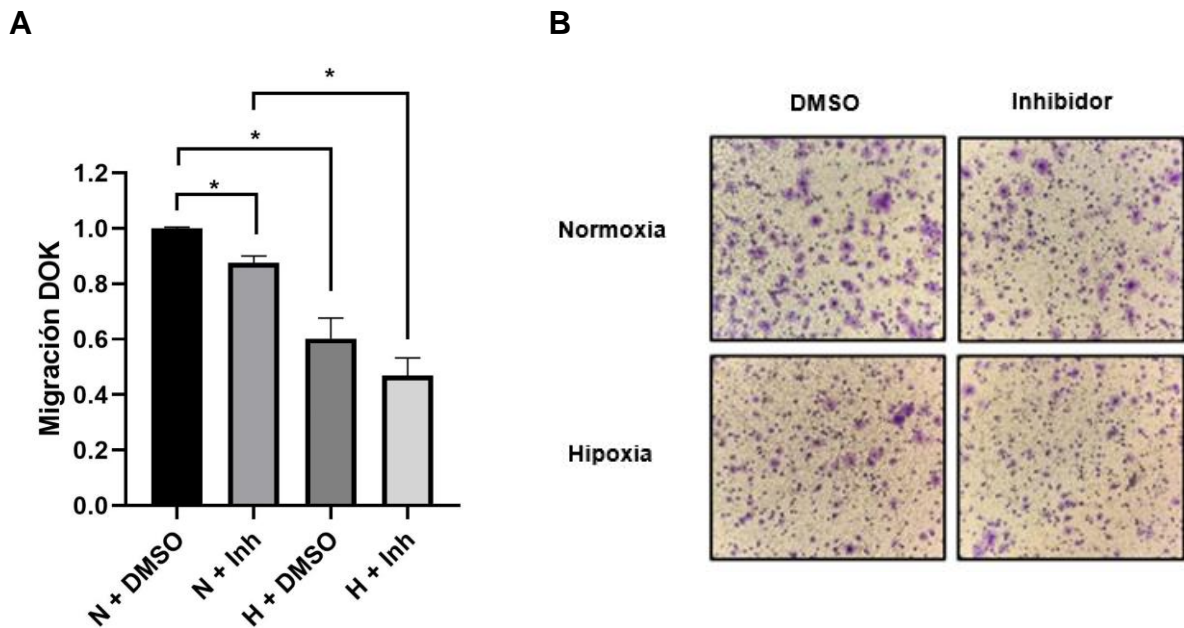


Figura 9. Cuantificación de la capacidad migratoria de células DOK mediante ensayo de Transwell. (A, B) Células DOK fueron incubadas en normoxia (N, 21% O₂) o hipoxia (H, 1% O₂), ya sea en presencia de DMSO (vehículo) o inhibidor, por 24 h. Posteriormente, las células fueron resuspendidas, contabilizadas con respecto a su viabilidad y sembradas al interior de los insertos de Transwell precubiertos con fibronectina, para permitir que migren durante 150 min (2 h y 30 min) en condiciones de normoxia. Las células que migraron al compartimiento inferior fueron visualizadas mediante tinción con cristal violeta. Se cuantificó la migración normalizada a los valores obtenidos en normoxia + DMSO. Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes (media ± D.E.; *p<0.05). (B) Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

5.6 RESULTADOS ANEXOS

5.6.1 LA HIPOXIA AUMENTA LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN DE CÉLULAS OKF Y CAL27

Es conocido que la hipoxia incrementa la capacidad migratoria en diversos tipos celulares de cáncer y no tumorales (Reyes y cols., 2020). Por lo tanto, las observaciones realizadas en células DOK fueron inesperadas al respecto. Para controlar los datos obtenidos en estos experimentos, se evaluó el efecto de la hipoxia sobre la migración de otras 2 líneas celulares, queratinocitos no displásicos inmortalizados (OKF) y COCE (CAL27). De esta forma, los cultivos celulares fueron expuestos a normoxia o hipoxia por 24 h, y posteriormente las células fueron re-suspendidas y depositadas en la parte superior de los insertos Transwell. Después de 2,5 h, las células que migraron hacia el lado inferior de los insertos fueron teñidas y cuantificadas. De esta forma, se observó que en ambos tipos celulares, la hipoxia indujo un incremento

estadísticamente significativo de la migración celular en comparación a las células sometidas a normoxia (Figura 10 A, B, C y D).

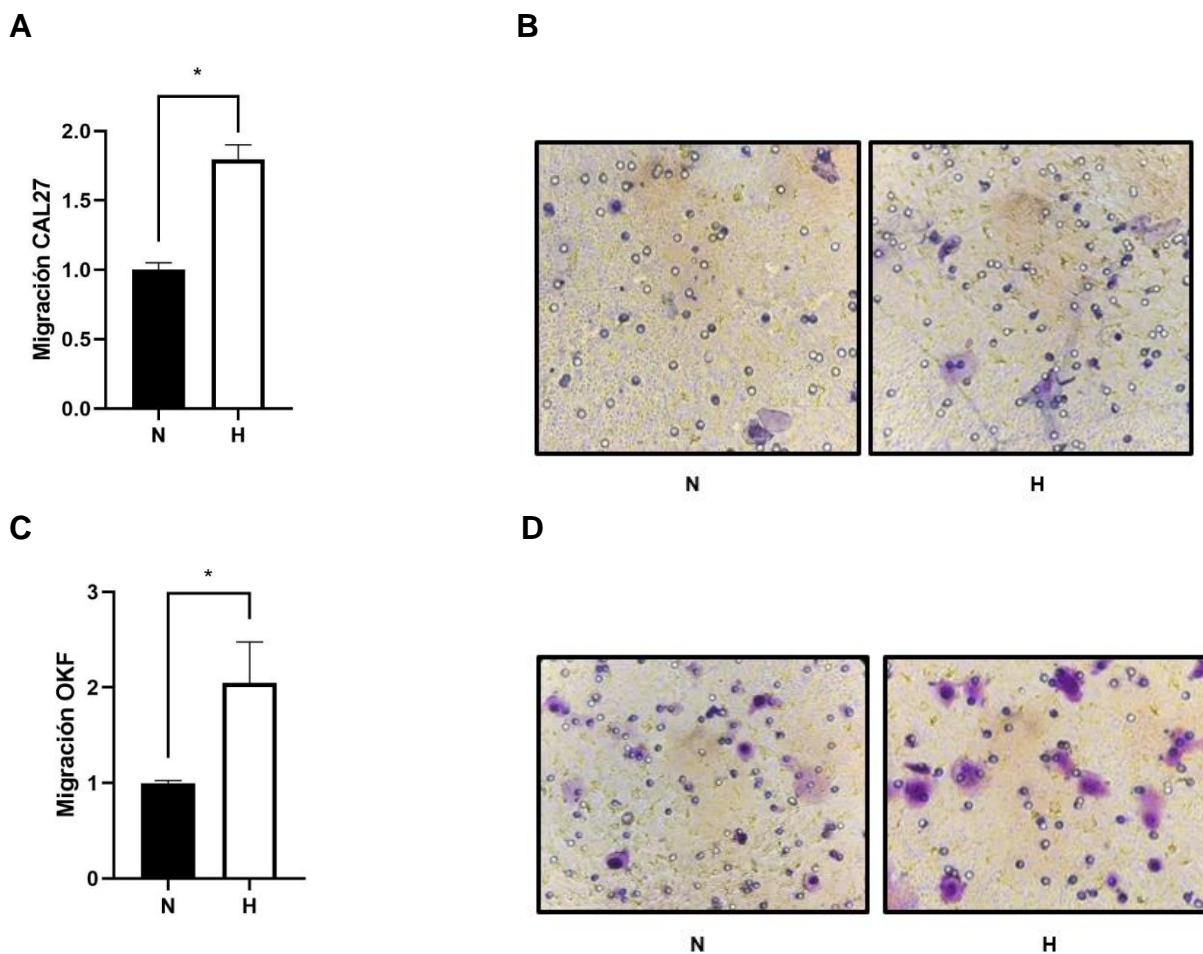


Figura 10. Cuantificación de la capacidad migratoria de células CAL27 y OKF mediante ensayo de Transwell. Luego de incubar en normoxia (N, 21% O₂) o hipoxia (H, 1% O₂) por 24 h, las células CAL27 (A, B) y OKF (C, D) fueron resuspendidas, contabilizadas y aquellas viables fueron sembradas en cámaras transwell recubiertas con fibronectina, para permitir su migración durante 150 minutos (2 horas y 30 minutos) en condiciones de normoxia. Las células que migraron al compartimiento inferior de la cámara fueron visualizadas mediante tinción con cristal violeta. Se cuantificó la migración normalizada a los valores obtenidos en normoxia. Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes (media \pm D.E.; * $p < 0.05$). (B, D) Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

6) DISCUSIÓN

La expresión de HIF1 α ha sido reportada en biopsias de pacientes, en donde se ha visto un aumento de la expresión de esta proteína en muestras diagnosticadas con displasia y COCE. Pese a esta asociación, aún se desconoce el rol de HIF1 α en células de DEO a través de modelos *in vitro*. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la hipoxia y su dependencia con respecto al factor HIF1 α en la viabilidad y migración de queratinocitos orales displásicos.

En este estudio se determinó que los procesos de viabilidad y migración celular en queratinocitos orales displásicos son afectados en condiciones de hipoxia, y que tanto en condiciones de normoxia e hipoxia, existe una dependencia del factor transcripcional HIF1 α (Figura 8 y 9). Esto cobra relevancia, debido al poco conocimiento que se tiene del rol que cumple la hipoxia en estas lesiones y su función en el proceso de carcinogénesis oral. Cabe destacar, que este estudio es el primero en evaluar el efecto de la hipoxia en queratinocitos orales displásicos, así como la relevancia que tiene HIF1 α frente a esta condición.

Al evaluar la estabilización de HIF1 α (Figura 5), hubo un aumento en los niveles de esta proteína frente a la hipoxia, lo anterior debido a que su proceso de degradación es oxígeno-dependiente (Huang y cols., 1998; Sutter y cols., 2000), situación que coincide, tanto con la hipótesis, como también con los estudios previos que reportan un aumento de la expresión en muestras de DEO y COCE a medida que aumenta el grado de severidad (Lin y cols., 2008, Guo y cols., 2018, Patel y cols. 2019). Esta situación puede deberse a una disminución en la disponibilidad de O₂ a medida que progresa la severidad de esta patología (Mallia y cols., 2008). Además, esto se condice con la estabilización de HIF1 α que se observa al estudiar distintas líneas celulares sometidas a hipoxia (Maxwell y cols., 1999; Gunaratnam y cols., 2003; Cohen y cols., 2004; Bos y cols., 2005; Erler y cols., 2006; Liang y cols., 2008).

