

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***“CAVEOLINA-1 REDUCE LA TRANSCRIPCIÓN  
DEPENDIENTE DE HIF1 $\alpha$  EN UN MECANISMO  
DEPENDIENTE DEL ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS  
TUMORALES”***

Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al grado de Doctor en Farmacología por:

**CARLOS SANHUEZA MUÑOZ**

Directores de Tesis

Dr. Andrew Quest

Dra. Lisette Leyton

SANTIAGO - CHILE  
2013

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

**CARLOS SANHUEZA MUÑOZ**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día \_\_\_\_\_

**Directores de Tesis:**

Dr. Andrew Quest \_\_\_\_\_

Dra. Lisette Leyton \_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dr. Sergio Lavandero (Presidente) \_\_\_\_\_

Dr. Claudio Hetz \_\_\_\_\_

Dr. Juan Sáez \_\_\_\_\_

Dra. Ilona Concha \_\_\_\_\_

Esta Tesis de Doctorado se realizó en el laboratorio de Comunicaciones Celulares, Centro de Estudios Moleculares de la Célula (CEMC), Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y fue posible gracias al financiamiento otorgado por los siguientes proyectos y becas:

**Financiamiento otorgado a Andrew F. G. Quest.**

Proyecto FONDAP 15010006  
FONDECYT 1090071, 1130250  
Proyecto anillo ACT1111

**Financiamiento otorgado a Lisette Leyton C.**

FONDECYT 1110149  
Iniciativas Milenio #P09-015-F

**Financiamiento otorgado a Carlos Sanhueza Muñoz.**

1. Beca CONICYT de Estudios de Doctorado en Chile, período 2009-2012.
2. Beca CONICYT de Apoyo a la realización de Tesis Doctoral año 2011.
3. Beca CONICYT de Término de Doctorado, año 2012.
4. Beca CONICYT para Asistencia a Congresos Nacionales, años 2010, 2011, 2012.
5. Beca MECESUP UCH074 para financiar estadías cortas en el extranjero, Programa de Doctorado en Farmacología, Universidad de Chile. Estadía realizada en Immune and Gene Therapy Laboratory, Cancer Center Karolinska, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia, bajo la dirección del Dr. Rolf Kiessling, período 1 junio al 31 agosto 2010. Título pasantía “Investigando el rol de HIF1 $\alpha$  en el papel supresor de tumor de Caveolina-1 *in vivo*”.

## PUBLICACIONES

**Caveolin-1 in melanoma progression.** Lorena Lobos -González, Lorena Aguilar , Gonzalo Fernández, **Carlos Sanhueza** and Andrew F.G Quest (2011). Advances in Malignant Melanoma - Clinical and Research Perspectives, April W. Armstrong (Ed.), ISBN: 978-953-307-575-4, InTech.

**Is survivin the potencial Achilles' heel of cancer?.** Alvaro Lladser, **Carlos Sanhueza**, Rolf Kiessling and Andrew F.G. Quest. Advances in Cancer Research, Vol 111, Oxford: Academic Press; 2011, p. 1-38. ISBN:978-0-12-385524-4.

**The Caveolin-1 connection to cell death and survival.** Quest AF, Lobos-Gonzalez L, Nunez S, **Sanhueza C**, Fernandez JG, Aguirre A, Rodriguez D, Leyton L, Torres V. Curr Mol Med. 2013 Feb 1;13(2):266-81

**Helicobacter pylori induced loss of survivin and gastric cell viability is attributable to secreted bacterial gamma glutamyl transpeptidase activity.** Manuel Valenzuela, Denisse Bravo, Jimena Canales, **Carlos Sanhueza**, Natalia Diaz, Oscar Almarza, Héctor Toledo, Andrew F. Quest The Journal of Infectious Diseases 2013.

**Tumor suppression by Caveolin-1 is linked to inhibition of transcription by HIF-1 $\alpha$  and nitric oxide synthase activity.** Sanhueza C., Avalos Y., Silva P., Diaz M.I., Valenzuela M., Lladser A., Kiessling R., Leyton L., Quest A. **Manuscrito en preparación**

## PRESENTACIONES EN CONGRESOS

**Caveolin-1 reduces HIF1 $\alpha$  dependent transcription and target gene expression in cancer via mechanism involving nitric oxide.** Sanhueza C., Silva P., Diaz M.I., Avalos Y., Leyton L., Quest A. XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile 2012, Puerto Varas 2 al 5 de octubre. Presentación oral.

**Caveolin-1 inhibits transcription by hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  in tumor cells.** Sanhueza C., Lladser, A., Valenzuela M., Nuñez S., Diaz M.I., Leyton L., Quest A.F.G. XXV Annual Meeting of Chilean Society for Cell Biology 2011, Puerto Varas November, 1<sup>st</sup> – 5<sup>th</sup>. Presentación oral.

**Regulation of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  by Caveolin-1.** Sanhueza C. Diaz M, Leyton L, Quest AFG. XXIV Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology 2010. Pucón, 1 al 5 de noviembre 2010 (Poster).

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer cariñosamente a mi familia (Diego, Lorena y Mamá) por su invaluable ayuda, paciencia, cariño y colaboración que me han permitido realizar este trabajo. Sin ustedes no habría sido posible.

También agradezco a mis mentores y directores de tesis, Doctores Andrew Quest y Lisette Leyton, por su confianza, apoyo entregado y su guía que fue fundamental para mi formación académica, cómo para el desarrollo de este proyecto. Además, quisiera agradecer a los miembros de la Comisión, Dra. Ilona Concha, Dr., Sergio Lavandero, Dr., Claudio Hetz y Dr. Juan Carlos Sáez, por su valiosa contribución en el desarrollo de mi formación académica y de la tesis.

También quisiera agradecer muy afectuosamente a María Inés Díaz, Yennifer Ávalos y Patricio Silva quienes con mucho entusiasmo, ánimo, compromiso, amistad y experimentos (MID: muestras para hacer PCR en tumores; YA: vida media y algunos western blot; PS: evaluar dador de NO, WB para pERK y pCav-1) contribuyeron a este trabajo. Además, quisiera manifestar mis agradecimientos Álvaro Lladser por su ayuda con los ensayos con ratones inmunosuprimidos, Adam Aguirre por su ayuda con los experimentos de viabilidad celular, Sergio Núñez por su empeño en los ensayos de EMSA, Vicente Torres por ayudarme a hacer los experimentos de ciclo celular, Pamela Orellana y Ruth Mora por su excelente colaboración en los ensayos de formación de tumores. Gracias por su amistad y su ayuda.

Por supuesto no puedo dejar de agradecer a mis amigos Adam Aguirre, Sergio Núñez, Álvaro Álvarez, María Inés Díaz, Rina Ortiz, Yennifer Ávalos, Patricio Silva, Jimena Canales, Hery Urra, Hernán Huerta, Diego Rodríguez, quienes hicieron muy grato estar en el laboratorio, y ayudaron al desarrollo de mi tesis, muchas veces con sus valiosos consejos y otras veces con experimentos. Un especial agradecimiento a mi amigo Manuel Valenzuela, quien confió en mí

desde un comienzo, dio palabras de apoyo y me ayudo una enormidad desde el comienzo de la tesis y durante mi estadía. Muchas gracias a ustedes.

Quisiera agradecer muy especialmente a los amigos del barrio Milene Kong, Álvaro Álvarez, Areli Cárdenas, Darío Vázquez y Raúl Lagos por estos años de paciente compañía (en especial Milene), consejos y buena onda que compartimos. A todos ustedes mis sinceros agradecimientos.

Quiero agradecer a los miembros del laboratorio Lilian Corona, Gonzalo Fernández, Víctor Díaz, Francesca Burgos, Claudia Calderón, Jorge Díaz Fuentes, Carolina Lagos, Paulina Ormazábal, Horacio Maldonado, Pablo Mendoza, Catalina Soto, Edgardo Rojas, Valeska Cifuentes, Rodrigo Arriagada, Lorena Lobos y Lorena Aguilar, por compartir conmigo durante estos años.

Quisiera agradecer muy afectuosamente al Dr. Álvaro Lladser, quién hizo posible la realización de la pasantía en Suecia y quién durante mi estadía me hizo sentir como en casa. Además quisiera agradecer a Cristián Ibarra, Claudia Aravena, Valentina Díaz y Simón Ibarra quienes me recibieron en su casa, me hicieron parte de su familia y me sentí como en casa a pesar de estar al otro lado del mundo. Para ellos mis más sinceros agradecimientos.

También quiero manifestar un cordial agradecimiento al Dr. Rolf Kiessling y a los miembros de su laboratorio Helena Tufvesson, Riki Okita, Isabel Poschkle, Mao Yumen, Erick Wennerberg, Lenna-Maria Carlson del Immune and Gene Therapy Laboratory, Cancer Center Karolinska, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia, por su cálida recepción y acogida durante la pasantía que realice, Tack så mycket!.

Quiero agradecer a quienes me ayudaron a iniciar la tesis como, El Dr. Sergio Lavandero (Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile), ya que en su laboratorio hice los primeros experimentos de hipoxia con

ayuda de la Dra. Zully Pedroso. También quiero agradecer a las Dras., Carmen Romero, Margarita Vega, Susana Quezada, Verónica Tapia (Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción, Hospital Clínico Universidad de Chile) y al Dr. Mauro Parra (Hospital Clínico Universidad de Chile), quienes me permitieron realizar experimentos de hipoxia en su laboratorio.

También quiero agradecer a quienes con su generosidad, contribuyeron con materiales que fueron esenciales para el desarrollo de esta tesis. A la Dra., Kaye Williams (University of Manchester, Reino Unido), Dr. Salvador Moncada (University College London, Londres, Reino Unido), por la donación de los plasmidios pGL3-HRE y HIF1 $\alpha$  wt. Al Dr., Sergio Lavandero, por la donación del plasmidio pON y el anticuerpo anti-NOS3. Finalmente, quisiera agradecer al Dr., Luis Sobrevia (Centro de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile) por donar el inhibidor de arginasa BEC.

## INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	5
INDICE GENERAL .....	8
INDICE FIGURAS SUPLEMENTARIAS .....	13
ABREVIATURAS.....	14
RESUMEN.....	16
SUMMARY .....	18
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>20</b>
1. Cáncer .....	20
2. Hipoxia.....	22
Origen de la hipoxia en los tumores.....	22
Adaptación a la hipoxia .....	24
3. Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$ (HIF1 $\alpha$ ).....	26
Regulación de HIF1 $\alpha$ .....	29
4. Caveolina-1 .....	31
Caveolina-1 y cáncer.....	33
Antecedentes del Laboratorio .....	34
Caveolina-1 y HIF1 $\alpha$ .....	34
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>36</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>38</b>
1. Materiales .....	38
1.1 Reactivos.....	38
1.2 Fármacos.....	38
2. Anticuerpos.....	40
3. Cultivo celular y Condiciones experimentales.....	40

3.1 Cultivo líneas celulares .....	40
3.2 Experimentos en hipoxia .....	41
4. Plasmidios y transfecciones .....	42
4.1 Plasmidios .....	42
4.2 Transfecciones transitorias .....	43
4.3 Transfecciones estables.....	44
5. Extracción de proteínas y western blot .....	45
5.1 Obtención de los extractos totales de proteínas .....	45
5.2 Obtención de extractos de proteínas citoplasmáticas y nucleares .....	46
5.3 Western blot .....	47
5.4 Determinación de la vida media de HIF1 $\alpha$ .....	47
6. Inmunofluorescencia indirecta, cuantificación de imágenes .....	48
6.1 Inmunofluorescencia indirecta.....	48
6.2 Cuantificación de las imágenes.....	49
6.3 Deconvolución de las imágenes .....	49
7. Cuantificación del mRNA de genes blanco de HIF1 mediante RT-PCR semicuantitativo y PCR en tiempo real.....	50
7.1 Extracción RNA desde cultivos celulares.....	50
7.2 Tratamiento con DNAsa y transcripción reversa.....	50
7.3 Reacción de PCR semicuantitativo .....	51
7.4 Reacción de PCR en tiempo real (qPCR).....	52
8. Ensayos de reporteros .....	52
8.1. Medición de la actividad transcripcional de HIF .....	52
9. Ensayos de viabilidad y ciclo celular.....	53
9.1 Determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo .....	53
9.2 Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo.....	53
10. Ensayos <i>in vivo</i> con ratones inmunosuprimidos SCID-Beige y análisis del tejido tumoral. ...	54
10.1 Ensayos de formación de tumores en ratones inmunosuprimidos SCID-Beige.....	54
10.2 Obtención de extractos totales de proteínas a partir de tumores de células HT29(US). .	55

10.3 Obtención de líneas celulares <i>ex-tumor</i> desde tumores de células HT29(US) .....	55
11 Ensayos <i>in vivo</i> con ratones inmunocompetentes C57BL/6 y análisis del tejido tumoral. ....	56
11.1 Ensayos de formación de tumores en ratones inmunocompetentes C57BL/6.....	56
11.2 Extracción de RNA desde tumores formados por células B16F10.....	56
12. Análisis estadístico .....	57
<b>RESULTADOS</b> .....	58
<b>SECCIÓN 1</b> .....	58
Objetivo Específico 1: Determinar si Caveolina-1 inhibe la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$ en hipoxia. ....	58
1.1 Determinar el efecto de la presencia de Caveolina-1 en la actividad de HIF en hipoxia ...	58
1.2 Evaluar si la presencia de Caveolina-1 altera los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$ y la participación del dominio de andamiaje en el efecto inhibitorio sobre HIF1 $\alpha$ .....	63
1.3 Evaluar si la presencia de Caveolina-1 altera la translocación de HIF1 $\alpha$ al núcleo .....	69
1.4 Determinar el efecto de hipoxia en la viabilidad y ciclo celular .....	74
<b>SECCIÓN 2</b> .....	77
Objetivo Específico 2: Evaluar la participación de las enzimas óxido nítrico sintasas en la inhibición de HIF1 $\alpha$ por Caveolina-1.....	77
2.1 Identificar la isoforma de NOS asociada al efecto inhibitorio de Caveolina-1 .....	77
2.2 Evaluar el efecto de dador de NO .....	80
<b>SECCIÓN 3</b> .....	85
Objetivo Específico 3: Evaluar <i>in vivo</i> si la inhibición de HIF1 $\alpha$ y NOS contribuyen a su papel supresor de tumores de Caveolina-1 .....	85
3.1 Determinar si la sobreexpresión de HIF1 $\alpha$ previene efecto supresor de tumores de Caveolina-1. ....	85
3.2 Determinar los niveles de expresión de genes blanco de HIF1 $\alpha$ en tumores derivados de células transfectadas con Caveolina-1. ....	88
3.3 Evaluar el efecto de L-NAME sobre la acción supresora de tumores de Caveolina-1.....	92
Resumen de los principales resultados .....	95
<b>DISCUSIÓN</b> .....	97
1.1. Caveolina-1 reduce la actividad dependiente de HIF1 $\alpha$ en hipoxia.....	100

1.2 La inhibición de la actividad dependiente de HIF1 $\alpha$ involucra la acción de sintasas de óxido nítrico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	101
1.3 NOS3 y Caveolina-1.....	104
1.4. HIF1 $\alpha$ y el efecto supresor de tumores de Caveolina-1.....	105
1.5 Caveolina-1 y regulación de HIF1 $\alpha$ .....	106
i) Niveles proteicos de HIF1 $\alpha$ .....	107
ii) Afectar la translocación al núcleo.....	108
1.6 Vías alternativas para la inhibición de HIF1 $\alpha$ por Caveolina-1 .....	109
1.7. Efecto de la hipoxia en la viabilidad celular .....	109
1.8 Limitaciones de nuestros hallazgos .....	111
i) Condiciones experimentales y microambiente tumoral .....	111
ii) NO y NOS3.....	112
i) Sintasas de óxido nítrico y arginasa .....	112
ii) Factores inducibles por hipoxia .....	114
<b>CONCLUSIONES</b> .....	116
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	117
<b>ANEXOS</b> .....	124
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	131

## INDICE FIGURAS

Figura 1: Características adquiridas por una célula tumoral.....	20
Figura 2 Mecanismo de activación de HIF1 $\alpha$ en hipoxia. ....	27
Figura 3: Caveolina-1 y su acción supresora de tumores.....	33
Figura 4: Caracterización de los niveles proteicos de Caveolina-1 y E-Cadherina en diferentes líneas celulares.....	59
Figura 5: Efecto de la presencia de Caveolina-1 sobre la actividad transcripcional de HIF en células HT29(US). ....	60
Figura 6: Expresión de genes blancos de HIF1 $\alpha$ en células HT29(US) en hipoxia.....	61
Figura 7: Efecto del silenciamiento de la Caveolina-1 endógena en células MDA-MB231 sobre la actividad transcripcional de HIF en hipoxia.....	63
Figura 8: Niveles proteicos de HIF1 $\alpha$ en células HT29(US) y MDA-MB231 en hipoxia. ....	64
Figura 9: Vida Media de HIF1 $\alpha$ . ....	65

Figura 10: Ensayo de Captación de Péptido derivado del dominio de andamiaje de Caveolina-1..	67
Figura 11: Efecto del péptido AP-CSD sobre la actividad transcripcional de HIF en células HT29(US) en hipoxia. ....	68
Figura 12: Distribución subcelular de HIF1 $\alpha$ en células HT29(US) en hipoxia. ....	70
Figura 13: Localización celular de HIF1 $\alpha$ y Caveolina-1 en células expuestas a hipoxia por 24 h..	71
Figura 14: Localización celular de HIF1 $\alpha$ y Caveolina-1 en células expuestas a hipoxia por 4 h....	73
Figura 15: Efecto de la hipoxia sobre la viabilidad celular de HT29(US). ....	74
Figura 16: Efecto de la hipoxia sobre la distribución del ciclo celular de HT29(US). ....	75
Figura 17: Efecto de los inhibidores de las isoformas de óxido nítrico sintasas, L-NAME, 1400W y L-NIO sobre la actividad de HIF en células HT29(US) en hipoxia. ....	78
Figura 18: NOS3 se expresa en células HT29(US). ....	79
Figura 19: NOS3 colocaliza con Caveolina-1 en células HT29(US). ....	80
Figura 20 Efecto del dador de NO, DETA/NO sobre la estabilización de HIF1 $\alpha$ . ....	81
Figura 21: Efecto del dador de NO, DETA/NO sobre la actividad de HIF en células HT29(US) en hipoxia. ....	82
Figura 22: Efecto del inhibidor de arginasa (BEC) sobre la actividad de HIF en células HT29(US) en hipoxia. ....	84
Figura 23: Formación de tumores en ratones SCID-Beige inoculados con células HT29(US). ....	86
Figura 24: Formación de tumores en ratones SCID-Beige inoculados con células HT29(US) (M1 y C14) establemente transfectadas con HIF1 $\alpha$ . ....	87
Figura 25: Formación de tumores en ratones C57BL/6 inoculados con células B16F10(Mock) y (Cav-1). ....	89
Figura 26: Análisis de correlación expresión del mRNA de VEGF y tamaño tumoral. ....	90
Figura 27: Niveles del mRNA de VEGF en tumores al día 15 post-inoculación ratones C57BL/6 inoculados con células B16F10(Mock) y (Cav-1). ....	91
Figura 28: Formación de tumores en ratones C57BL/6 inoculados con células B16F10(Mock) y (Cav-1) tratados con L-NAME. ....	93
Figura 29: Expresión de VEGF en tumores en ratones C57BL/6 inoculados con células B16F10(Mock) y (Cav-1) tratados con L-NAME. ....	94
Figura 30: Caveolina-1 reduce la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$ y la expresión de VEGF <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> involucrando la inhibición de la síntesis de NO. ....	100
Figura 31: Eventos asociados a la activación de HIF1 $\alpha$ en donde Caveolina-1 pudiese inhibir a HIF1 $\alpha$ . ....	106

## INDICE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura Suplementaria 1: La presencia de Caveolina-1 reduce la actividad transcripcional de HIF en células HEK293T.....	117
Figura Suplementaria 2: Efecto de la presencia de Caveolina-1 sobre la actividad transcripcional de HIF en células B16F10 establemente transfectadas con el gen reportero de HIF pcDNA-HRE-Luc. ....	118
Figura Suplementaria 3: La presencia de Caveolina-1 no reduce los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$ en células HEK293T expuestas a hipoxia.....	119
Figura Suplementaria 4: Formación de tumores en ratones C57BL/6 inoculados con células B16F10(Mock) y (Cav-1) tratados con L-NAME. ....	120
Figura Suplementaria 5: Efecto de la presencia de Caveolina-1 sobre la actividad luciferasa del vector de expresión constitutiva pCMV-luc. ....	121
Figura Suplementaria 6: La presencia de Caveolina-1 no afecta la activación de ERK en hipoxia. ....	122
Figura Suplementaria 7: La hipoxia aumenta la fosforilación de Caveolina-1.....	123

## INDICE TABLAS

Tabla 1: Secuencia aminoacídica de los péptidos AP-Scramble (AP-SC) y AP-Dominio de Andamiaje de Caveolina-1 (AP-CSD). ....	39
Tabla 2: Listado de Partidores y Tm utilizados para PCR convencional y qPCR.....	51
Tabla 3: Distribución del ciclo celular en células HT29(US) en hipoxia.....	76

## ABREVIATURAS

AP-CSD: péptido derivado del dominio de andamiaje de Caveolina-1

AP-SC: péptido control secuencia aleatoria.

BAL: benzamidina-antipaína-leupeptina

BCA: ácido bicincoínico

BEC: S-(2-Boronoethyl)-L-cysteine, HCl

BSA: seroalbúmina de bovino

DABCO: diazobicciclooctano

DETA/NO: aducto oxido nítrico/dietilenetriamina

DFO: Deferroxamina

DNA: ácido desoxirribonucleico

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

FBS: suero fetal bovino

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GFP: proteína fluorescente verde

h: Hora

HIF: Factor inducible por hipoxia

HRE: Elementos de Respuesta a hipoxia

HRPO: peroxidasa de rabanito

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido

kDa: kilodaltons

kg: kilogramo

L-NAME: N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride

L-NIO: L-N<sup>5</sup>-(1-Iminoethyl)ornithine, Dihydrochloride

mg: milígramo

mL: mililitro.

mM: milimolar

min: minutos

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

NaF: Fluoruro de sodio

NO: óxido nítrico

NOS: sintasa de óxido nítrico

ONPG: 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido

pb: Pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

ROI: región de interés óptico.