Un aspecto importante de considerar cuando se estudia la estabilización de HIF1 α mediante hipoxia, es el tiempo de exposición de las células a esta condición, ya que se sabe que los niveles de HIF1 α fluctúan dependiendo del tiempo en el cual se ha expuesto a la hipoxia (Oh y cols., 2016), debido a un mecanismo de feedback negativo, sumado a su rol como factor de transcripción

y su tiempo de vida media (Bertout y cols., 2008; Marín-Hernández, 2009; Semenza, 2010). En estudios con células de COCE sometidas a hipoxia, se ha observado que HIF1 α alcanza un pico de estabilización a las 16 h, siendo casi dos veces mayor al valor obtenido en condiciones de normoxia, sin embargo, disminuyendo a valores similares a los observados en este estudio al ser estimuladas por 24 h (Zhang y cols., 2004; Gao y cols., 2019). Por lo tanto, es relevante evaluar los niveles de estabilización de HIF1 α con diferentes cinéticas de exposición a hipoxia, para evaluar así las temporalidad y consecuencias que ello tendría en la viabilidad y migración celular frente a niveles fluctuantes de HIF1 α .

Una observación que resultó interesante fue la expresión basal de HIF1 α en queratinocitos displásicos orales en normoxia (Figura 5). Al respecto, se ha documentado en muestras de COCE una nula expresión de vHL, proteína necesaria para la degradación de HIF1 α (Zhang y cols., 2014), por lo que surge la posibilidad que en DEO, esta proteína supresora de tumores pudiese estar alterada, siendo por lo tanto relevante en etapas previas al cáncer. Por otro lado, sería interesante evaluar los distintos polimorfismos de HIF1 α que existen en DEO, tal como se realizó en muestras de COCE (Chen y cols., 2004) para evaluar qué rol cumplirían en su estabilización y degradación.

Otra observación que se realizó en este trabajo de investigación fue la disminución del número de queratinocitos displásicos orales viables frente a la hipoxia (Figura 6), situación que ocurrió a pesar de que HIF1 α es estabilizado en la misma condición. Esto llama la atención, a la luz de que muchos genes blancos de HIF1 α promueven la viabilidad celular en varios modelos de cáncer y células embrionarias (Cohen y cols., 2004; Bos y cols., 2005; Bertout y cols., 2008; Lv y cols., 2017; Xu y cols., 2017). A pesar de la basta literatura al respecto, existen líneas celulares de cáncer de hígado en donde se han observado respuestas variables frente a la hipoxia al evaluar su viabilidad (Dubbelboer y cols., 2019). A su vez, la hipoxia reduce el número de células viables en líneas celulares no cancerígenas (Tsui y cols., 2013; Zimmerman y cols., 2018), por lo que se propone que las células DOK, al ser parcialmente transformadas (Chang y cols., 1992) podrían tener un comportamiento similar al de células no

tumorales, dado que no poseen la maquinaria necesaria para responder de la misma manera frente a la hipoxia.

Es sabido que la hipoxia genera un importante estrés fisiológico en las células, induciendo apoptosis al generar daños a nivel del ADN (Hammond y cols., 2003), caída de los niveles de ATP y el impedimento de distintas funciones celulares (Sendoel y Hengartner, 2014). La proteína supresora de tumores p53 tiene como función regular la muerte celular programada y el arresto del ciclo celular (Geng y cols., 2010). La mutación de este gen en células de cáncer, reduce la muerte celular inducida por hipoxia (Graeber y cols., 1996). Distintos estudios asocian la severidad de la displasia con la expresión positiva de mutaciones en el gen que codifica esta proteína (Kerdpon y cols., 1997; Batista y cols., 2012; Suwasini y cols., 2018) lo que genera nuevas interrogantes de por qué las células de displasia leve/moderada utilizadas en este estudio (Chang y cols., 1992) responden disminuyendo su viabilidad (Figura 6). Por su parte, en células de COCE la hipoxia inhibe la apoptosis celular y promueve la autofagia a través del aumento en la expresión de circCDR1 y la actividad de la vía AKT-ERK1/2 (Gao y cols., 2019), por lo que sería interesante evaluar ambos procesos celulares, la expresión de estas proteínas en las células DOK sometidas a hipoxia y las posibles mutaciones en p53 (Rowley y cols., 1998; Qin y cols., 1999; Syafriadi, 2009).

Otro hallazgo de este trabajo de investigación es que la inhibición de la función transcripcional de HIF1 α (Figura 8) viene acompañada de una disminución en la viabilidad celular en ambas condiciones (normoxia e hipoxia), lo cual va en línea con lo reportado previamente mediante la reducción de HIF1 α por transfección (Lv y cols., 2017) o usando el inhibidor 3-(5'-hidroximetil-2'-furyl)-1-bencilindazol (YC-1) (Tsui y cols., 2013). YC-1 también cumple la función de disminuir la expresión de HIF1 α , lo que produce un incremento en los niveles de p53 y sus genes blanco con funciones pro-apoptóticas (Tsui y cols., 2013). Al usar metformina como inhibidor no específico de HIF1 α se ha observado la pérdida de la integridad del ADN y un aumento de los niveles de ARNm de caspasa-3, involucrada en el proceso de apoptosis (Guimarães y cols., 2016). Por lo tanto, sería interesante evaluar estos niveles tras el uso del inhibidor C₂₆H₂₉NO₅ (usado en esta tesis), así como la relación entre la expresión y función

de HIF1 α y p53 con sus genes blanco en queratinocitos orales displásicos expuestos a hipoxia. Lo anterior, debido a que se ha propuesto la existencia de una competencia entre HIF1 α y p53 por co-activadores necesarios para su función transcripcional (Schmid y cols., 2004), así como también otras interacciones que podrían estar ocurriendo entre estas dos proteínas (An y cols., 1998; Wenger y cols., 1998; Suzuki y cols., 2001; Hansson y cols., 2002; Chen y cols., 2003; Sánchez-Puig y cols., 2005), debido a que HIF1 α pareciera tener funciones pro y anti-apoptóticas dependiendo del contexto (Sendoel y Hengartner, 2014).

En los ensayos de inhibición de HIF1 α se obtuvieron resultados dispares según los ensayos de exclusión Azul de Tripán y MTS (Figura 8). El primero utiliza una tinción que no logra entrar al citoplasma de células viables, mientras sí es capaz de ingresar en aquellas no viables, debido a la pérdida de integridad de la membrana plasmática, lo cual permite cuantificar directamente aquellas viables o no viables, inmediatamente después de la cosecha de células provenientes de la condición de hipoxia (Strober, 2015). Por el contrario, el ensayo MTS requiere de un período de incubación en condiciones de normoxia, ya que evalúa la tasa metabólica mitocondrial de las células viables al metabolizar MTS en formazán (Riss y cols., 2013), lo que es medido a través de la absorbancia del medio de cultivo a 490 nm (Kuetze y cols., 2017). Esta actividad metabólica puede cambiar por diferentes condiciones y tratamientos químicos, y no necesariamente debido al número de células viables (Plumb y cols., 1989; Hsu y cols., 2003). De esta forma, sería posible explicar los valores similares en los grupos expuestos al vehículo o al inhibidor, dado que el ensayo de MTS se realiza en ambiente normóxico, independientemente de que las muestras provengan de un tratamiento previo de normoxia o hipoxia, situación en la cual la re-oxigenación podría producir múltiples respuestas en los procesos celulares (Cohen y cols., 2004).

Por otra parte, en este estudio se observó la disminución de la capacidad migratoria de las células DOK al ser sometidas a hipoxia (Figura 7), contrario a la hipótesis planteada y a la literatura; ya que existen numerosos ensayos de migración y la evaluación de distintos genes blancos de HIF1 α involucrados en este proceso en distintos modelos celulares de cáncer en donde se ha descrito

que la hipoxia promueve la migración (Erlor y cols., 2006; Ghoshal y cols., 2012; Zhang y cols., 2012; Zhou y cols., 2015; Silva y cols., 2016; Castillo-Bennett y cols., 2018). En estudios realizados en líneas celulares no cancerígenas se ha reportado que la hipoxia no tiene efecto en la migración celular (Li y cols., 2010; Gardner y cols., 2017), y debido a que las células DOK son células con fenotipo no maligno, sino parcialmente transformado y con cambios citológicos distintos al cáncer (Chang y cols., 1992), podrían comportarse de manera similar. Interesantemente, al ser sometidos a radiación UV-A, estas células pierden considerablemente más capacidad migratoria en comparación a queratinocitos sanos y células de carcinoma oral, lo que se explica debido a que este estrés genera un movimiento aleatorio y desorganizado no direccional (Niculițe y cols., 2018), dando una idea del efecto que tiene otro estrés, como la hipoxia en ellas.

Se han realizado distintos ensayos de migración en esta línea celular, pero principalmente ensayos de cierre de herida por 24 horas (Dil y Banerjee, 2011; Fang y cols., 2015; Rajendiran y cols., 2015; Niculițe y cols., 2018; Kralova y cols., 2018; Wisniewski y cols., 2018). Usualmente los ensayos de Transwell tienen una duración variable dependiendo de la línea celular (Li y cols., 2010; Guo y cols., 2014; Park y cols., 2017; Enjie y cols., 2019), por lo que fue complejo definir el tiempo de duración de este ensayo, al no disponer de evidencia previa, ya que es fundamental seleccionar un tiempo suficiente para que las células logren migrar y a la vez no sea demasiado para no saturar el sistema (Jutsus y cols., 2014). En futuros estudios se debería realizar ensayos a distintos tiempos para evaluar si esta variable tiene alguna incidencia en los resultados obtenidos.