ROS: especies reactivas del oxígeno

RT-PCR: transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa

SDS: dodecil sulfato de sodio

SEM: error estándar de la media

$\mu$ g: microgramo

$\mu$ L: microlitro

$\mu$ m: micrómetro

$\mu$ M: micromolar

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

1400W: N-(3-Aminomethyl)benzylacetamide, 2HCl

## RESUMEN

El cáncer es la 2° causa de muerte en Chile. El desarrollo del cáncer se ha propuesto que es consecuencia de la pérdida de función de los genes supresores de tumores beneficiando la acción de los oncogenes (genes que promueven el crecimiento de tumores). La activación del Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) en un ambiente reducido en oxígeno (hipoxia) o por óxido nítrico (NO), permiten la proliferación y adaptación metabólica de las células tumorales. Por otro lado, Caveolina-1 es una proteína de andamiaje, que ha sido descrita como un supresor de tumores y promotor de metástasis. Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que E-Cadherina y Caveolina-1 actúan cooperativamente en supresión de tumores *in vivo*. Sin embargo, Caveolina-1 suprime el crecimiento de tumores incluso en células carentes de E-Cadherina, de un modo menos eficiente. La isoforma endotelial de la sintasa de óxido nítrico (NOS3), es uno de los blancos inhibidos por Caveolina-1 más ampliamente descritos en la literatura, que recientemente ha sido implicado en mantenimiento tumoral. Cómo la inhibición de NOS mediada por Caveolina-1 afecta la activación de HIF1 $\alpha$  contribuyendo a la función supresora de tumores de Caveolina-1 en ausencia de E-Cadherina, aún no ha sido evaluado. En este trabajo, evaluamos la posibilidad que la inhibición de NOS por Caveolina-1 pueda reducir la transcripción dependiente de HIF1 $\alpha$  y contribuir así a la función supresora de tumores de Caveolina-1. Líneas celulares transfectadas con un plasmidio que codifica para Caveolina-1 [HT29(US), B16F10 y HEK293T] o células en que la expresión endógena de Caveolina-1 fue disminuida utilizando un shRNA [MDA-MB231], fueron tratadas en hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 4-24 h). La actividad transcripcional de HIF, la expresión de genes blanco de HIF1 $\alpha$ , la distribución subcelular de HIF1 $\alpha$ , Caveolina-1 y NOS3, fueron evaluados mediante ensayos de gen reportero, RT-PCR/qPCR, Western Blot y microscopía confocal, respectivamente. Además, se realizaron ensayos de formación de tumores en ratones inmunosuprimidos SCID-Beige y en ratones inmunocompetentes C57BL/6. Los principales hallazgos de este trabajo fueron, que Caveolina-1 reduce la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  y la expresión de VEGF en hipoxia en las líneas celulares analizadas. Además, la reducción del

crecimiento tumoral de células de melanoma murino B16F10(Cav-1) fue coincidente con la reducción de la expresión del mRNA de *vegf in vivo*. El tratamiento de las células con el dador de NO (DETA/NO) o el inhibidor de arginasa BEC, previnieron la inhibición de la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  mediada por Caveolina-1. Además, la inhibición de NOS con L-NAME o con el inhibidor selectivo de NOS3, L-NIO, reducen el incremento en la actividad transcripcional de HIF en hipoxia. *In vivo*, la sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  en células HT29(US)(Cav-1) revierte la supresión de tumores mediada por Caveolina-1 en ratones SCID-Beige. Finalmente, el tratamiento sistémico de ratones C57BL/6 con L-NAME, reduce el volumen tumoral a niveles comparables con los observados en los tumores formados por células B16F10(Cav-1). En resumen, nuestros resultados sugieren que la inhibición de NOS3 mediada por Caveolina-1 reduce la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  y la expresión de sus genes blanco, *in vitro* e *in vivo*, contribuyendo a la función supresora de tumores de Caveolina-1 en ausencia de E-Cadherina.

## SUMMARY

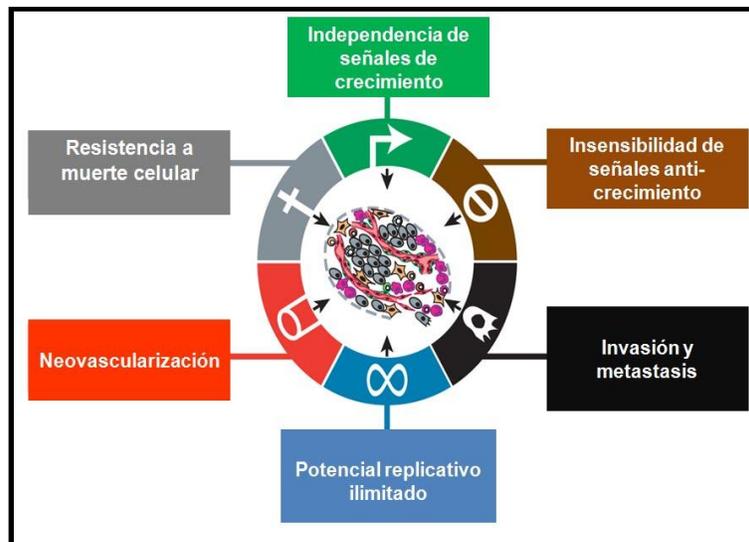
Cancer, the 2nd most important cause of death in Chile, is thought to develop due to loss of tumor suppressor and gain of oncogene function. Activation of Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) in the low oxygen environment (hypoxia) present in tumors or by nitric oxide (NO), favors cancer cell proliferation and metabolic adaptation. Caveolin-1 is a scaffolding protein that reportedly functions both as a tumor suppressor and promoter of metastasis. Results from this laboratory have shown that E-cadherin and Caveolin-1 cooperate in tumor suppression *in vivo*. However, Caveolin-1 expression suppresses tumor growth even in cancer cells lacking E-cadherin, albeit less efficiently. The endothelial isoform of nitric oxide synthase (NOS3), one of the best-established targets for inhibition by Caveolin-1, has recently been implicated in maintenance of tumor growth. Whether, Caveolin-1-mediated NOS inhibition may impact on HIF1 $\alpha$  activation and account for tumor suppression by Caveolin-1 in the absence of E-cadherin has not been yet assessed. Here, we evaluated the possibility that NOS inhibition by Caveolin-1 may reduce HIF1 $\alpha$  - dependent transcription and thereby contribute to the tumor suppressor function of Caveolin-1. Cell lines transfected with a Caveolin-1-encoding plasmid [HT29(US), B16F10 and HEK293T] or cells where endogenous Caveolin-1 protein levels [MDA-MB231] were reduced using shRNA-technology, were exposed to hypoxia (1% O<sub>2</sub>, 4-24 h). In these cells, HIF transcriptional activity, HIF1 $\alpha$  target-gene expression, HIF1 $\alpha$ , Caveolin-1 and NOS3 protein levels and subcellular localization were evaluated by gene reporter assays, RT-PCR/qPCR, Western Blot and confocal microscopy, respectively. Tumor forming capacity was evaluated in immunodeficient SCID-Beige and immunocompetent C57BL/6 mouse strains. The main findings of this study are that Caveolin-1 reduced HIF1 $\alpha$  transcriptional activity and VEGF expression in hypoxia *in vitro* in all cell lines. Also, reduced tumor growth of B16F10(Cav-1) melanoma cells in C57BL/6 mice correlated with reduced *vegf* gene expression *in vivo*. Treatment of cells with the NO donor (DETA/NO) or arginase inhibition with BEC, prevented Caveolin-1-mediated inhibition of HIF1 $\alpha$  transcriptional activity. Furthermore, NOS

inhibition with L-NAME or selective NOS3 inhibition with L-NIO, reduced hypoxia-enhanced HIF transcriptional activity. *In vivo* HIF1 $\alpha$  overexpression in HT29(US)(Cav-1) cells reversed tumor suppression due to Caveolin-1 in SCID-Beige mice. Finally, systemic treatment of C57BL/6 mice with L-NAME, reduced tumor volumes to levels comparable to those observed for tumors formed by B16F10(Cav-1) cells. In summary, our observations suggest that Caveolin-1-mediated inhibition of NOS3 activity reduces HIF1 $\alpha$  transcriptional activity and target gene expression, both *in vitro* and *in vivo*, and that this ability contributes to tumor suppression by Caveolin-1 in the absence of E-cadherin.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte en nuestro país por enfermedades crónicas no transmisibles, causando la muerte de 24.000 personas al año (Minsal, 2010). El desarrollo del cáncer se ha asociado al desbalance entre los genes supresores de tumores (genes que se oponen al crecimiento tumoral) y los oncogenes (genes que favorecen el crecimiento tumoral). Este desbalance sumado a cambios epigenéticos, permiten que una célula normal se transforme progresivamente en una célula tumoral incipiente y finalmente lleva a la formación de un tumor. Se ha postulado que la célula tumoral adquiere al menos 6 capacidades (**Figura 1**), que incluyen presentar un potencial replicativo no regulado, hacerse independiente de señales de crecimiento e insensible a señales anti-crecimiento, evadir la apoptosis, producir la neovascularización del tejido (angiogénesis) e invadir y formar metástasis en otros tejidos (Hanahan and Weinberg, 2000).



**Figura 1: Características adquiridas por una célula tumoral.**

De acuerdo al modelo de Hanahan y Weinberg, la adquisición de las características indicadas en la figura permite la transformación celular. El detalle de cada característica se explica en el texto. Modelo adaptado de (Hanahan and Weinberg, 2000).

Las células tumorales utilizan distintas estrategias con el fin de potenciar su capacidad proliferativa. Se ha visto que las células tumorales alteran las proteínas reguladoras del ciclo celular y modifican la estructura del DNA para adquirir un potencial de replicación ilimitado. Por otro lado, para sostener la proliferación celular, las células tumorales, frecuentemente estimulan su proliferación a través de la estimulación autocrina de sus receptores de factores de crecimiento, haciéndose independientes de señales pro-crecimiento. A su vez, las células tumorales modifican el balance entre las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas a favor de las últimas y con ello se hacen más resistentes a la muerte celular. Además, evaden la acción de los supresores de crecimiento (señales que regulan negativamente la proliferación celular). Muchas de estas señales anti-crecimiento son dependientes de la acción de los genes supresores de tumores (genes que se oponen a la acción de los oncogenes), los cuales frecuentemente son inactivados en cáncer. En tumores, la activación de los oncogenes Ras y Myc permiten activar la proliferación celular, mientras que los supresores de tumores RB (retinoblastoma), TP53 y Caveolina-1, son frecuentemente inactivados. Caveolina-1, es un supresor de tumores que se encuentra disminuido en cáncer y es el foco de estudio de este trabajo (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011; Quest et al., 2008; Williams and Lisanti, 2005).

Por otro lado, para mantener un constante suministro de nutrientes como oxígeno y permitir la eliminación del dióxido de carbono, las células tumorales inducen la angiogénesis del tejido, proceso que lleva a la formación de nuevos vasos sanguíneos (Hanahan and Weinberg, 2011). También, las células tumorales adquieren la capacidad de invadir el tejido vecino, lo que le permite ingresar a los vasos sanguíneos, donde a continuación las células pueden translocarse a un nuevo tejido, colonizándolo y formando otro foco tumoral, en un proceso conocido como metástasis (Chaffer and Weinberg, 2011).