Como aproximación a un modelo de carcinogénesis oral en distintas etapas, se realizó el mismo ensayo de migración celular en queratinocitos no displásicos orales (OKF) y en células de carcinoma oral de células escamosas (CAL27) (Figura 10), en donde la hipoxia promovió la capacidad migratoria de ambos tipos celulares. Una interrogante que surge en relación a este comportamiento disímil de las células DOK, es sobre el posible mecanismo que podría explicarlo. De esta forma, llama la atención una observación reciente de nuestro grupo de laboratorio, en donde se demostró que la presencia nuclear de β -catenina, es considerablemente mayor en células DOK, en comparación a las otras dos líneas celulares (Reyes y cols., 2019). En este mismo estudio se

demostró un incremento en la expresión de genes blanco de β -catenina que promueven la proliferación celular, situación que resulta intrigante, ya que se ha propuesto una relación inversa entre la actividad proliferativa versus la capacidad migratoria en células tumorales (Reyes y cols., 2019). **Por lo tanto, surge la interrogante si es que procesos, como la acumulación nuclear de β -catenina, podrían condicionar la respuesta de células DOK frente a la hipoxia. Se requerirán estudios adicionales para abordar ésta y otras interrogantes.**

Por otro lado, se reportó una disminución de la migración de células DOK cuando se les administró un inhibidor de HIF1 α , tanto en condiciones de normoxia, como en hipoxia (Figura 9), lo que confirma la hipótesis del requerimiento de HIF1 α en este proceso. Estudios previos indican que el silenciamiento de HIF1 α (Guo y cols., 2014) produce la disminución de la actividad de la vía Grupo de alta movilidad N 5 (HMGN5)-MMP2/MMP9 en células de osteosarcoma (Enjie y cols., 2019), lo que causa una disminución en la migración celular, similarmente a lo que ocurre cuando se utiliza un inhibidor de HIF1 α en células mesenquimales derivadas de medula ósea en hipoxia, evento que ocurre a través de la regulación negativa de la vía Kinasa asociada a Rho 1 (ROCK1) – RAC1/2/3 (Choi y cols., 2016). Asimismo, la utilización de vanilina, un compuesto anti-cancerígeno y anti-metastásico, regula negativamente la capacidad migratoria de células de melanoma al inhibir la expresión de ARNm de HIF1 α mediada por STAT3 (Park y cols., 2017).

Como ya se ha descrito previamente, la expresión de HIF1 α aumenta a medida que aumenta la severidad de la DEO (Lin y cols., 2008; Guo y cols., 2018; Patel y cols., 2019) y, al mismo tiempo, los queratinocitos displásicos van cubriendo poco a poco la totalidad del espesor del epitelio (Speight, 2007). En el momento en que logran invadir la lámina propia y migrar hacia el tejido conectivo subyacente, es diagnosticado como COCE (Van der Waal, 2009; Dionne y cols., 2015; Watanabe y cols., 2015; El-Naggar y cols., 2017), por lo que se propone que la migración sería un evento tardío en la progresión de esta patología.

En la literatura, se han utilizado distintas estrategias para inhibir HIF1 α (Tsui y cols., 2013; Guo y cols., 2014; Lv y cols., 2017; Park y cols., 2017; Rivas y cols., 2020). El compuesto C₂₆H₂₉NO₅ es un análogo del ácido

ariloxiacetilamino benzoico usado como inhibidor farmacológico selectivo contra HIF1 α (Lee y cols., 2007) que a concentraciones menores a 30 μ M no afecta su expresión en hipoxia (Rivas y cols., 2020), pero sí el reclutamiento de p300/CBP (Yu y cols., 2017), co-activadores transcripcionales de HIF1 α (Huang y Bunn 2003), impidiendo la transcripción de sus genes blanco (Semenza, 2010). En el corto plazo, sería de gran interés evaluar la respuesta de las células DOK a distintas concentraciones de este inhibidor (Lee y cols., 2007; Chu y cols., 2012; Obama y cols., 2015; Cui y cols., 2016; Nouri y cols., 2016; Shirai y cols., 2016; Hu y cols., 2017; Yamazaki y cols., 2017; Chen y cols., 2018; Wilkes y cols., 2018) frente a los ensayos de viabilidad y migración debido a posibles interacciones que pudiera estar efectuando HIF1 α al estar estabilizado y no estar cumpliendo su función transcripcional (Kaidi y cols., 2007).

El dimetilsulfóxido (DMSO) (Wang y cols., 2012) es una molécula soluble en medios acuosos y orgánicos debido a que posee un dominio altamente polar y dos grupos metilo apolares (Santos y cols., 2005) y se usa comúnmente como vehículo de fármacos insolubles en agua en cultivos celulares (Pegg, 2007) y en distintas neoplasias malignas (Goto y cols., 1996; Santos y cols., 2003; Kami y cols., 2008). Interesantemente, se ha descrito que este compuesto detiene el ciclo celular de células linfoides en la fase G1 (Teraoka y cols., 1996), además de promover la expresión de la proteína supresora de tumores HLJ1 a través de la proteína activadora potenciadora-1 (AP-1), lo que promueve la apoptosis celular (Wang y cols., 2012). También se ha descrito que exacerba la citotoxicidad inducida por el tratamiento con cisplatino en células de carcinoma de Ehrlich (Osman y cols., 2015). Esto podría influir en los resultados obtenidos al evaluar la viabilidad de las células DOK al ser utilizado como vehículo del inhibidor (Lee y cols., 2007), ya que podría potenciar el efecto de la hipoxia como estrés fisiológico en las células y la pérdida de la función transcripcional de HIF1 α . También se ha reportado la supresión de la expresión de la proteína pro-invasiva MMP-2 (Koizumi y cols., 2003), gen blanco de HIF1 α (Bertout y cols., 2008), por lo que podría interferir en el proceso de migración e invasión de las células DOK. Para resolver esta interrogante, se propone utilizar en próximos ensayos otro vehículo, que no tenga efectos en estos procesos celulares, como control (Lee y cols., 2007).

Otra limitación de este estudio es el grado de displasia (El-Naggar y cols., 2017) de las células utilizadas. Como se ha reportado previamente, estas lesiones tienen un comportamiento heterogéneo dependiendo de la severidad de la displasia (Lin y cols., 2008; Guo y cols., 2018; Patel y cols., 2019), por lo que se sugiere a futuro utilizar queratinocitos orales con distintos grados de displasia, para comparar su respuesta frente a la hipoxia.

Como ya se ha definido, la hipoxia es la disminución en la disponibilidad de oxígeno (Bertout y cols., 2008). En este estudio se utilizó una técnica de “hipoxia física” con una cámara hermética sellada que se llenó con una mezcla de gases para inducir condiciones hipóxicas *in vitro* (Silva y cols., 2016). Existe otro método para generar este estímulo en cultivos celulares llamado “hipoxia química” (Maxwell y Salnikow, 2004), en donde se utiliza níquel (Ni^{2+}) o cobalto (Co^{2+}) para producir respuestas similares a la hipoxia en las células (Brahmachari y Joseph, 1973; Salnikow y cols., 1999), debido a la sustitución del hierro (Fe^{2+}) en dioxigenasas, inactivando a las enzimas que participan en la degradación de HIF1 α , y por lo tanto activando su vía de señalización (Maxwell y Salnikow, 2004), pero además efectos citotóxicos en las células (Permenter y cols., 2013). Por lo tanto, sería interesante comparar los resultados en ensayos de viabilidad y migración, utilizando estos dos tipos de hipoxia en las células DOK.

Debido a que HIF1 α está sobre-expresado en un variado número de tumores malignos y asociado a un peor pronóstico (dos Santos y cols., 2012; Li y cols., 2012; Zhou y cols., 2017; Han y cols., 2020), los tratamientos basados en esta proteína se han convertido en una estrategia prometedora para tratar el cáncer (Wigerup y cols., 2016). Un número creciente de agentes anticancerosos han demostrado la capacidad de inhibir la vía de HIF1 α a través de distintos mecanismos que incluyen: la reducción en los niveles proteicos o de ARNm de HIF1 α , inhibir su unión al ADN y la transcripción de genes blanco de HIF1 α (Semenza, 2007), lo que suprime el crecimiento y promueve la apoptosis celular hipoxia-dependiente, en cáncer hepático y prostático (Cheng y cols., 2019), de pulmón (Jacoby y cols., 2010), linfoma (Kim y cols., 2020), pancreático (Logsdon y cols., 2016) y mamario (Oh, 2016). Interesantemente, se ha reportado que en modelos *in vivo* de COCE, la metformina (clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida),

además de ser el fármaco terapéutico de primera línea para la diabetes mellitus tipo 2 (Leone y cols., 2014), sensibiliza la respuesta al tratamiento con cisplatino mediante inhibición de la vía de señalización factor nuclear kappa (NF- κ B) / HIF-1 α (Qi y cols., 2016). Por lo que una mejor comprensión del rol de HIF-1 α en la carcinogénesis oral, podría ofrecer nuevas vías para el uso de este como diana terapéutica y así generar nuevas prácticas clínicas en el tratamiento del cáncer y displasia oral (Soni y Padwad, 2017).

7) CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se evaluó si el factor de transcripción HIF1 α cumple un rol en los procesos celulares de viabilidad y migración de los queratinocitos displásicos orales al estabilizarlo mediante hipoxia, lo cual no había sido reportado a través de modelos *in vitro*. Entonces, se concluye que:

- La hipoxia estabiliza a HIF1 α y además produce una disminución en el número de células viables y capacidad migratoria de los queratinocitos displásicos orales.
- El factor de transcripción HIF1 α es requerido para la viabilidad y migración de queratinocitos orales displásicos.
- Los queratinocitos orales displásicos poseen un comportamiento distinto a otras líneas celulares comúnmente usadas en el modelo de carcinogénesis oral, al ser sometidas a hipoxia.

Estos resultados sugieren que HIF1 α es requerido en los procesos de migración y viabilidad celular en las etapas iniciales de la carcinogénesis oral. Ésta y futuras investigaciones servirán para comprender de mejor manera los mecanismos moleculares asociados al inicio y progresión del carcinoma oral de células escamosas.

8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH y cols. (2001). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer research*; 61(7), 2911–2916.

Aguirre P, Aguirre JM (2008). Displasia epitelial. Concepto y significación. *Avances en Odontoestomatología* 2008; 24, 81-88.

An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV y cols. (1998). Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature*; 392(6674), 405–408.

Angadi VC, Angadi PV (2015). GLUT-1 immunoexpression in oral epithelial dysplasia, oral squamous cell carcinoma, and verrucous carcinoma. *Journal of oral science*; 57(2), 115–122.

Ayala F, Rocha R, Carvalho K, Carvalho A, da Cunha I, Lourenço S y cols. (2010). GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecules* 2010; 15, 2374-2387.

Bache M, Kappler M, Said HM, Staab A, Vordermark D (2008). Detection and specific targeting of hypoxic regions within solid tumors: current preclinical and clinical strategies. *Current medicinal chemistry*; 15(4), 322–338.

Batista Z, Rodríguez I, Miranda J, Rengifo-Calzado E, Obaya T y cols. (2012). Relación histopatológica de la displasia epitelial con la oncoproteína p53 en la leucoplasia bucal. *Revista Cubana de Estomatología*; 49(1), 20-29.

Berger AP, Kofler K, Bektic J, Rogatsch H, Steiner H, Bartsch G y cols. (2003). Increased growth factor production in a human prostatic stromal cell culture model caused by hypoxia. *The Prostate*; 57(1), 57–65.

Bertout J, Patel S, Simon M (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2008; 12, 967-75.

Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G (2000). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable

prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer research*; 60(17), 4693–4696.

Birner P, Gatterbauer B, Oberhuber G, Schindl M, Rössler K, Prodingner A y cols. (2001). Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer*, 92(1), 165–171.

Birner P, Schindl M, Obermair A, Breiteneker G, Oberhuber G (2001). Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*; 7(6), 1661–1668.

Bokor-Bratić M (2003). Prevalence of oral leukoplakia. *Medicinski pregljed*; 56(11-12), 552–555.

Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der Groep P, van der Valk P, van der Wall E (2005). Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathology*; 46(1), 31–36.

Bouquot J, Speight P, Farthing P (2006). Epithelial dysplasia of the oral mucosa—Diagnostic problems and prognostic features. *Current Diagnostic Pathology*; 12, 11-21.

Brahmachari HD, Joseph S (1973). Cobalt compounds for the control of hypoxic stress. *Aerospace medicine*; 44 (6), 636-8.

Brennan PA, Mackenzie N, Quintero M (2005). Hypoxia-inducible factor 1alpha in oral cancer. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*; 34(7), 385–389.

Carvalho KC, Cunha IW, Rocha RM, Ayala FR, Cajaíba MM, Begnami MD y cols. (2011). GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics (Sao Paulo)*; 66(6):965-72.

Castillo-Bennett J, Silva P, Martinez S, Torres V, Quest A (2018). Hypoxia-Induced Caveolin-1 Expression Promotes Migration and Invasion of Tumor Cells. *Current Molecular Medicine* 2018; 18, 1-8.

Chan DA, Giaccia AJ (2007). Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer metastasis reviews*; 26(2), 333–339.

Chang SE, Foster S, Betts D, Marnock WE (1992). DOK, a cell line established from human dysplastic oral mucosa, shows a partially transformed non-malignant phenotype. *International journal of cancer*, 52(6), 896–902.

Chen D, Li M, Luo J, Gu W (2003). Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *The Journal of biological chemistry*; 278(16), 13595–13598.

Chen MK, Chiou HL, Su SC, Chung TT, Tseng HC, Tsai HT y cols. (2009). The association between hypoxia inducible factor-1alpha gene polymorphisms and increased susceptibility to oral cancer. *Oral oncology*; 45(12), e222–e226.

Chen YF, Pandey S, Day CH, Chen YF, Jiang AZ y cols. (2018). Synergistic effect of HIF-1 α and FoxO3a trigger cardiomyocyte apoptosis under hyperglycemic ischemia condition. *Journal of cellular physiology*; 233(4), 3660–3671.

Cheng J, Hu L, Yang Z, Suo C, Wang YJ y cols. (2019). 2-Oxonanonoidal Antibiotic Actinolactomycin Inhibits Cancer Progression by Suppressing HIF-1 α . *Cells*; 8(5), 439.

Choi JH, Lee YB, Jung J, Hwang SG, Oh IH y cols. (2016). Hypoxia Inducible Factor-1 α Regulates the Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via Integrin α 4. *Stem cells international*; 2016, 7932185.

Choudhari SK, Chaudhary M, Gadbail AR, Sharma A, Tekade S (2014). Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: a review. *Oral oncology*; 50(1), 10–18.

Chu W, Wan L, Zhao D, Qu X, Cai F y cols. (2012). Mild hypoxia-induced cardiomyocyte hypertrophy via up-regulation of HIF-1 α -mediated TRPC signalling. *Journal of cellular and molecular medicine*; 16(9), 2022–2034.

Cohen NA, Lai SY, Ziober AF, Ziober BL (2004). Dysregulation of hypoxia inducible factor-1alpha in head and neck squamous cell carcinoma cell lines correlates with invasive potential. *The Laryngoscope*; 114(3), 418–423.

Cui XY, Tinholt M, Stavik B, Dahm AE, Kanse S y cols. (2016). Effect of hypoxia on tissue factor pathway inhibitor expression in breast cancer. *Journal of thrombosis and haemostasis*; 14(2), 387–396.

Danielson S (1996). *Inmunoassay*, 505-535.

Dengler, V. L., Galbraith, M., & Espinosa, J. M. (2014). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(1), 1–15.

Dil N, Banerjee AG (2011). A role for aberrantly expressed nuclear localized decorin in migration and invasion of dysplastic and malignant oral epithelial cells. *Head & neck oncology*; 3, 44.

Dionne KR, Warnakulasuriya S, Zain RB, Cheong SC (2015). Potentially malignant disorders of the oral cavity: current practice and future directions in the clinic and laboratory. *International journal of cancer*, 136(3), 503–515.

Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PV, Liyanage RL, Dias KD, Tilakaratne WM (2012). Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*; 113(4), 518–525.

dos Santos M, Mercante AM, Louro ID, Gonçalves AJ, de Carvalho MB, da Silva EH y cols. (2012). HIF1-alpha expression predicts survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *PloS one*; 7(9), e45228.

Dost F, Lê Cao K, Ford P, Ades C, Farah C (2014). Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: a real-world evaluation of histopathologic grading. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology 2014*; 117, 343-352.

Dubbelboer IR, Pavlovic N, Heindryckx F, Sjögren E, Lennernäs H (2019). Liver Cancer Cell Lines Treated with Doxorubicin under Normoxia and Hypoxia: Cell Viability and Oncologic Protein Profile. *Cancers*; 11(7), 1024.

Eckert A, Lautner M, Schütze A, Taubert H, Schubert J, Bilkenroth U (2011). Coexpression of hypoxia-inducible factor-1 α and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Histopathology*; 58, 1136–1147.

Eckert A, Kappler M, Schubert J, Taubert H (2012). Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 16,189–196.

El-Naggar AK, Chan JK, Grandis JR, Takata T, Slotweg PJ (2017). WHO Classification of Head and Neck Tumors. *WHO/IARC Classification of Tumours. 4th ed. Vol. 9. International Agency for Research on Cancer (IARC) press.*

Enjie X, Ji Z, Jiang H, Lin T, Ma J y cols. (2019). Hypoxia-Inducible Factor 1A Upregulates HMGN5 by Increasing the Expression of GATA1 and Plays a Role in Osteosarcoma Metastasis. *BioMed Research International*; 2019, 1-8.

Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT y cols. (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*; 440(7088), 1222–1226.

Fang WY, Chen YW, Hsiao JR, Liu CS, Kuo YZ, Wang YC y cols. (2015). Elevated S100A9 expression in tumor stroma functions as an early recurrence marker for early-stage oral cancer patients through increased tumor cell invasion, angiogenesis, macrophage recruitment and interleukin-6 production. *Oncotarget*; 6(29), 28401–28424.

Feitosa SG, Viana KF, Luna E, Costa F, Cavalcante RB, Chaves FN y cols. (2018). Immunohistochemical Evaluation of GLUT-3 and GLUT-4 in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*; 19(7), 1779–1783.

Feron O (2009). Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*; 92(3), 329–333.

Fronie A, Bunget A, Afrem E, Preoțescu LL, Corlan Pușcu D, Streba L y cols. (2013). Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects. *Romanian journal of morphology and embryology*; 54(2), 343–348.

Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P y cols. (2008). Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *International journal of cancer*; 122(1), 155–164.

Gao L, Dou ZC, Ren WH, Li SM, Liang X y cols. (2019). CircCDR1as upregulates autophagy under hypoxia to promote tumor cell survival via AKT/ERK $\frac{1}{2}$ /mTOR signaling pathways in oral squamous cell carcinomas. *Cell death & disease*; 10, 745.

Gardner P, Liyanage S, Cristante E, Sampson R, Dick A y cols. (2017). Hypoxia inducible factors are dispensable for myeloid cell migration into the inflamed mouse eye. *Scientific Reports*; 7, 40830.

Geng Y, Walls KC, Ghosh AP, Akhtar RS, Klocke BJ y cols. (2010). Cytoplasmic p53 and activated Bax regulate p53-dependent, transcription-independent neural precursor cell apoptosis. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*; 58(3), 265–275.

Geum DH, Roh YC, Yoon SY, Kim HG, Lee JH, Song JM y cols. (2013). The impact factors on 5-year survival rate in patients operated with oral cancer. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*; 39(5), 207–216.

Ghoshal P, Teng Y, Lesoon LA, Cowell JK (2012). HIF1A induces expression of the WASF3 metastasis-associated gene under hypoxic conditions. *International journal of cancer*; 131(6): 905 – 915.

Goto I, Yamamoto-Yamaguchi Y, Honma Y (1996). Enhancement of sensitivity of human lung adenocarcinoma cells to growth-inhibitory activity of interferon alpha by differentiation-inducing agents. *British journal of cancer*; 74(4), 546–554.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ y cols. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*; 379(6560), 88–91.

Griffiths E, Pritchard S, Valentine H, Whitchelo N, Bishop P, Ebert M y cols. (2007). Hypoxia-inducible factor-1alpha expression in the gastric carcinogenesis sequence and its prognostic role in gastric and gastro-oesophageal adenocarcinomas. *British Journal of Cancer*, 96, 95–103.

Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene expression*; 7(3), 205–213.

Guimarães TA, Farias LC, Santos ES, de Carvalho Fraga CA, Orsini LA, de Freitas Teles L y cols. (2016). Metformin increases PDH and suppresses HIF-1 α under hypoxic conditions and induces cell death in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 7(34), 55057–55068.

Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, de Paulsen N, Mekhail K, Parolin DA y cols. (2003). Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL (-/-) renal cell carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*; 278(45), 44966–44974.

Guo M, Cai C, Zhao G, Qiu X, Zhao H y cols. (2014). Hypoxia promotes migration and induces CXCR4 expression via HIF-1 α activation in human osteosarcoma. *PloS one*; 9(3), 90518.