La proliferación celular descontrolada, es una de las principales características de una célula tumoral. Esta condición, obliga a las células a adaptar su proliferación y

su metabolismo, de manera de obtener energía para el crecimiento celular y la proliferación. Por ejemplo, las células pre-malignas del cáncer de mama, evolucionan a partir de conductos que se encuentran separados de los vasos sanguíneos a través de la membrana basal. La separación entre las células y los vasos sanguíneos resulta en la reducción del suministro de oxígeno (fenómeno conocido como hipoxia) y acidosis, debido a la utilización de la vía glicolítica como fuente principal de energía. Por lo tanto, además de las ventajas proliferativas que presentan las células, estas deben adaptarse a las condiciones hostiles del microambiente tumoral como la hipoxia y la acidosis (Gillies and Gatenby, 2007). En este trabajo, nos enfocaremos en la participación del factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), el principal mediador responsable de la adaptación de las células a la hipoxia en la acción supresora de tumores de Caveolina-1.

## **2. Hipoxia**

### **Origen de la hipoxia en los tumores**

En condiciones normales, los distintos órganos y tejidos son irrigados con una cantidad de oxígeno constante, lo que se conoce como fisioxia o hipoxia fisiológica, cuyo valor es característico para cada tejido. Desde un punto de vista operacional, se considera normoxia a la presión de oxígeno presente en los cultivos celulares (19,95%), valor muy cercano al oxígeno atmosférico (21% O<sub>2</sub>), hipoxia a una fracción de la concentración de oxígeno de fisioxia y anoxia a la ausencia de oxigenación del tejido (Carreau et al., 2011). En nuestro organismo, la tráquea, es el tejido con mayor oxigenación (19,7% O<sub>2</sub>), mientras que el músculo es el tejido que presenta una menor concentración de O<sub>2</sub> (3,8%) (Carreau et al., 2011). Sin embargo, bajo condiciones patológicas como cáncer, enfermedades cardiovasculares y ataques cerebrales, la oxigenación relativa de los tejidos se ve profundamente alterada (Carreau et al., 2011; Koh and Powis, 2012).

En pacientes con cáncer, mediante el uso de electrodos modificados, tomografía de emisión de positrones o polarografía se ha cuantificado la hipoxia en tumores, detectándose regiones hipóxicas en tumores de pacientes con cáncer de próstata (Movsas et al., 2001), páncreas (Koong et al., 2000), cabeza y cuello (Becker et al., 1998), mama (Vaupel et al., 1991), riñón (Lawrentschuk et al., 2005) e hígado (Vaupel et al., 2007) entre otros. La presencia de estas regiones hipóxicas en tumores se considera un factor de mal pronóstico, debido a que la hipoxia estimula la selección y expansión clonal de las células con un fenotipo más maligno, por lo que se asocia a resistencia a la quimioterapia, metástasis y reducción en la expectativa de vida de los pacientes (Denko et al., 2003; Keith et al., 2011; Vaupel, 2008; Vaupel and Harrison, 2004; Wilson and Hay, 2011).

En tumores, la hipoxia es causada por una deficiencia en el transporte de oxígeno, que resulta del desbalance entre el consumo y la entrega del oxígeno, debido a la elevada tasa de proliferación de las células que conforman el tumor (Pries et al., 2010). Recientemente, utilizando resonancia paramagnética de electrones (EPRI), se ha demostrado, *in vivo*, que la hipoxia es un evento dinámico en tumores. Dentro de un tumor, se distinguen dos zonas hipóxicas, una región de hipoxia crónica, usualmente el centro del tumor y un área del tumor donde se alternan ciclos de hipoxia/reoxigenación (hipoxia cíclica), producidas por una perfusión sanguínea intermitente del tejido (Yasui et al., 2010).

Frecuentemente, se observan alteraciones en los vasos sanguíneos tumorales que contribuyen a acentuar la hipoxia en los tumores. En una vasculatura normal, los vasos sanguíneos se organizan de un modo ordenado y jerárquico, de manera que los vasos sanguíneos están lo suficientemente próximos entre ellos, asegurando un suministro adecuado de nutrientes y oxígeno a las células del tejido. Contrariamente en un tumor, los vasos no se ordenan ni presentan jerarquía y tienen paredes capilares frágiles. Además, en un vaso tumoral, el flujo sanguíneo se encuentra retardado y frecuentemente los vasos están muy distantes entre sí, acentuando la hipoxia en el tumor (Brown and Wilson, 2004).

Distintos factores contribuyen a la alteración del transporte de oxígeno y nutrientes observada en los vasos sanguíneos tumorales. La orientación azarosa que adoptan los vasos, permite la formación de derivaciones de los vasos tumorales. Estas derivaciones, son vías sanguíneas cortas que poseen un alto flujo sanguíneo que forman un “bypass” sobre otros vasos tumorales, reduciendo la entrega de oxígeno en el tejido (Pries et al., 2010). Además, la baja densidad vascular, sumada a las limitaciones que presenta la difusión transversal del oxígeno y el endurecimiento que sufren los eritrocitos hipóxicos, se traducen en un aumento de la viscosidad de la sangre, reduciendo aún más el flujo sanguíneo lo que genera un lecho extravascular hipóxico (Dewhirst et al., 2008).

La normalización de la hipoxia tumoral mediante la expresión ectópica de mioglobina (proteína especializada en el transporte de oxígeno) o induciendo la reorganización de las células endoteliales tumorales con inositol trispirofosfato, reduce fuertemente el crecimiento tumoral y suprime la formación de metástasis en modelos animales (Galluzzo et al., 2009; Kieda et al., 2013). Por lo tanto, estos antecedentes resaltan la complejidad de la hipoxia intratumoral y como la intervención de la hipoxia previene la progresión tumoral.

### **Adaptación a la hipoxia**

La respuesta celular a la hipoxia es compleja ya que depende tanto de la severidad, como de la duración de la hipoxia, involucrando cambios a nivel transcripcional y traduccional. Durante la hipoxia, distintas vías de señalización celular convergen para adaptar a las células a vivir en esta condición. El principal mediador intracelular responsable de la adaptación a la hipoxia es el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF), cuya función es modificar múltiples procesos celulares como adaptar el metabolismo celular, regular el pH, promover la neovascularización del tejido e inducir un fenotipo migratorio e invasivo de las células (Semenza, 2011). Por otro lado, la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), a través de sensores presentes en la superficie del retículo endoplasmático (IRE1, PERK), permite mantener la homeostasis del retículo

endoplasmático durante la hipoxia severa (anoxia) (Rzymiski et al., 2010; Wouters and Koritzinsky, 2008). Además, la inhibición de mTOR (mechanistic target of rapamycin) en hipoxia gatilla autofagia, un proceso catabólico que se induce bajo estrés celular para la obtención de energía (Choi et al., 2013). La autofagia juega un rol importante en la degradación de proteínas de vida media prolongada, degradación de organelos y en la adaptación de las células a la privación de nutrientes que se induce en hipoxia (Mazure and Pouyssegur, 2009). Por ende, la respuesta celular a la hipoxia es compleja, donde distintos mecanismos convergen para adaptar el metabolismo como la homeostasis celular bajo esta condición.

La activación de las distintas vías de adaptación a hipoxia parece depender tanto de la severidad como de la duración de la hipoxia. Se ha visto que tanto la activación de HIF como la inducción de la autofagia ocurre en un rango amplio de tensión de oxígeno (desde anoxia [ $O_2 < 0,1\%$ ] hasta hipoxia moderada [ $O_2 \ 3\%$ ]) (Koumenis and Wouters, 2006; Wilson and Hay, 2011), mientras que la activación del UPR parece ser más restringida a anoxia (Rouschop et al., 2010; Rzymiski et al., 2010). Por otro lado, la respuesta adaptativa es regulada de acuerdo a la duración de la hipoxia. En hipoxia severa, la fosforilación del factor de iniciación de la traducción 2a (eIF2 $\alpha$ ), factor que controla la traducción durante la hipoxia, dependiente del sensor de estrés de retículo PERK, ocurre rápidamente de modo transitorio, mientras que durante la hipoxia moderada, la fosforilación de este factor requiere una exposición más prolongada a hipoxia (mayor a 8 h) (Koumenis and Wouters, 2006), indicando que la respuesta celular a la hipoxia es regulada por la intensidad y duración del tratamiento.

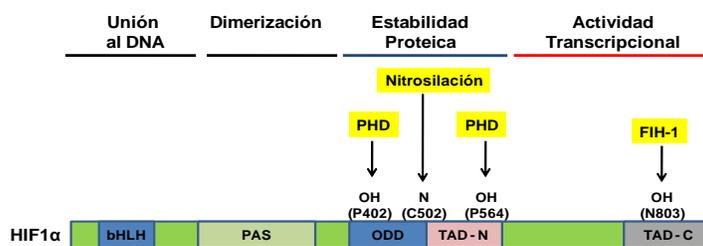
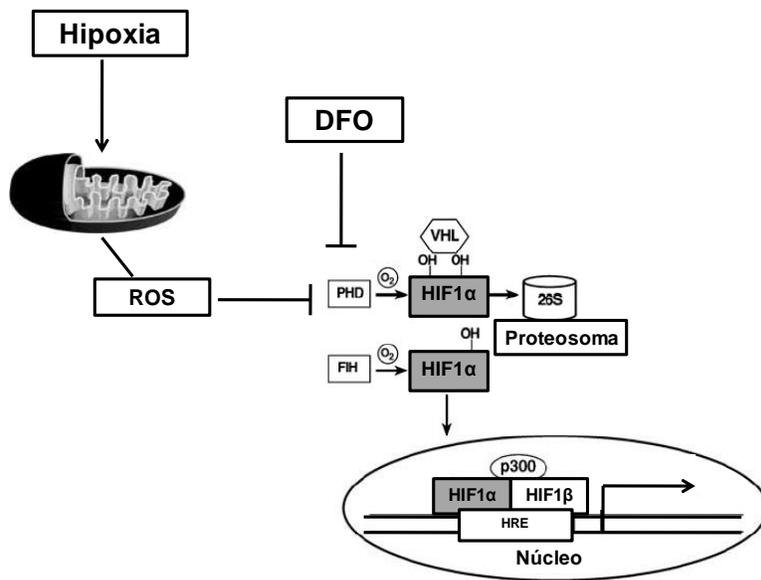
La activación del UPR parece ser importante cuando la activación de HIF1 $\alpha$  no es suficiente para mantener la expresión de proteínas en la anoxia (Rzymiski et al., 2012). Por otro lado, la inducción de la autofagia es controlada tanto por HIF1 $\alpha$ , en hipoxia moderada vía BNIP3 (Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3), mediando sobrevida celular (Hu et al., 2012; Mazure and Pouyssegur, 2009). Mientras, la inducción de autofagia en anoxia es controlada por el sensor de estrés de retículo

PERK, mediando muerte celular (Rouschop et al., 2010). El rol de la respuesta a proteínas mal plegadas fue abordado en el laboratorio (Diaz, 2013).