Guo M, Mu Y, Yu D, Li J, Chen F, Wei B y cols (2018). Comparison of the expression of TGF- β 1, E-cadherin, N-cadherin, TP53, RB1CC1 and HIF-1 α in oral squamous cell carcinoma and lymph node metastases of humans and mice. *Oncology Letters*; 15, 1639-1645.

Hammond EM, Dorie MJ, Giaccia AJ (2003). ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *The Journal of biological chemistry*; 278(14), 12207–12213.

Han S, Yin X, Wang Y, Xu W, Cheng W (2020). Co-expression of HIF-1 and TLR3 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*; 13(1), 65–72.

Hanioka T, Tanaka M, Ojima M, Takaya K, Matsumori Y, Shizukuishi S (2000). Oxygen sufficiency in the gingiva of smokers and non-smokers with periodontal disease. *Journal of periodontology*; 71(12), 1846–1851.

Hansson LO, Friedler A, Freund S, Rudiger S, Fersht AR (2002). Two sequence motifs from HIF-1 α bind to the DNA-binding site of p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 99(16), 10305–10309.

Hsu S, Bollag WB, Lewis J, Huang Q, Singh B y cols. (2003). Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*; 306(1), 29–34.

Hu J, Nie Y, Chen S, Xie C, Fan Q y cols. (2017). Leucine reduces reactive oxygen species levels via an energy metabolism switch by activation of the mTOR-HIF-1 α pathway in porcine intestinal epithelial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*; 89, 42–56.

Huang L, Gu J, Schau M, Bunn H (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 95, 7987–7992.

Huang L, Bunn H (2003). Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278, 19575-19578.

Huang Liu R., Chen SP, Lu TM, Tsai WY, Tsai CH, Yang CC y cols. (2014). Selective apoptotic cell death effects of oral cancer cells treated with destruxin B. *BMC complementary and alternative medicine*; 14, 207.

Jaber M, Porter S, Speight P, Eveson J, Scully C (2003). Oral epithelial dysplasia: Clinical characteristics of western European residents. *Oral oncology*; 39, 589-96.

Jacoby JJ, Erez B, Korshunova MV, Williams RR, Furutani K y cols. (2010). Treatment with HIF-1 α antagonist PX-478 inhibits progression and spread of orthotopic human small cell lung cancer and lung adenocarcinoma in mice.

Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer; 5(7), 940–949.

Jerjes W, Upile T, Hamdoon Z, Al-Khawalde M, Morcos M, Mosse CA y cols. (2012). CO2 laser of oral dysplasia: clinicopathological features of recurrence and malignant transformation. *Lasers in medical science*; 27(1), 169–179.

Jiang B, Semenza G, Bauer C, Marti H (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *American Journal of Physiology*; 271, 1172–1180.

Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H y cols. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular Cancer*; 18, 157 (2019)

Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV (2014). In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of visualized experiments*; (88), 51046.

Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B y cols. (2005). Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*; 63(11), 1599–1605.

Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*; 30(4), 393–402.

Kaidi A, Williams AC, Paraskeva C (2007). Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nature cell biology*; 9(2), 210–217.

Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y y cols. (2008). Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PloS one*, 3(6), e2407.

Katsuta M, Miyashita M, Makino H, Nomura T, Shinji S, Yamashita K y cols. (2005). Correlation of hypoxia inducible factor-1alpha with lymphatic metastasis via vascular endothelial growth factor-C in human esophageal cancer. *Experimental and Molecular Pathology*; 78, 123– 130.

Kerdpon D, Rich AM, Reade PC (1997). Expression of p53 in oral mucosal hyperplasia, dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral diseases*; 3(2), 86–92.

Kim EH., Ko HY, Yu AR, Kim H, Zaheer J y cols. (2020). Inhibition of HIF-1 α by Atorvastatin During 131I-RTX Therapy in Burkitt's Lymphoma Model. *Cancers*; 12(5), 1203.

Kimbrow KS, Simons JW (2006). Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocrine-related cancer*; 13(3), 739–749.

Koizumi K, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Watanabe M, Okamoto T y cols. (2003). Anti-angiogenic effects of dimethyl sulfoxide on endothelial cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*; 26(9), 1295–1298.

Kralova V, Hanušová V, Caltová K, Špaček P, Hochmalová M y cols. (2018). Flubendazole and mebendazole impair migration and epithelial to mesenchymal transition in oral cell lines. *Chemico-biological interactions*; 293, 124–132.

Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH y cols. (2006). Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFHX1A, and ZFHX1B. *Cancer research*; 66(5), 2725–2731.

Kuete V, Karaosmanoğlu O, Sivas H (2017). Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*; 271-297.

Lee K, Lee JH, Boovanahalli SK, Jin Y, Lee M y cols. (2007). (Aryloxyacetyl amino)benzoic acid analogues: A new class of hypoxia-inducible factor-1 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*; 50(7), 1675–1684.

Leone A, Di Gennaro E, Bruzzese F, Avallone A, Budillon A (2014). New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent. *Cancer treatment and research*; 159, 355–376.

Li JZ, Gao W, Chan JY, Ho WK, Wong TS (2012). Hypoxia in head and neck squamous cell carcinoma. *ISRN otolaryngology*; 2012, 708974.

Li L, Madu CO, Lu A, Lu Y (2010). HIF-1 α Promotes A Hypoxia-Independent Cell Migration. *The open biology journal*; 3, 8–14.

Liang X, Yang D, Hu J, Hao X, Gao J, Mao Z (2008). Hypoxia inducible factor-alpha expression correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymphangiogenesis/angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer research*; 28(3A), 1659–1666.

Lin P, Yu C, Wang J, Chen H, Cheng S, Kuo M (2008). Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha is significantly associated with the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *Journal of Oral Pathology & Medicine*; 37, 18–25.

Logsdon DP, Grimard M, Luo M, Shahda S, Jiang Y y cols. (2016). Regulation of HIF1 α under Hypoxia by APE1/Ref-1 Impacts CA9 Expression: Dual Targeting in Patient-Derived 3D Pancreatic Cancer Models. *Molecular cancer therapeutics*; 15(11), 2722–2732.

Lv B, Li F, Fang J, Xu L, Sun C y cols. (2017). Hypoxia inducible factor 1 α promotes survival of mesenchymal stem cells under hypoxia. *American journal of translational research*; 9(3), 1521–1529.

Mallia R, Thomas SS, Mathews A, Kumar R, Sebastian P, Madhavan J y cols. (2008). Oxygenated hemoglobin diffuse reflectance ratio for in vivo detection of oral pre-cancer. *Journal of biomedical optics*; 13(4), 041306.

Martínez C, Hernández M, Martínez B, Adorno D. (2016). Frequency of oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia in oral and oropharyngeal mucosa in Chile. *Revista médica de Chile*; 144(2), 169-174.

Mavropoulos A, Aars H, Brodin P (2003). Hyperaemic response to cigarette smoking in healthy gingiva. *Journal of clinical periodontology*; 30(3), 214–221.

Maxwell P, Wiesener M, Chang G, Clifford S, Vaux E, Cockman M (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*; 399, 271-275.

Maxwell P, Salnikow K (2004). HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer biology & therapy*; 3(1), 29–35.

Mendoza P, Ortiz R, Díaz J, Quest A, Leyton L, Stupack D y cols. (2013). Rab5 activation promotes focal adhesion disassembly, migration and invasiveness in tumor cells. *Journal of Cell Science*; 126, 3835–3847.

Mendoza P, Silva P, Díaz J, Arriagada C, Canales J, Cerda O y cols. (2018). Calpain2 mediates Rab5-driven focal adhesion disassembly and cell migration. *Cell Adhesion & Migration*; 3: 185 – 194.

Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW (2004). Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer cell*; 5(5), 429–441.

Nanci A (2018). Ten Cate's Oral Histology, capítulo 12.

Napier SS, Speight PM (2008). Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*; 37(1), 1–10.

Neville BW, Day TA (2002). Oral cancer and precancerous lesions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*; 52 (4), 195-215.

Niculite CM, Nechifor MT, Urs AO, Olariu L, Ceafalan LC y cols. (2018). Keratinocyte Motility Is Affected by UVA Radiation-A Comparison between Normal and Dysplastic Cells. *International journal of molecular sciences*; 19(6), 1700.

Nouri F, Salehinejad P, Nematollahi-Mahani SN, Kamarul T, Zarrindast MR y cols. (2016). Deferoxamine Preconditioning of Neural-Like Cells Derived from Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells as a Strategy to Promote Their Tolerance and Therapeutic Potential An In Vitro Study. *Cellular and molecular neurobiology*; 36(5), 689–700.

Obama T, Takayanagi T, Kobayashi T, Bourne AM, Elliott KJ y cols. (2015). Vascular induction of a disintegrin and metalloprotease 17 by angiotensin II

through hypoxia inducible factor 1 α . *American journal of hypertension*; 28(1), 10–14.

Oh ET, Kim CW, Kim SJ, Lee JS, Hong SS y cols. (2016). Docetaxel induced-JNK2/PHD1 signaling pathway increases degradation of HIF-1 α and causes cancer cell death under hypoxia. *Scientific reports*; 6, 27382.

Osman AM, Alqahtani AA, Damanhoury ZA, Al-Harthy SE, ElShal MF y cols. (2015). Dimethylsulfoxide exacerbates cisplatin-induced cytotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma cells. *Cancer cell international*; 15, 104. Parise O (2000). Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. Sarvier 2000.

Park EJ, Lee YM, Oh TI, Kim BM, Lim BO y cols. (2017). Vanillin Suppresses Cell Motility by Inhibiting STAT3-Mediated HIF-1 α mRNA Expression in Malignant Melanoma Cells. *International journal of molecular sciences*; 18(3), 532.

Patel NR, Jain L, Mahajan AM, Hiray PV, Shinde SS, Patel PA (2019). An Immunohistochemical Study of HIF-1 Alpha in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery: official publication of the Association of Otolaryngologists of India*; 71(4), 435–441.

Pegg DE (2007). Principles of cryopreservation. *Methods in molecular biology*; 368, 39–57.

Pereira K, Chaves, F, Viana, T, Carvalho F, Costa, F, Alves A y cols. (2013). Oxygen metabolism in oral cancer: HIF and GLUTs (Review). *Oncology letters*; 6, 311–316.

Pereira KM, Feitosa SG, Lima AT, Luna EC, Cavalcante RB, de Lima, KC y cols. (2016). Immunohistochemical Evaluation of Glucose Transporter Type 1 in Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*; 17(1), 147–151.

Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Torres-López M, Supuran CT, Gándara-Vila P, Gayoso-Diz P y cols. (2014). Expression of CA IX in dysplasia adjacent to surgical resection margins of oral squamous cell carcinoma.

Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission; 89(2), 91–97.

Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Torres-López M, Supuran CT, Gándara-Vila P, Gayoso-Diz P y cols. (2015). The use of CA-IX as a diagnostic method for oral leukoplakia. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*; 90(2), 124–131.

Permenter MG, Dennis WE, Sutto TE, Jackson DA, Lewis JA y cols. (2013). Exposure to cobalt causes transcriptomic and proteomic changes in two rat liver derived cell lines. *PloS one*; 8(12), e83751.

Plumb JA, Milroy R, Kaye SB (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer research*; 49(16), 4435–4440.

Qi X, Xu W, Xie J, Wang Y, Han S y cols. (2017). Erratum: Metformin sensitizes the response of oral squamous cell carcinoma to cisplatin treatment through inhibition of NF- κ B/HIF-1 α signal axis. *Scientific reports*; 7, 42934.

Qin GZ, Park JY, Chen SY, Lazarus P (1999). A high prevalence of p53 mutations in pre-malignant oral erythroplakia. *International journal of cancer*; 80(3), 345–348.

Rajendiran S, Kpetemey M, Maji S, Gibbs LD, Dasgupta S y cols. (2015). MIEN1 promotes oral cancer progression and implicates poor overall survival. *Cancer biology & therapy*; 16(6), 876–885.

Ranganathan K, Kavitha L (2019). Oral epithelial dysplasia: Classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders. *Journal of oral and maxillofacial pathology*; 23(1), 19–27.

Reyes M, Peña-Oyarzun D, Maturana A, Torres V (2019). Nuclear localization of β -catenin and expression of target genes are associated with increased Wnt secretion in oral dysplasia. *Oral Oncology*; 94, 58–67.

Reyes M, Flores T, Betancur D, Peña-Oyarzún D, Torres V (2020). Wnt/ β -Catenin Signaling in Oral Carcinogenesis. *International journal of molecular sciences*; 21(13), 4682.

Rivas S (2018). La estabilización de HIF-1 α induce la expresión de GEFS claves para la activación de RAB5. Tesis Doctoral, Programa de doctorado en ciencias biomédicas, Universidad de Chile.

Rivas S, Silva P, Reyes M, Sepulveda H, Solano L y cols. (2020). The RabGEF ALS2 is a hypoxia inducible target associated with the acquisition of aggressive traits in tumor cells. *Scientific Reports*; 10. 22302.

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA y cols. (2013). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*; 2004.

Rivera C (2015). Essentials of oral cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*; 8(9), 11884–11894.

Rowley H, Sherrington P, Helliwell TR, Kinsella A, Jones AS (1998). p53 expression and p53 gene mutation in oral cancer and dysplasia. *Otolaryngology-head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*; 118(1), 115–123.

Rudat V, Stadler P, Becker A, Vanselow B, Dietz A, Wannemacher M y cols. (2001). Predictive value of the tumor oxygenation by means of pO₂ histography in patients with advanced head and neck cancer. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]*; 177(9), 462–468.

Salnikow K, An W, Melillo G, Blagosklonny M, Costa M (1999). Nickel-induced transformation shifts the balance between HIF-1 and p53 transcription factors, *Carcinogenesis*; 20(9), 1819–1823.

Sánchez-Puig N, Veprintsev DB, Fersht AR (2005). Binding of natively unfolded HIF-1 α ODD domain to p53. *Molecular cell*; 17(1), 11–21.

Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical pharmacology*; 65(7), 1035–1041.

Santos NC, Martins-Silva J, Saldanha C (2005). PTEN "meets" DMSO. *Leukemia research*; 29(4), 361–362.

Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M y cols. (2002). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*; 8(6), 1831–1837.

Schmid T, Zhou J, Köhl R, Brüne B (2004). p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *The Biochemical journal*; 380(Pt 1), 289–295.

Sciubba JJ (2001). Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *American Journal of Clinical Dermatology*; 2(4), 239-251

Scott DA, Singer DL (2004). Suppression of overt gingival inflammation in tobacco smokers - clinical and mechanistic considerations. *International journal of dental hygiene*; 2(3), 104–110.

Scully C, Sudbø J, Speight PM (2003). Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*; 32(5), 251–256.

Semenza GL (2007). Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug discovery today*; 12(19-20), 853–859.

Semenza GL (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*; 29(5), 625–634.

Semenza GL (2011). Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*; 76, 347–353.

Semenza G (2012). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences 2012*; 33, 207–214.

Sendoel A, Hengartner MO (2014). Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology*; 29(3), 168–176.

Shirai T, Nazarewicz RR, Wallis BB, Yanes RE, Watanabe R y cols. (2016). The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease. *The Journal of experimental medicine*; 213(3), 337–354.

Silva P, Mendoza P, Rivas S, Díaz J, Moraga C, Quest A y cols. (2016). Hypoxia promotes Rab5 activation, leading to tumor cell migration, invasion and metastasis. *Oncotarget* 2016; 7, 29548-29562.

Simon MC, Keith B (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature reviews. Molecular cell biology*; 9(4), 285–296.

Simon M, Liu L, Barnhart B, Young R (2008). Hypoxia-induced signaling in the cardiovascular system. *Annual review of physiology*; 70, 51–71.

Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI (2002). Association of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Cancer*, 95, 1055-1063.

Soni S, Padwad Y (2017) HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta Oncológica*; 56(4), 503-515.

Speight PM (2007). Update on Oral Epithelial Dysplasia and Progression to Cancer. *Head & Neck Pathology* 2007; 1, 61–66

Strober W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*; 111, A3.B.1–A3.B.3.

Sutter CH, Laughner E, Semenza GL (2000). Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 97(9), 4748–4753.

Suwasini S, Chatterjee K, Purkait SK, Samaddar D, Chatterjee A y cols. (2018). Expression of P53 Protein and Ki-67 Antigen in Oral Leukoplakia with Different

Histopathological Grades of Epithelial Dysplasia. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*; 8(6), 513–522.

Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T (2001). Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene*; 20(41), 5779–5788.

Syafriadi M (2009). Transformation analysis of oral epithelial dysplasia to carcinoma in-situ and squamous cell carcinoma by p53 expression and gene mutations. *Dental Journal: Majalah Kedokteran Gigi*; 42.

Teraoka H, Mikoshiba M, Takase K, Yamamoto K, Tsukada K (1996). Reversible G1 arrest induced by dimethyl sulfoxide in human lymphoid cell lines: dimethyl sulfoxide inhibits IL-6-induced differentiation of SKW6-CL4 into IgM-secreting plasma cells. *Experimental cell research*; 222(1), 218–224.

Tilakaratne W, Iqbal Z, Teh M, Ariyawardana A, Pitiyage G, Cruchley A, y cols. (2008). Upregulation of HIF-1alpha in malignant transformation of oral submucous fibrosis. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2008; 37, 372–377.

Tsui L, Fong TH, Wang IJ (2013). The effect of 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole (YC-1) on cell viability under hypoxia. *Molecular vision*; 19, 2260–2273.

Van der Waal I (2009). Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*; 45, 317–323.

Van der Waal I. (2014). Oral potentially malignant disorders: is malignant transformation predictable and preventable? *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*; 19(4), 386–390.

Walsh JC, Lebedev A, Aten E, Madsen K, Marciano L, Kolb HC (2014). The clinical importance of assessing tumor hypoxia: relationship of tumor hypoxia to prognosis and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*; 21(10), 1516–1554.

Wang CC, Lin SY, Lai YH, Liu YJ, Hsu YL y cols. (2012). Dimethyl sulfoxide promotes the multiple functions of the tumor suppressor HLJ1 through activator protein-1 activation in NSCLC cells. *PLoS one*; 7(4), e33772.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 92(12), 5510–5514.

Watanabe N, Ohkubo T, Shimizu M, Tanaka T (2015). Preneoplasia and carcinogenesis of the oral cavity. *Oncology Discovery*; 2015, 3:1.

Wenger R, Camenisch G, Desbaillets I, Chilov D, Gassmann M (1999). Up-Regulation of Hypoxia-inducible Factor-1 α Is Not Sufficient for Hypoxic/Anoxic p53 Induction. *Cancer research*; 58. 5678-80.

Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C y cols. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*; 17(2), 271–273.

Wigerup C, Pålman S, Bexell D (2016). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology & therapeutics*; 164, 152–169.

Wilkes JG, O'Leary BR, Du J, Klinger AR, Sibenaller ZA y cols. (2018). Pharmacologic ascorbate (P-AsC_H) suppresses hypoxia-inducible Factor-1 α (HIF-1 α) in pancreatic adenocarcinoma. *Clinical & experimental metastasis*; 35(1-2), 37–51.

Wisniewski DJ, Ma T, Schneider A (2018). Nicotine induces oral dysplastic keratinocyte migration via fatty acid synthase-dependent epidermal growth factor receptor activation. *Experimental cell research*; 370(2), 343–352.

Xi LF, Edelstein ZR, Meyers C, Ho J, Cherne SL, Schiffman M. (2009). Human papillomavirus types 16 and 18 DNA load in relation to coexistence of other types, particularly those in the same species. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention. American Association for Cancer Research*; 18(9), 2507–2512.

Xu C, Li X, Guo P, Wang J (2017). Hypoxia-Induced Activation of JAK/STAT3 Signaling Pathway Promotes Trophoblast Cell Viability and Angiogenesis in Preeclampsia. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*; 23, 4909–4917.

Yamazaki R, Kasuya Y, Fujita T, Umezawa H, Yanagihara M y cols. (2017). Antifibrotic effects of cyclosporine A on TGF- β 1-treated lung fibroblasts and lungs from bleomycin-treated mice: role of hypoxia-inducible factor-1 α . *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*; 31(8), 3359–3371.

Yu T, Tang B, Sun X (2017). Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. *Yonsei medical journal*; 58(3), 489–496.

Zhang H, Wong CC, Wei H, Gilkes DM, Korangath P, Chaturvedi P y cols. (2012). HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene*; 31(14), 1757–1770.