### **3. Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$ (HIF1 $\alpha$ )**

En hipoxia moderada ( $O_2$  1-3%), las células se adaptan mediante la activación del Factor inducible por hipoxia HIF (Semenza, 2011). HIF es una proteína que pertenece a la familia de los factores de transcripción del tipo bHLH. HIF es un heterodímero, formado por la subunidad  $\alpha$  que es sensible a oxígeno y una subunidad  $\beta$  (HIF1 $\beta$  o ARNT) que presenta una expresión constitutiva (Wang et al., 1995). HIF interactúa con distintos co-activadores en hipoxia, promoviendo la expresión de cientos de genes involucrados en la adaptación a hipoxia, mediante la asociación de HIF con elementos de respuestas a hipoxia (HRE), presentes en las regiones promotoras (**Figura 2**) (Rankin and Giaccia, 2008). Tres factores inducibles por hipoxia han sido identificados hasta la fecha (1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  y 3 $\alpha$ ) (Ema et al., 1997; Makino et al., 2002; Wang et al., 1995), de los cuales HIF1 $\alpha$  es el más ampliamente descrito (Rankin and Giaccia, 2008). HIF1 $\alpha$  presenta una expresión ubicua en los tejidos, en comparación a HIF2 $\alpha$  que tiene una expresión más restringida (Wiesener et al., 2003) y HIF3 $\alpha$  cuyo RNA mensajero ha sido descrito en algunos tejidos y la estabilización de la proteína ha sido recientemente descrita en algunas líneas celulares de cáncer renal (Rankin and Giaccia, 2008; Tanaka et al., 2011).

Estructuralmente, tanto HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  como HIF3 $\alpha$  poseen un dominio de unión al DNA (bHLH), un dominio de dimerización (PAS), un dominio central de degradación dependiente de oxígeno (ODD), una región transactivadora N-terminal (N-TAD) y un dominio transactivador C-terminal (C-TAD), exceptuando a HIF3 $\alpha$  que no lo posee (**Figura 2**) (Greer et al., 2012).



**Figura 2 Mecanismo de activación de HIF1α en hipoxia.**

En normoxia ( $O_2$  21%) las enzimas prolihidroxilasas (PHD), hidroxilan a HIF1α en prolina 402 y 564 (dominio de degradación dependiente de oxígeno, ODD), lo que permite el reclutamiento del complejo con actividad ubiquitina ligasa VHL, que promueven la degradación de HIF1α en el proteosoma. En hipoxia ( $O_2 < 3\%$ ), especies reactivas de oxígeno producidas en la mitocondria (ROS), o el tratamiento con Deferroxamina (DFO) inhiben a las enzimas PHD, estabilizando HIF1α. Por otro lado, HIF1α se estabiliza mediante la S-nitrosilación en cisteína 502 del dominio ODD. Una vez estabilizado, HIF1α transloca al núcleo donde heterodimeriza con HIF1β (a través del dominio PAS) y se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE), presente en las regiones promotoras de sus genes

blancos, a través del dominio bHLH, gatillando la expresión de sus genes blancos mediante el reclutamiento del co-activador CBP/p300. La hidroxilación en asparagina 803 por Factor inhibidor de HIF1α (FIH-1) en el dominio de transactivación C-terminal (C-TAD) previene la asociación de HIF1α con CBP/p300 inhibiendo la actividad transactivadora de HIF1α. En esta figura se destaca la estructura proteica de HIF1α con los distintos dominios proteicos y los principales residuos que son modificados post-traduccionamente. Las imágenes fueron adaptadas de (Koh and Powis, 2012; Rankin and Giaccia, 2008).

Mientras que HIF1α y HIF2α se unen a los mismos elementos de respuestas en el DNA, difieren en su perfil de inducción y aún no es claro si su función es redundante o complementaria, debido a que ambos regulan la expresión de diversos genes involucrados en la adaptación a la hipoxia. HIF1α es importante para la adaptación del metabolismo celular en hipoxia aguda, a través de la inducción de genes, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la lactato deshidrogenasa A (LDH-A), el transportador de glucosa 1 (GLUT-1), entre otros (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2009; Greer et al., 2012; Paul et al., 2004; Rankin and Giaccia, 2008; Ratcliffe, 2007; Semenza, 2011). Por otro lado, HIF2α

es necesario para promover la proliferación durante la hipoxia prolongada, incrementando la actividad transcripcional de c-Myc y manteniendo las características de pluripotencialidad de células madres (Covello et al., 2006; Gordan et al., 2007). En tanto, la función de HIF3 $\alpha$  es muy poco conocida y su expresión en hipoxia es dependiente de HIF1 $\alpha$  pero no de HIF2 $\alpha$  (Tanaka et al., 2009).

Se ha propuesto que el Factor Asociado a HIF (HAF) permite la adaptación a la hipoxia prolongada, ya que su activación permite la transición desde una respuesta dependiente de la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  hacia una dependiente de HIF2 $\alpha$ , llevando a un incremento en la expresión de genes involucrados en invasión, resultando en una mayor agresividad de tumores *in vivo* (Koh et al., 2011; Koh and Powis, 2012). Debido a que, por una parte, la expresión de HIF1 $\alpha$  es ubicua en comparación a HIF2 $\alpha$  o HIF3 $\alpha$  y se asocia a mal pronóstico en muchos tipos de cáncer como, cáncer de vejiga (Talks et al., 2000), mama (Schindl et al., 2002), gástrico (Mizokami et al., 2006), colon (Yoshimura et al., 2004), páncreas (Shibaji et al., 2003) y por otra parte HIF1 $\alpha$  se ha vinculado recientemente con Caveolina-1 (Martinez-Outschoorn et al., 2010; Pavlides et al., 2010) [ver más adelante], el foco de este trabajo es HIF1 $\alpha$ .

Ensayos de formación de tumores en xenógrafos han ayudado a dilucidar la funcionalidad de la activación de HIF1 $\alpha$  en tumores. Se ha detectado la activación temprana de HIF1 $\alpha$  en xenógrafos (Dewhirst et al., 2007). Células deficientes en HIF1 $\alpha$  muestran un considerable retardo en el crecimiento tumoral en comparación a células no deficientes cuyos tumores crecen rápidamente, indicando que la activación de HIF1 $\alpha$  es necesaria para el crecimiento tumoral (Hopfl et al., 2002). Por otro lado, la inhibición de HIF1 $\alpha$  por diversos tratamientos como una molécula antisentido (EZN-2968), derivados de ácido salicílico, antraciclinas, dominantes negativos, shRNA, siRNA en modelos de cáncer de páncreas, gástrico, glioma, próstata, han mostrado disminución del crecimiento tumoral (Lee et al., 2009; Monti and Gariboldi, 2011; Semenza, 2010). En este mismo sentido, la expresión

forzada de HIF1 $\alpha$  en líneas celulares de cáncer de colon o páncreas han mostrado un incremento en el crecimiento tumoral (Semenza, 2010). La inhibición de genes blancos de HIF1 $\alpha$  como VEGF (Hurwitz et al., 2004), GLUT-1 (Young et al., 2011) o LDH-A (Fantin et al., 2006) reducen el tamaño de los tumores, sugiriendo que la activación de HIF1 $\alpha$  en tumores y la expresión de sus genes blanco es importante para el desarrollo tumoral.

### **Regulación de HIF1 $\alpha$**

HIF1 $\alpha$  presenta una regulación post-traducciona compleja. Modificaciones como hidroxilación, fosforilación o nitrosilación impactan fuertemente en la estabilidad de la proteína como en su capacidad transactivadora. En normoxia, HIF1 $\alpha$  es hidroxilado en prolina (residuos 402 y 564 en el dominio ODD), por las enzimas prolil-hidroxilasas (PHD, enzimas dependientes de Fe<sup>+2</sup>, O<sub>2</sub> y oxoglutarato). La hidroxilación permite que HIF1 $\alpha$  sea reconocido por el factor de Von Hippel Lindau (VHL) quien forma un complejo multiproteico con actividad Ubiquitina – Ligasa que promueve la degradación de HIF1 $\alpha$  por el proteosoma (**Figura 2**) (Huang et al., 1998; Sutter et al., 2000). En hipoxia, el aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) producidos por el complejo III de la mitocondria producen una reacción de Fenton en el sitio activo de PHD, inactivando las enzimas PHD, disminuyendo la hidroxilación de HIF1 $\alpha$ , permitiendo así la estabilización proteica de HIF1 $\alpha$ . Una vez estabilizado, HIF1 $\alpha$  transloca al núcleo, donde forma un heterodímero con HIF1 $\beta$ , gatillando la transcripción de sus genes blancos (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2009; Chandel et al., 2000; Klimova and Chandel, 2008; Paul et al., 2004; Schroedl et al., 2002). Durante la hipoxia, la inhibición de la hidroxilación en asparragina 803 en el dominio C-terminal de transactivación de HIF1 $\alpha$ , por el factor inhibidor de HIF1 $\alpha$  (FIH-1), incrementa la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  al permitir la asociación de HIF1 $\alpha$  con el coactivador p300/CBP (**Figura 2**) (Jiang et al., 1997; Lando et al., 2002a; Lando et al., 2002b). Por otro lado, la fosforilación de HIF1 $\alpha$  impacta en su capacidad transactivadora. Se ha visto que la fosforilación por la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) incrementa la actividad transactivadora de HIF1 $\alpha$  y la

inhibición de MAPK previene la asociación de HIF1 $\alpha$  con el coactivador p300/CBP (Lisy and Peet, 2008).

Una de las modificaciones post-traduccionales más estudiada de HIF1 $\alpha$  es la modificación por óxido nítrico (NO). El NO es un mensajero gaseoso, con un importante rol en vasodilatación y agregación antiplaquetaria. Mediante oxidación de la L-arginina, las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS), producen L-citrulina y NO. Se han descrito tres isoformas NOS1, NOS2 y NOS3 (conocidas previamente como nNOS, iNOS y eNOS, respectivamente), de las cuales, NOS1, NOS3 presentan una expresión constitutiva y la expresión de NOS2 se induce por citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), lipopolisacárido e interleukina-1 $\beta$ . Las tres isoformas de NOS han sido detectadas en tumores tanto en células tumorales, macrófagos asociados a tumores como en el endotelio vascular. Además, la síntesis de NO depende de la disponibilidad de sustrato y otras enzimas como arginasa compiten con las NOS para la utilización de L-arginina (Wu and Morris, 1998; Yasuda, 2008).

Se ha visto en carcinoma oral, que la estabilización de HIF1 $\alpha$  coincide con la expresión tanto de NOS2 como NOS3. En este caso, el tratamiento con un inhibidor general de NOS (L-NMMA) previene la acumulación de HIF1 $\alpha$  en líneas celulares (Quintero et al., 2006). Por otro lado, mediante experimentos de sobreexpresión de NOS2 en células HEK293 se ha visto que HIF1 $\alpha$  es estabilizado a altas concentraciones de NO, independientemente de la concentración de O<sub>2</sub> (Mateo et al., 2003). *In vivo*, la liberación de NO por macrófagos inducida por radiación ionizante, resulta en la estabilización proteica de HIF1 $\alpha$  por S-nitrosilación en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (Li et al., 2007a). El incremento en los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  inducido con dadores de NO, aumenta la actividad transcripcional de HIF, al prevenir la hidroxilación en asparragina 803 facilitando la asociación de HIF1 $\alpha$  con el coactivador transcripcional p300/CBP (Park et al., 2008). En hipoxia moderada (O<sub>2</sub> 3%), la producción de especies reactivas del oxígeno y el NO, es responsable de

la estabilización proteica de HIF1 $\alpha$  (Chowdhury et al., 2012). Lo anterior sugiere que el NO es un modulador tanto de la estabilidad proteica como de la capacidad transactivadora de HIF1 $\alpha$ .

#### **4. Caveolina-1**

Caveolina-1 es una proteína de andamiaje de 24 kDa, perteneciente a la familia de proteínas Caveolinas, que fueron descritas como uno de las principales componentes de las Caveolas. Hasta la fecha, se han descrito tres isoformas de Caveolina (1, 2 y 3), las cuales difieren en su patrón de expresión (Quest et al., 2004). Mientras que Caveolina-1 y Caveolina-2 son usualmente co-expresadas en células endoteliales, fibroblastos o adipocitos, la expresión de Caveolina-3 es restringida a células musculares y glía (Ikezu et al., 1998; Okamoto et al., 1998). Por su importancia en cáncer, nuestro trabajo está enfocado en Caveolina-1.

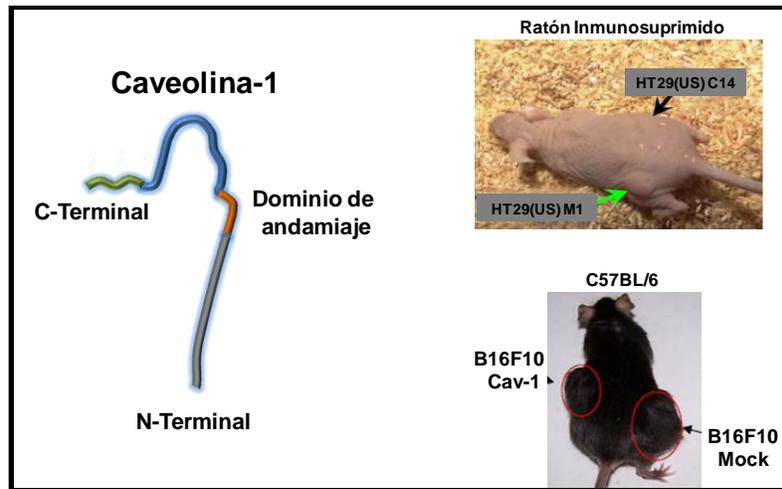
A nivel celular, Caveolina-1 se distribuye tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma, vesículas secretoras, mitocondria y núcleo, dependiendo del tipo celular (Li et al., 2001; Sanna et al., 2007; Shah et al., 2002), indicando que las funciones de Caveolina-1 no se restringen a su ubicación en las caveolas (Head and Insel, 2007). Estructuralmente, Caveolina-1 posee un dominio central hidrofóbico que adopta una estructura tipo horquilla, el cual se inserta en la cara citoplasmática de la membrana plasmática, orientando ambos extremos de la proteína hacia el citoplasma. Cercano al dominio central hidrofóbico, se encuentra el dominio de andamiaje de Caveolina-1 (CSD) que comprende los aminoácidos 82 al 101. A través de esta secuencia, se ha descrito que Caveolina-1 interactúa con múltiples proteínas que presentan una secuencia de unión a Caveolina-1, conocida como CBD (**Figura 3**) (Quest et al., 2013).

Caveolina-1 se considera como un actor importante en el transporte de vesículas, transporte de colesterol y transducción de señales (Bosch et al., 2011; Frank et al., 2006; Quest et al., 2013; Williams and Lisanti, 2005). En transducción de señales, se ha propuesto que a través de su dominio de andamiaje, Caveolina-1 interactúa

directa e indirectamente con proteínas que contienen el motivo de unión a Caveolina-1. Por medio de esta interacción, Caveolina-1 impide el funcionamiento de diversas proteínas como, tirosinas quinasas, receptores acoplados a proteína G, proteínas G, entre otras, teniendo como consecuencia la inhibición de la propagación de la señal (Liu et al., 2002; Okamoto et al., 1998; Williams and Lisanti, 2005).

Uno de los blancos más descritos de Caveolina-1, son las isoformas de NOS. Se ha visto, que mediante la interacción directa entre Caveolina-1 y las isoformas NOS1 y NOS3 vía interacción a través del dominio CSD, Caveolina-1 inhibe la producción de NO. El tratamiento de las diferentes isoformas de NOS purificadas (NOS1, NOS2 y NOS3) con un péptido correspondiente al dominio de andamiaje de Caveolina-1 inhibe la actividad de NOS y la liberación de NO por NOS3 (Garcia-Cardena et al., 1997). Cabe destacar que, la inhibición de NOS1 como NOS3 por Caveolina-1, ocurre a través de la secuestro de las enzimas vía CSD-CBD (Bernatchez et al., 2005; Garcia-Cardena et al., 1997; Ju et al., 1997; Sato et al., 2004). Sin embargo, la inhibición de NOS2 parece depender de la unión de la enzima con Caveolina-1, a través de la región 101-135, lo que promueve la degradación de NOS2 (Folley-Bosco et al., 2000).

Es importante destacar que ha observado un incremento en la asociación entre Caveolina-1 y NOS3 en células endoteliales de pulmón expuesta a hipoxia, con la consiguiente reducción en la producción de NO (John et al., 2006; Liu et al., 2009). Además, este efecto parece no estar restringido al endotelio, ya que en células de neuroblastoma, el incremento en los niveles de Caveolina-1 reduce la producción de NO por la reducción en los niveles proteicos de NOS2 como NOS3 (Shen et al., 2008). A pesar de estos antecedentes, la función de Caveolina-1 en hipoxia, su relación con NOS y la producción de NO y como esta relación puede ser importante para la función supresora de tumores de Caveolina-1, ha sido muy poco abordada hasta la fecha.



**Figura 3: Caveolina-1 y su acción supresora de tumores.**

Estructura de Caveolina-1. En esta ilustración se aprecia la forma de horquilla que adquiere Caveolina-1, orientando ambos extremos proteicos hacia el citoplasma. Además, se destaca el dominio de andamiaje de Caveolina-1, a través del cual establece interacciones con otras proteínas. La sobreexpresión de Caveolina-1 en células tumorales previene el crecimiento de tumores derivados de células de cáncer de colon y melanoma murino [HT29(US) (clones M1 y C14) y B16F10 (Mock y Cav-1), respectivamente] en ratones inmunosuprimidos e inmunocompetentes (nude y C57BL/6, respectivamente). Es importante destacar la disminución del tamaño de los tumores formados por células transfectadas con Caveolina-1. Las fotografías de los animales fueron adaptadas desde (Bender et al., 2000; Diaz, 2013; Lobos-Gonzalez L., 2013).

### **Caveolina-1 y cáncer**

Se ha visto una disminución en los niveles de expresión (proteicos como mRNA) de Caveolina-1 en fibroblastos transformados, asociándose con un incremento en el crecimiento independiente de anclaje (Koleske et al., 1995). En este caso, la reexpresión de Caveolina-1 con un sistema inducible, revierte el crecimiento independiente de anclaje en fibroblastos transformados (Engelman et al., 1997). Por otro lado, hallazgos obtenidos por nuestro Laboratorio y por otros grupos coinciden en la pérdida de la expresión de Caveolina-1 en tumores humanos y en líneas celulares de cáncer de colon (Bender et al., 2000), cabeza y cuello (Zhang et al., 2008b), mama (Lee et al., 1998), entre otros (Quest et al., 2013). Mediante ensayos con xenógrafos, se ha visto que la reexpresión de Caveolina-1 en cáncer

de mama (Chiu et al., 2011; Wu et al., 2008), carcinoma laríngeo (Gu et al., 2007), entre otros, reducen el crecimiento del tumor, indicando que Caveolina-1 tiene un rol supresor de tumores. Aparentemente, este rol de Caveolina-1 depende de su dominio de andamiaje. La administración un péptido correspondiente al dominio de andamiaje de Caveolina-1 (péptido AP-CSD) suprime el crecimiento de tumores (Gratton et al., 2003). Sin embargo, hasta la fecha no existe claridad sobre los mecanismos explican la acción supresora de tumores de Caveolina-1.

### **Antecedentes del Laboratorio**

Resultados de nuestro Laboratorio avalan la hipótesis de que Caveolina-1 tiene una función supresora de tumores (**Figura 3**) (Bender et al., 2000; Diaz, 2013; Lobos-Gonzalez L., 2013). Nuestro Laboratorio, se ha focalizado en dilucidar qué mecanismo (s) explican el efecto supresor de tumor de Caveolina-1. Estudios *in vitro* han mostrado que Caveolina-1 es un potente inhibidor de la vía de  $\beta$ -Catenina-TCF/LEF, reduciendo la proliferación celular (Rodriguez et al., 2009; Torres et al., 2006). Para inhibir esta vía, Caveolina-1 requiere de la proteína de adhesión celular E-Cadherina (Torres et al., 2007). Sin embargo, *in vivo*, si bien la inhibición de  $\beta$ -Catenina por Caveolina-1 parece ser relevante, se observó que Caveolina-1 también era capaz de suprimir el crecimiento de tumores en células carentes de E-Cadherina (Lobos-Gonzalez L., 2013) y modelos independientes de supresión de tumores han sido recientemente propuestos (Diaz, 2013). A pesar de estos antecedentes, no existe claridad sobre qué mecanismo(s) contribuye(n) al papel supresor de tumor de Caveolina-1 en ausencia de E-Cadherina.

### **Caveolina-1 y HIF1 $\alpha$**

Una línea de trabajo reciente, ha propuesto un mecanismo alternativo para explicar el rol de Caveolina-1 en cáncer. Mediante microdissección láser de un tumor mamario humano, se demostró que la pérdida de la expresión de Caveolina-1 en estroma, induce la aparición de un microambiente pseudohipóxico, caracterizado por la activación de HIF1 $\alpha$ . En este caso, la deficiencia de

Caveolina-1 se asoció con la recurrencia del tumor (Witkiewicz et al., 2011). En modelos animales, el análisis de los tejidos del ratón *knock-out* para Caveolina-1 muestra un aumento en los niveles de expresión de genes blancos de HIF1 $\alpha$  (Pavlidis et al., 2009). Por otro lado, *in vitro* en fibroblastos estromales, la hipoxia induce la degradación proteica de Caveolina-1. La reducción de los niveles de Caveolina-1 produce un aumento de HIF1 $\alpha$  y la activación farmacológica de HIF1 $\alpha$  media la degradación de Caveolina-1 (Martinez-Outschoorn et al., 2010). Estos antecedentes sugieren fuertemente una relación inversa entre Caveolina-1 y HIF1 $\alpha$  en estroma tumoral.

**Resumiendo los antecedentes:**

1. Caveolina-1 suprime la formación de tumores.
2. La activación de HIF1 $\alpha$  en cáncer promueve el desarrollo tumoral.
3. El NO es un importante mediador involucrado en la estabilización proteica y la capacidad transactivadora de HIF1 $\alpha$ .
4. Caveolina-1 es un inhibidor de NOS.
5. En el estroma tumoral, la deficiencia en Caveolina-1 lleva a la activación de HIF1 $\alpha$  con el consiguiente aumento de la expresión de sus genes blancos.
6. Hasta la fecha, se desconoce el mecanismo que explique la relación inversa existente entre Caveolina-1 y HIF1 $\alpha$ .
7. Se desconoce si el aumento de Caveolina-1 conlleva a la disminución de la señalización mediada por HIF1 $\alpha$  en células tumorales.

Por lo tanto proponemos la siguiente hipótesis:

## **HIPÓTESIS**

“Caveolina-1 inhibe la actividad transcripcional del Factor Inducible por Hipoxia 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) en hipoxia y la expresión de sus genes blancos, contribuyendo al papel supresor de tumores de Caveolina-1 en células carentes de E-Cadherina”.