Zhang Q, Zhang ZF, Rao JY, Sato JD, Brown J, Messadi DV y cols. (2004). Treatment with siRNA and antisense oligonucleotides targeted to HIF-1 α induced apoptosis in human tongue squamous cell carcinomas. *International journal of cancer*; 111(6), 849–857.

Zhang S, Zhou X, Wang B, Zhang K, Liu S, Yue K y cols. (2014). Loss of VHL expression contributes to epithelial–mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*; 50, 809–817.

Zhang X, Han S, Han HY, Ryu MH, Kim KY, Choi EJ y cols. (2013). Risk prediction for malignant conversion of oral epithelial dysplasia by hypoxia related protein expression. *Pathology*; 45(5), 478–483.

Zhang X, Kim KY, Zheng Z, Bazarsad S, Kim J (2017). Nomogram for risk prediction of malignant transformation in oral leukoplakia patients using combined biomarkers. *Oral oncology*; 72, 132–139.

Zhou J, Huang S, Wang L, Yuan X, Dong Q, Zhang D y cols. (2017). Clinical and prognostic significance of HIF-1 α overexpression in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *World journal of surgical oncology*; 15(1), 104.

Zhou X, Huang D, Xue Z, Xu X, Wang K y cols. (2015). Effect of HIF-1 α on biological activation of human tongue squamous cell carcinoma SCC-15 cells in vitro. *International journal of oncology*; 46(6), 2346–2354.

Zimmerman MA, Biggers CD, Li PA (2018). Rapamycin treatment increases hippocampal cell viability in an mTOR-independent manner during exposure to hypoxia mimetic, cobalt chloride. *BMC neuroscience*; 19(1), 82.

9) ANEXOS Y APÉNDICES

9.1 ANEXO 1

Datasheet células DOK

Dispatch to the EU: The UK has left the European Union. The UK now has a Trade & Co-operation Agreement with the EU and the process for exporting goods to the EU changed on 1st January 2021 [Find out more](#)

Coronavirus (COVID-19): Culture Collections continues to support Public Health England (PHE) in the delivery of essential services central to the COVID-19 response.



Public Health England

General Cell Collection Detail

ECACC General Cell Collection: DOK

Supplied by:	European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)
Culture Type:	Cell line
Collection:	ECACC General Collection
Catalogue No.:	94122104
Cell Line Name:	DOK
Citation Guidance:	If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in the publication as: DOK (ECACC 94122104)
Keywords:	Human Caucasian dysplastic oral keratinocyte
Cell Line Description:	The dysplastic oral keratinocyte cell line DOK was isolated from a piece of dorsal tongue from a 57 year old man. After a squamous-cell carcinoma was removed from the patient, who had been a heavy smoker, the remaining dysplasia was removed subsequently and used to initiate primary cultures leading to the establishment of DOK. The degree of dysplasia in the patient was described as mild to moderate. The cells show some stratification in confluent cultures and contain a keratin profile similar to the original dysplasia. Growth is stimulated by hydrocortisone and inhibited by cholera toxin. Expression of p53 is increased and a 12 bp in-frame deletion of the p53 gene (codon 188-191) could be identified. DOK cells are non-tumourigenic in athymic nude mice.
Species:	Human
Tissue of Origin:	tongue
CellType:	Epithelial
Growth Mode:	Adherent
DNA Profile:	STR-PCR Data: Amelogenin: X,Y CSF1PO: 12 D13S317: 11,13 D16S539: 9,12 D5S818: 12 D7S820: 11,13 TH01: 6,8 TPOX: 10 vWA: 14,18
Karyotype:	Aneuploid

Biosafety Information:	<p>Unless specified otherwise, at the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) we routinely handle all of our cell lines at containment level 2 in accordance with the ACDP guidelines. ACDP = Advisory Committee on Dangerous Pathogens (UK)</p> <p>All cell cultures have the potential to carry as yet unidentified adventitious agents. It is the responsibility of the end user to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country.</p> <p>ACDP Guidance: Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises.</p> <p>Hyperlinks to MSDS documents: Frozen cell cultures Material Safety Data Sheet Growing cell cultures Material Safety Data Sheet Nucleic acids derived from cell cultures Material Safety Data Sheet</p>
Subculture Routine:	Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:10 i.e. seeding at 2-4x10,000 cells/cm ² using 0.05% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO ₂ ; 37°C.
Culture Medium:	DMEM + 2mM Glutamine + 5µg/ml Hydrocortisone + 10% Foetal Bovine Serum (FBS).
Depositor:	Dr S E Chang, Department of Virology, Royal Postgraduate Medical School, London
Originator:	Yes
Country:	UK
References:	Int J Cancer 1992;52:896; Br J Cancer 1994;70:591
Additional Bibliography:	Not specified
Patents:	None specified by Depositor
Release Conditions:	Yes - commercial organisations are required to complete the 'Cell Line Release Authorisation for Research Use in Commercial Organisations' form

Product Images

- [94122104_DOK_image](#)

Note: Links open in a new window

Product Documents

- [Passage numbers explained](#)
- [CRT Cell Line Release Authorisation for Research Use in Commercial Organisations](#)
- [MSDS for frozen cell cultures](#)
- [MSDS for Nucleic Acids](#)

Note: Links open in a new window

The Culture Collections represent deposits of cultures from world-wide sources. While every effort is made to ensure details distributed by Culture Collections are accurate, Culture Collections cannot be held responsible for any inaccuracies in the data supplied. References where quoted are mainly attributed to the establishment of the cell culture and not for any specific property of the cell line, therefore further references should be obtained regarding cell culture characteristics. Passage numbers where given act only as a guide and Culture Collections does not guarantee the passage number stated will be the passage number received by the customer.

Cultures supplied by Culture Collections are for research purposes only. Enquiries regarding the commercial use of a cell line are referred to the depositor of the cell line. Some cell lines have additional special release conditions such as the requirement for a material transfer agreement to be completed by the potential recipient prior to the supply of the cell line. Please view the Terms & Conditions of Supply for more information.

Available Formats

Frozen

[Sign up for news](#)

9.2 ANEXO 2

Datasheet Anticuerpo anti-HIF1 α

BD Transduction Laboratories™

Technical Data Sheet

Purified Mouse Anti-Human HIF-1 α

Product Information

Material Number:	418958
Alternate Name:	MC01
Size:	50 μ g
Concentration:	250 μ g/ml
Clone:	54/HIF-1 α
Immunogen:	Human HIF-1 α aa. 610-727
Isotype:	Mouse IgG1, κ
Reactivity:	QC Testing: Human
Target MW:	120 kDa
Storage Buffer:	Aqueous buffered solution containing BSA, glycerol, and \pm 0.09% sodium azide.

Description

Molecular oxygen (O₂) is essential for mammalian metabolic processes such as oxidative phosphorylation. Thus, survival depends upon instantaneous transcriptional modulation of genes that maintain O₂ homeostasis. Transcriptional control of several of these genes is mediated by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). HIF-1 is a heterodimer whose α and β subunits are members of the PAS family of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors. Conserved structural features of these proteins are an N-terminal bHLH DNA-binding domain and multiple PAS domains that confer dimerization ability and target gene specificity. Members diverge in their C-terminal regions. HIF-1 β is also known as the arylhydrocarbon nuclear translocator which is part of the functional dioxin receptor. However, HIF-1 α functions exclusively to mediate responses to O₂ deprivation. It contains C-terminal and internal transactivation domains. Although HIF-1 protein levels increase during hypoxia, it is unstable in the presence of O₂ due to an oxygen-dependent degradation domain (ODD) that targets it for ubiquitination. Thus, HIF-1 α is essential for functional HIF-1 to mediate gene transcription in response to hypoxia.



Western blot analysis of HIF-1 α in HeLa cells stimulated with CoCl₂ (lanes 1, 2) or not (lane 3). Lane 1: 1:250 dilution of the Mouse Anti-HIF-1 α antibody. Lane 2: 1:1000 dilution of the Mouse Anti-HIF-1 α antibody.

Preparation and Storage

Store stabilized at -20°C.

The monoclonal antibody was purified from tissue culture supernatant or ascites by affinity chromatography.

Application Notes

Application

Western blot	Routinely Tested
Immunofluorescence	Tested During Development

Suggested Companion Products

Catalog Number	Name	Size	Clone
554001	FTTC Goat Anti-Mouse Ig	0.5 mg	Polyclonal
554002	HRP Goat Anti-Mouse Ig	1.0 ml	(none)

BD Biosciences

bdbiosciences.com

United States: 800 874 8628 | Europe: 33 33 720 530 | Japan: 81 3 6867 0831 | Latin America/Caribbean: 81 3 6867 0831 | 81 3 6867 0831

For country contact information, visit bdbiosciences.com/contact

Caution: The information obtained herein is not to be construed as a recommendation to use the above product in violation of any patents. BD Biosciences will not be held responsible for patent infringement or other matters that may arise with the use of our products. Purchases that do not include a copy of any rights to which we refer to this product either as a stand-alone product or as a component of another product, are not valid. Product other than the product we sell without the express and authorized use of BD Biosciences and Company is strictly prohibited.

For Research Use Only. Not for use in diagnosis or therapeutic procedures. Not for resale. Unless otherwise noted, BD, BD Logo and all other trademarks are property of BD Biosciences and Company. © 2013 BD



Product Notices

1. Since applications vary, each investigator should titrate the reagent to obtain optimal results.
2. Source of all serum proteins is from USDA inspected abattoirs located in the United States.
3. **Caution:** Sodium azide yields highly toxic hydrazoic acid under acidic conditions. Dilute azide compounds in running water before discarding to avoid accumulation of potentially explosive deposits in plumbing.
4. Please refer to www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols for technical protocols.