## **OBJETIVO GENERAL**

Investigar la participación de HIF1 $\alpha$  en el papel supresor de tumores de Caveolina-1.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**1. Determinar si Caveolina-1 inhibe la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  en hipoxia.**

1.1 Estudiar si la presencia de Caveolina-1 inhibe la actividad transcripcional del gen reportero de HIF1 $\alpha$ .

1.2 Determinar los niveles de expresión de genes blancos de HIF1 $\alpha$  en células que expresan Caveolina-1 expuestas a hipoxia.

1.3 Estudiar si el silenciamiento de Caveolina-1 se asocia a un incremento en la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  en hipoxia.

1.4 Determinar si el dominio de andamiaje de Caveolina-1 participa en la inhibición de HIF1 $\alpha$  en hipoxia.

1.5 Estudiar si la presencia de Caveolina-1 altera la translocación de HIF1 $\alpha$  al núcleo.

1.6 Evaluar si la sobreexpresión de Caveolina-1 afecta la viabilidad o la progresión del ciclo celular en hipoxia.

**2. Evaluar la participación de las enzimas óxido nítrico sintasas en la inhibición de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1.**

2.1 Identificar la isoforma de óxido nítrico sintasa asociada al efecto inhibidor de Caveolina-1.

2.2 Determinar el efecto de un dador de óxido nítrico.

**3. Evaluar *in vivo* si la inhibición de HIF1 $\alpha$  y NOS contribuyen a su papel supresor de tumores de Caveolina-1**

3.1 Determinar si la sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  previene el efecto supresor de tumores de Caveolina-1 *in vivo*.

3.2 Determinar los niveles de expresión de genes blanco de HIF1 $\alpha$  en tumores derivados de células transfectadas con Caveolina-1.

3.3 Evaluar el efecto de L-NAME sobre la acción supresora de tumores de Caveolina-1.

## METODOLOGÍA

### 1. Materiales

#### 1.1 Reactivos

La mezcla de gases de hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>, calidad ultrapuro) se adquirió en Linde AGA®, Chile. Suero Fetal Bovino, el sustrato de quimioluminiscencia EZ-ECL (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), el reactivo BCA (Pierce, Rockford, IL, USA), el reactivo de transfección Superfect y el kit de extracción de DNA Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), el reactivo TriZOL®, lipofectamine 2000 ® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), higromicina, el IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) fueron obtenidos de US Biological (Swampscott, MA, USA). Todos los medios de cultivo, tripsina y antibióticos usados fueron adquiridos en Gibco BRL (Paisley, Scotland, UK). Las enzimas (GoTaq® Flexi DNA Polymerase y RQ1 RNase-Free DNase), tampones y reactivos para RT-PCR fueron de Promega (Madison, WI, USA). La mezcla para qPCR, Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) fue de Fermentas (Vilnius, Lituania). El kit para extracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents) fue de Thermo Scientific (MA, USA). Los reactivos para ensayo de gen reportero, Luciferina y 2 nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) fueron adquiridos de US Biological (Swampscott, MA, USA) y Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania), respectivamente. Los reactivos para Western Blot e inmunofluorescencia, fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, USA) o de la mejor calidad disponible.

#### 1.2 Fármacos

El inhibidor general de las enzimas óxido nítrico sintasas L-NAME (Nω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride), el dador de óxido nítrico DETA/NO (Diethylenetriamine/nitric oxide adduct), el quelante de hierro Deferroxamina y Cicloheximida fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, USA). Los inhibidores

específicos de las isoformas 2 (inducible, NOS2) y 3 (endotelial, NOS3) de las enzimas NOS 1400W (N-(3-Aminomethyl)benzylacetamide, 2HCl), L-NIO (L-N<sup>5</sup>-(1-Iminoethyl)ornithine, Dihydrochloride), respectivamente eran de Calbiochem (Darmstadt, Germany). El inhibidor de arginasa BEC ((S)-(2-Boronoethyl)-L-cysteine, HCl, Calbiochem, Darmstadt, Germany) fue generosamente donado por el Dr. Luis Sobrevia (Centro de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile).

El péptido correspondiente al dominio de andamiaje de Caveolina-1 (AP-CSD), fue sintetizado en Biomatik (Cambridge, Ontario, Canada), mediante el método de síntesis en fase sólida Fmoc, según ha sido descrito previamente (Bucci et al., 2000; Gratton et al., 2003). La secuencia de los péptidos se detalla en la Tabla 1.

Nombre del Péptido	Secuencia
AP-SC	RQIKIWFQNRRMKWKKWGIDKAFSTTSTVTYKWFYR
AP-CSD	RQIKIWFQNRRMKWKKDGIWKASFTTFTVTKYWFYR

**Tabla 1: Secuencia aminoacídica de los péptidos AP-Scramble (AP-SC) y AP-Dominio de Andamiaje de Caveolina-1 (AP-CSD).**

Para asegurar la internalización de los péptidos, éstos fueron conjugados con una secuencia polipeptídica de 16 aminoácidos (RQIKIWFQNRRMKWKK) correspondiente a la tercera hélice del dominio de unión al DNA del factor de transcripción Antennapedia (*Drosophila Melanogaster*), el cual es internalizado por las células en cultivo. En el extremo N-terminal se incluyó un espaciador de ácido aminohexanoico seguido de biotina, para la detección *in situ* de los péptidos mediante inmunofluorescencia (Bucci et al., 2000; Derossi et al., 1996; Derossi et al., 1994; Gratton et al., 2003). Se preparó una solución madre de péptidos 10 mM disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). A continuación los péptidos se diluyeron en agua nanopura (concentración final 1 mM) y a partir de esta dilución se hizo alícuotas para tratar las células (Bucci et al., 2000; Gratton et al., 2003).

## **2. Anticuerpos**

Anticuerpos primarios anti-HIF1 $\alpha$  (#610958), anti-Lap2 (# 611000) fueron de BD Bioscience (California, USA). De Transduction Laboratories (Lexington, KY) se obtuvieron los anticuerpos anti-Caveolina-1(#610060) y anti-E-cadherina (#610181). Los anticuerpos anti-Actina (#A5060), anti-Hsp90 (# SC7947) y anti-TFIIB (#SC225) fueron adquiridos en Sigma (St. Louis, MO, USA). El anticuerpo primario anti-NOS3 (BD Transduction Laboratories # 610296) fue gentilmente donado por el Dr. Sergio Lavandero (Universidad de Chile, Chile).

Los anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano anti-IgG de conejo (# A5420) y anti-IgG de ratón (# A4416) fueron adquiridos en Sigma (St. Louis, MO, USA). Los anticuerpos secundarios caprinos anti-IgG de ratón conjugado a Cy3<sup>TM</sup> (#115-165-068) y anti-IgG de conejo conjugado a FITC (#111-0950144) fueron obtenidos de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

## **3. Cultivo celular y Condiciones experimentales**

### **3.1 Cultivo líneas celulares**

La línea celular embrionaria de riñón humano, HEK293T y las líneas celulares HT29(US) clones M1 y C14 establemente transfectadas con el plasmidio control pLacIOP o pLacIOP-(Caveolina-1), respectivamente y las células B16F10(Mock) y (Caveolina-1) fueron descritas anteriormente (Bender et al., 2000; Torres et al., 2007; Torres et al., 2006) y fueron cultivadas DMEM alta glucosa y RPMI suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (10.000 U/ml de penicilina y estreptomina 10  $\mu$ g/ml) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, respectivamente. Las células MDA-MB231 establemente transducidas con un shRNA contra Caveolina-1 (shRNA-cav1#5, sh5) o shRNA contra una secuencia aleatoria (shRNA-Scramble, shc) (Urra et al., 2012) fueron cultivadas en DMEM-F12 suplementado con 10% FBS y antibióticos (10.000 U/ml de penicilina y estreptomina 10  $\mu$ g/ml) a 37°C y

5% CO<sub>2</sub>. Las líneas celulares fueron mantenidas en placas de cultivo y subcultivadas cada 3-4 días por un total de 20 pasajes (B16F10) ó 45 pasajes [HT29(US), MDA-MB231].

### **3.2 Experimentos en hipoxia**

Un día antes de los experimentos, las células fueron contadas mediante la tinción de Azul de Tripán (Sigma) y sembradas en placas de cultivo con IPTG 1 mM para inducir la expresión de Caveolina-1 por 24 ó 48 h [líneas celulares HT29(US) y B16F10, respectivamente] (Bender et al., 2000; Torres et al., 2007). Una vez finalizado este periodo, se realizó el experimento, manteniendo el IPTG 1 mM durante el transcurso de éste. La confluencia de las células no fue superior a un 70% al finalizar el experimento.

El tratamiento de hipoxia se realizó en una cámara de hipoxia Billups-Rothenberg® (California, USA) (excepto en las **Figuras Suplementarias S1 y S3**, donde se uso cámara de hipoxia Biospheryx). Este tipo de incubadoras es ampliamente validado en la literatura para realizar experimentos de hipoxia. Para los experimentos, la cámara fue purgada por 20 minutos a razón de 10 L/min con una mezcla de gases certificada (calidad ultrapuros) conteniendo 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub> (Linde AGA® Chile), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para mantener estable la humedad y la temperatura durante el transcurso del experimento, se incubaron dos placas con 10 mL agua nanopura y una vez sellada, la cámara se incubó en una estufa termo-regulada a 37°C. Debido a las limitaciones referentes a la solubilidad y difusión de los gases en soluciones acuosas, los medios de cultivo que se usaron en los experimentos fueron pre-incubados en hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>) por 24 h previas al experimento (Allen et al., 2001). Para facilitar el equilibrio gaseoso durante el transcurso del experimento, el volumen final del medio de cultivo, se redujo en un 30-35% en volumen (Volumen final: 350 µL, 1.5 mL, 2 mL y 5 mL, para placas de cultivo de

24 pocillos, 6 pocillos, 60 mm y 100 mm, respectivamente). Como control y en paralelo, se realizó el tratamiento de normoxia en una incubadora a 37°C, 80% humedad con 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire, realizando las mismas indicaciones que para los tratamientos de hipoxia. Al finalizar el tratamiento de hipoxia, la cámara fue abierta con precaución, donde se verificó la existencia de presión positiva de ésta al finalizar el experimento.

Cuando fue pertinente se simuló hipoxia químicamente, mediante el tratamiento de las células con el quelante de hierro Deferroxamina. El tratamiento se realizó por 18 h a una concentración de 200 µM según lo descrito previamente (Kaidi et al., 2007; Wang and Semenza, 1993).

#### **4. Plasmidios y transfecciones**

##### **4.1 Plasmidios**

El plasmidio pGL3-HRE fue utilizado para medir la actividad transcripcional de HIF mediante ensayos de gen reportero. Este vector posee tres copias de Elementos de Respuesta a Hipoxia (HRE), provenientes de la región promotora del gen de la enzima fosfoglicerato quinasa, generosamente donado por la Dra Kaye Williams (University of Manchester, Reino Unido)(Brown et al., 2006). El plasmidio pON fue utilizado para sobreexpresar la enzima β-galactosidasa, actividad que se usó para normalizar los resultados de gen reportero de HIF, gentilmente donado por el Dr. Sergio Lavandero (Universidad de Chile, Chile). El plasmidio de expresión de la proteína fluorescente verde (pEGFP-C1)(Torres et al., 2006) fue usado para visualizar las células en el ensayo de captación del péptido AP-CSD. La sobreexpresión de HIF1α se realizó con el plasmidio de expresión constitutiva de HIF1α silvestre (pcDNA-HIF1α-V5 WT, HIF1α) el que fue donado generosamente por el Dr. Salvador Moncada (University College London, Londres, Reino Unido) (Hagen et al., 2003).