References

- Kahan AM, Ptas DR, Thompson CR, Simon MC. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1 alpha nor sufficient for HIF-1 dependent target gene transcription. *J Biol Chem*. 2002; 277(17):15150-15176. [Clone-specific; Western blot]
- Effects of cellular iron deficiency on the formation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis: Iron deficiency and angiogenesis. *Cancer Cell*. 2003; 10(2). [Clone-specific; Western blot]
- Falzone F, Britton S, Nieto L, Sessa R, Muller C. ATR controls cellular adaptation to hypoxia through positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) expression. *Oncogene*. 2013; 32(37):4337-4356. [Clone-specific; Western blot]
- Sanchez-Rivera T, Botella LM, Velasco R, Langa C, Bernabeu C. Snoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor beta pathways. *J Biol Chem*. 2002; 277(46):43799-43805. [Clone-specific; Immunoprecipitation, Western blot]
- Srinivas V, Leachinsky I, Sang N, King NR, Mitroshko A, Cao J. Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway. *J Biol Chem*. 2002; 276(35):21965-21969. [Clone-specific; Immunofluorescence, Western blot]
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(12):5510-5514. [Routledge]
- Wiesener MS, Munchenberger PM, Berger J, et al. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes needed to overexpress of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinoma. *Cancer Res*. 2001; 61(13):5215-5222. [Clone-specific; Immunohistochemistry, Western blot]

BD Biosciences

bdbiosciences.com

United States Canada Europe Japan Asia Pacific Latin America/Caribbean
 877.322.8995 800.979.9438 32.52.720.5550 011.81.85.91.90 65.8887.0633 55.11.5135.9995

For country contact information, visit bdbiosciences.com/contact

Conditions: The information provided herein is not to be construed as a recommendation to use the above product on material of any source. BD Biosciences will not be held responsible for patient enrichment or other outcomes that may occur with the use of our products. Purchases does not include or carry any right to resell or to refer this product either as a stand-alone product or as a component of another product. Any use of this product other than the permission use without the expense will be authorized by BD Biosciences and Company is strictly prohibited.

For Research Use Only: Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for resale.

Unless otherwise noted, BD, BD Logo and all other trademarks are property of BD Biosciences and Company. © 2011 BD

013060 Rev. 3



Page 2 of 2

9.3 ANEXO 3

Datasheet Inhibidor HIF1 α



No trace indicator

SAFETY DATA SHEET

Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Revision date 30-Mar-2016
Version 1.2

1. IDENTIFICATION OF THE SUBSTANCE/PrePARATION AND OF THE COMPANY/UNDERTAKING

Product Identifier

Product Name Hypoxia inducible factor-1 α inhibitor
Product Code SC-205346

Recommended use of the chemical and restrictions on use

For research use only. Not intended for diagnostic or therapeutic use.

Details of the supplier of the safety data sheet

Santa Cruz Biotechnology, Inc.
10410 Finnell Street
Dallas, TX 75220
831.457.3800
800.457.3801
scbt@scbt.com

Emergency telephone number

Chemtec
1.800.424.9300 (Within USA)
+1.703.527.3887 (Outside USA)

2. HAZARDS IDENTIFICATION

This chemical is not considered hazardous by the 2012 OSHA Hazard Communication Standard (29 CFR 1910.122).

Classification

Not a dangerous substance or mixture according to the Globally Harmonized System (GHS)

Label elements

Signal word Not classified

Hazard statements

Symbols/Pictograms Not classified

Precautionary Statements - Prevention

Wash hands thoroughly after handling

Precautionary Statements - Response

IF exposed or concerned: Get medical advice/attention

Hazards not otherwise classified (HNOC)

Hazards not otherwise classified (HNOC)

Not applicable

Other information

Unknown acute toxicity

100% of the mixture consists of ingredient(s) of unknown toxicity.

NFPA	Health hazards	0		HMIS	Health hazards	0	
	Flammability	1				Flammability	1
	Stability	0				Physical hazards	0
	Physical and chemical properties	-				Personal protection	-

3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

CAS No 934593-90-5
Molecular Weight 435.51
Formula C₈H₈NO₂

SC-205346 - Hypoxia inducible factor-1 α inhibitor

Revision date 30-Mar-2018

Chemical Name	CAS No	Weight %	Oral LD50	Dermal LD50	Inhalation LC50
Hypoxia inducible factor-1 α inhibitor	934593-90-5	>98	-	-	-

4. FIRST AID MEASURES

First Aid Measures

General advice	Consult a physician if necessary. Remove to fresh air.
Eye contact	Wash with plenty of water.
Skin Contact	Wash skin with soap and water.
Inhalation	Remove to fresh air if breathing is difficult, give oxygen if not breathing, give artificial respiration
Ingestion	Never give anything by mouth to an unconscious person. Clean mouth with water.

Most important symptoms and effects, both acute and delayed

Symptoms No information available.

Indication of any immediate medical attention and special treatment needed

Note to physicians Treat symptomatically.

5. FIRE-FIGHTING MEASURES

Suitable Extinguishing Media

Suitable Extinguishing Media Use extinguishing measures that are appropriate to local circumstances and the surrounding environment.

Unsuitable Extinguishing Media None.

Specific hazards arising from the chemical

Specific hazards arising from the chemical No information available.

Hazardous combustion products Carbon oxides, Nitrogen oxides (NOx).

Explosion data

Sensitivity to Mechanical Impact No information available.

Sensitivity to Static Discharge No information available.

Protective equipment and precautions for firefighters

Protective equipment and precautions for firefighters As in any fire, wear self-contained breathing apparatus pressure-demand, MSHA/NIOSH (approved or equivalent) and full protective gear.

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Personal precautions, protective equipment and emergency procedures

Personal precautions Ensure adequate ventilation, especially in confined areas.

Environmental precautions

Environmental precautions See Section 12 for additional Ecological information.

Methods and material for containment and cleaning up

Methods for containment Prevent further leakage or spillage if safe to do so.

Methods for cleaning up Use personal protective equipment as required. Cover powder spill with plastic sheet or tarp to minimize spreading and keep powder dry. Take up mechanically, placing in appropriate containers for disposal. Avoid creating dust. Clean contaminated surface thoroughly.

7. HANDLING AND STORAGE

Precautions for safe handling

Advice on safe handling Corrosive hazard. Wear protective gloves/clothing and eye/face protection. Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

Conditions for safe storage, including any incompatibilities

Storage Conditions Keep containers tightly closed in a dry, cool and well-ventilated place. Store at -20 °C.
Incompatible materials None known based on information supplied.

8. EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

Control parameters

Exposure Guidelines This product, as supplied, does not contain any hazardous materials with occupational exposure limits established by the region specific regulatory bodies.

Appropriate engineering controls

Engineering Controls Showers
Eyewash stations
Ventilation systems

Individual protection measures, such as personal protective equipment

Eye/face protection Wear safety glasses with side shields (or goggles).
Skin and Body Protection Wear protective gloves and protective clothing.
Respiratory protection If exposure limits are exceeded or irritation is experienced, NIOSH/MSHA approved respiratory protection should be worn. Positive-pressure supplied air respirators may be required for high airborne contaminant concentrations. Respiratory protection must be provided in accordance with current local regulations.
General Hygiene Considerations Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Physical State Solid
Appearance No information available
Odor No information available

<u>Property</u>	<u>Values</u>
pH	No information available
Melting point/freezing point	No information available
Boiling point	655.48 °C
Flash point	350.22 °C
Density	1.28 g/cm ³
Evaporation rate	No information available
Upper flammability limits	No information available
Lower flammability limit	No information available
Vapor pressure	0
Vapor density	No information available
Specific gravity	No information available
Water solubility	No information available
Solubility in other solvents	No information available
Partition coefficient	No information available
Autoignition temperature	No information available

Decomposition temperature	No information available
Kinematic viscosity	No information available
Explosive properties	No information available
Oxidizing properties	No information available

10. STABILITY AND REACTIVITY

Reactivity	Not applicable
Chemical stability	Stable under recommended storage conditions.
Possibility of Hazardous Reactions	None under normal processing.
Hazardous polymerization	No information available.
Conditions to avoid	Extremes of temperature and direct sunlight.
Incompatible materials	Strong oxidizing agents.
Hazardous Decomposition Products	Carbon oxides, Nitrogen oxides (NOx).

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

Information on likely routes of exposure

Inhalation	No data available.
Eye contact	No data available.
Skin Contact	No data available.
Ingestion	No data available.

Information on toxicological effects

Symptoms	No information available.
----------	---------------------------

Delayed and Immediate effects as well as chronic effects from short and long-term exposure

Chronic Toxicity	No information available.
------------------	---------------------------

Numerical measures of toxicity - Product information

Unknown acute toxicity	100% of the mixture consists of ingredient(s) of unknown toxicity
------------------------	---

12. ECOLOGICAL INFORMATION

Ecotoxicity	May cause long lasting harmful effects to aquatic life
100% of the mixture consists of components(s) of unknown hazards to the aquatic environment.	

Persistence and degradability	No information available.
Bioaccumulation	No information available.
Mobility	No information available.

13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

Disposal of wastes	Disposal should be in accordance with applicable regional, national and local laws and regulations.
Contaminated packaging	Do not reuse container.

14. TRANSPORT INFORMATION

SC-205346 - Hypoxia inducible factor-1 α inhibitor

Revision date 30-Mar-2018

DOT	Not regulated
IMDG	Not regulated
IATA	Not regulated

15. REGULATORY INFORMATION

International Inventories

All of the components in the product are on the following inventory lists
No information available

X - Listed

TSCA - United States Toxic Substances Control Act Section 8(b) Inventory
DSL/NDL - Canadian Domestic Substances List/Non-Domestic Substances List
EINECS/ELINCS - European Inventory of Existing Chemical Substances/European List of Notified Chemical Substances
ENCS - Japan Existing and New Chemical Substances
IECS - China Inventory of Existing Chemical Substances
KECL - Korean Existing and Evaluated Chemical Substances
PICCS - Philippines Inventory of Chemicals and Chemical Substances

US Federal Regulations

SARA 313

Section 313 of Title III of the Superfund Amendments and Reauthorization Act of 1986 (SARA). This product does not contain any chemicals which are subject to the reporting requirements of the Act and Title 40 of the Code of Federal Regulations, Part 372.

SARA 311/312 Hazard Categories

Acute health hazard	No
Chronic Health Hazard	No
Fire hazard	No
Sudden release of pressure hazard	No
Reactive hazard	No

CWA (Clean Water Act)

This product does not contain any substances regulated as pollutants pursuant to the Clean Water Act (40 CFR 122.21 and 40 CFR 122.42).

US State Regulations

California Proposition 65

This product does not contain any Proposition 65 chemicals.

U.S. State Right-to-Know Regulations

This product does not contain any substances regulated by state right-to-know regulations

16. OTHER INFORMATION

Revision note	No information available
---------------	--------------------------

Disclaimer

The information provided in this Material Safety Data Sheet is correct to the best of our knowledge, information and belief at the date of its publication. The information given is designed only as a guidance for safe handling, use, processing, storage, transportation, disposal and release and is not to be considered a warranty or quality specification. The information relates only to the specific material designated and may not be valid for such material used in combination with any other materials or in any process, unless specified in the text.

End of Safety Data Sheet