Generación del plasmidio reportero de HIF1: El gen de la luciferasa asociado a los elementos de respuesta de HIF (HRE) fue clonado por PCR a partir del plasmidio pGL3-HRE (generosamente donado por la Dra. Kaye Williams, Universidad de Manchester, Reino Unido). Después, el producto de PCR fue insertado y ligado entre los sitios de restricción MfeI y HindIII en el plasmidio pcDNA3.1 (+) (Invitrogen). En tanto, el plasmidio control pCMV-Luc fue generado por clonación del gen de la luciferasa, proveniente del pGL3-Básico (Promega) a los sitios XbaI-HindIII en el plasmidio pcDNA3.1 (+).

#### 4.2 Transfecciones transitorias

Para los ensayos de gen reportero de HIF, células HT29(US) como MDA-MB231 fueron transfectadas en suspensión con el reactivo Superfect (Qiagen). Células HT29(US) ( $1,8 \times 10^5$ ) o MDA-MB231 ( $7 \times 10^4$ ) fueron transfectadas con 0,25  $\mu$ g de plasmidio pGL3-HRE y 0,25  $\mu$ g de plasmidio pON, durante 2 horas en placas de 24 pocillos en un volumen de 150  $\mu$ L. Para el ensayo de captación del péptido AP-CSD  $1,8 \times 10^5$  células HT29(US) fueron transfectadas con el plasmidio pEGFP-C1 (0,75  $\mu$ g). Para ello, las células fueron incubadas con un complejo previamente formado compuesto por ADN plasmidial: Superfect: Medio de cultivo sin suero en una razón 1:4:60, respectivamente. Transcurrido el periodo de incubación (2 h a 37°C), se agregó 350  $\mu$ L de medio de cultivo suplementado con 10% suero fetal bovino e IPTG 1 mM, según correspondió. Luego de la transfección (16-18 h) las células fueron lavadas con PBS estéril y se realizó el experimento.

Por otro lado, células HEK293T ( $1 \times 10^6$ ) fueron transfectadas con el método del fosfato de calcio, con los plasmidios pLacIOP(Caveolina-1) (0.3 – 1.3  $\mu$ g), pLacIOP (0.3 – 1.3  $\mu$ g), pON (0,25  $\mu$ g) y pGL3-HRE (0,04  $\mu$ g) (**Figuras Suplementarias 1 y 3**). Para ello, los plasmidios fueron precipitados con 340  $\mu$ L de una solución de HEBS 2X pH 7 (HEPES 0,05M, NaCl 0.28M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 mM), 42,5  $\mu$ L de cloruro de calcio 2M y 340  $\mu$ L de HEPES 2,5M pH 7.3 por veinte minutos (min).

Luego, las células fueron incubadas por 2 h con el precipitado a 37°C. A continuación, el medio de cultivo fue removido mediante lavados sucesivos con PBS 1X estéril y las células fueron incubadas por 16 h en medio con suero. Finalizado este período, las células fueron tripsinadas, contadas y sembradas con IPTG 1 mM de modo de inducir la expresión de Caveolina-1. Con este método, se logró una eficiencia de transfección cercana al 60% y expresar de manera dosis-dependiente los niveles de Caveolina-1.

### 4.3 Transfecciones estables

Se generaron líneas celulares establemente transfectadas con el plasmidio de expresión constitutiva de HIF1 $\alpha$  (pcDNA-HIF1 $\alpha$ -V5 WT) para los ensayos de formación de tumores en ratones SCID-Beige. Para ello, células HT29(US) ( $1 \times 10^6$ ) clones M1 y C14 fueron transfectadas en suspensión con 2  $\mu$ g del plasmidio pcDNA-HIF1 $\alpha$ -V5 WT o el plasmidio control pcDNA 3.1 (+) (pcDNA) con Superfect (Qiagen), de acuerdo a lo indicado en 4.2. Luego de 48 h después de la transfección, se realizó un pasaje de las células y éstas fueron sometidas a selección por 3 semanas con el antibiótico G418 1500  $\mu$ g/mL, seguido de una semana de selección con los antibióticos G418 e Higromicina (1500 y 500  $\mu$ g/mL, respectivamente). Finalizada la selección, las células fueron sembradas con IPTG 1 mM y se verificó la expresión de HIF1 $\alpha$  y Caveolina-1 por Western blot.

Para la generación de las células HT29US y B16F10 co-transfectadas con Caveolina-1 y los plasmidio reportero de HIF pcDNA-HRE-Luc o plasmidio de expresión constitutiva pCMV-Luc (**Figuras Suplementarias S2, S6**), las células HT29US (clones M1 y C14) y B16F10 (Mock y Cav-1) fueron transfectadas con los plasmidios indicados usando lipofectamina 2000 (invitrogen). Para ello,  $1 \times 10^6$  ó  $3 \times 10^5$  células HT29(US) o B16F10, respectivamente, fueron transfectadas con 2  $\mu$ g de los plasmidios pcDNA-HRE-Luc o pCMV-Luc, 6  $\mu$ L de lipofectamina 2000 en 500  $\mu$ L de optimem. Dos horas luego de la transfección, el medio de cultivo fue

reemplazado por medio de cultivo fresco y 48 h después, las células fueron seleccionadas con G418 (1500 y 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para las células HT29US y B16F10, respectivamente) por 15 días, seguido de una semana de selección con G418 e Higromicina (G418: 1500 y 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Higromicina 500 y 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para las células HT29US y B16F10, respectivamente). Para verificar la expresión de la luciferasa, las células transfectadas con el vector reportero pcDNA-HRE-Luc, fueron sembradas en placas de cultivo en presencia de IPTG 1 mM y tratadas con el inductor de hipoxia DFO 200  $\mu\text{M}$  por 18 h. Finalizado el tratamiento, se determinó la actividad luciferasa por luminometría. En tanto, se ocupó el mismo protocolo para verificar la expresión del gen de la luciferasa con las células pCMV-Luc, con la excepción que la expresión de la luciferasa fue comparada con la línea celular que expresa establemente el gen de la luciferasa 4T1-12B (Tao et al., 2008). Tanto las células HT29(US) como B16F10 expresaron un 50% de la luminiscencia que presentan las células 4T1-12B (resultado no mostrado).

## **5. Extracción de proteínas y western blot**

### **5.1 Obtención de los extractos totales de proteínas**

Una vez finalizados los experimentos, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y fueron recolectadas sobre hielo con PBS conteniendo los inhibidores de proteasas, 1 mM PMSF, 1 mM  $\text{Na}_2\text{VO}_3$ , 10 mM NaF y BAL (Benzamida 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Antipaína 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y Leupeptina 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cuando se procedió a extraer proteínas de células sometidas a hipoxia, las células fueron lavadas con PBS frío, el cual fue burbujado durante 5 min con la mezcla para hipoxia de gases (1%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 94%  $\text{N}_2$ ) suplementados con los inhibidores anteriormente indicados. A continuación, las células fueron centrifugadas a 500xg por 5 min, el sobrenadante descartado y las células lisadas con una solución tamponante 20 mM HEPES (pH 7.4), conteniendo 0.1% NP40, 0.15 % SDS y la mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa mencionada anteriormente, en hielo. A continuación el lisado celular fue sonicado hasta la obtención de un homogenizado y centrifugado por 10 min a 16.000xg a 4°C. A partir del homogenizado se

determinó la concentración de proteínas utilizando el kit BCA (BCA protein assay, Pierce), siguiendo las instrucciones del proveedor.

## **5.2 Obtención de extractos de proteínas citoplasmáticas y nucleares**

Para la obtención de extracto de proteínas citoplasmáticas y nucleares se utilizó el kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del proveedor. Este kit permite la obtención de proteínas activas, no denaturadas luego de la disrupción de la membrana plasmática, liberación del contenido citoplasmático, seguido de recuperación de núcleos intactos mediante centrifugación, los cuales fueron posteriormente lisados. De acuerdo a lo informado por el proveedor, los extractos proteicos obtenidos, presentan menos de un 10% de contaminación cruzada. Células HT29(US) ( $1,8 \times 10^6$ ) fueron sembradas en placas de 100 mm. Luego de 24 h de inducción de la expresión de Caveolina-1 con IPTG 1 mM y 24 h de tratamiento, las células fueron recolectadas con 1 mL de PBS suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa como se indica en 5.1. De la suspensión resultante de células, 300  $\mu$ L fueron destinados para el análisis de extracto total de proteínas y se procedió como se indica en 5.1. Los 700  $\mu$ L restantes de la suspensión fueron centrifugados y posteriormente lisados con 200  $\mu$ L del tampón de lisis CER I (suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa). Luego, de 10 min de incubación en hielo y agitación vigorosa con vortex, se agregó 11  $\mu$ L de tampón de lisis CER II. A continuación, el extracto fue centrifugado a 16.000xg por 5 min a 4°C. El sobrenadante, correspondiente a la fracción citoplasmática fue almacenado a -80°C hasta su análisis por Western Blot. Para eliminar restos de la fracción citoplasmática, el pellet correspondiente a núcleos intactos, fue lavado 4 veces con 750  $\mu$ L de PBS (suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa) y centrifugados a 16.000xg durante 5 min a 4°C. Luego, el pellet nuclear fue lisado con 100  $\mu$ L de tampón de lisis NER (suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa) con agitación fuerte en vortex por 15 seg, cada 10 min durante 40 min. Luego, el homogenizado fue centrifugado a 16.000xg por 10 min a 4°C. El

sobrenadante (fracción nuclear) fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Finalmente, las proteínas fueron cuantificadas con el kit BCA (Pierce) y las distintas fracciones obtenidas fueron analizadas mediante Western Blot.

### **5.3 Western blot**

De proteínas totales 100 ó 70  $\mu\text{g}$ , fueron denaturados y corridos en geles de poliacrilamida al 8%. Una vez resueltas, las bandas de proteínas contenidas en los extractos fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (115 Volts por 90 minutos), bloqueadas con solución de leche 5% en PBS-Tween 0,1%. A continuación las membranas fueron incubadas a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche con los anticuerpos anti-HIF1 $\alpha$  (monoclonal, 1:150), anti-Caveolina-1 (policlonal, 1:2500), anti-NOS3 (monoclonal 1:500), anti-Actina (policlonal, 1:4000), anti-Lap2 (monoclonal, 1:2000), anti-Hsp90 (policlonal, 1:2000), anti-E-Cadherina (monoclonal, 1:2000) o anti-TFIIB (policlonal, 1:200). Luego, las membranas fueron lavadas e incubadas con anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano anti-IgG de conejo (1:5000) o anti-IgG de ratón (1:4000) por una hora. Finalmente, las proteínas en las membranas de nitrocelulosa reconocidos por los anticuerpos fueron reveladas con el reactivo EZ-ECL (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel). La quimioluminiscencia fue registrada con el equipo Discovery 12iC Ultralum (Claremont, USA) y digitalizada con el programa UltraQuant (Ultralun INC). Las intensidades de las bandas resultantes fueron cuantificadas por densitometría utilizando el programa UN-SCAN-IT.

### **5.4 Determinación de la vida media de HIF1 $\alpha$ .**

Las células HT29(US) (M1 y C14) fueron tratadas por 18 h con DFO para simular hipoxia química como se indica en 3.2. A continuación, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco con el inhibidor de la síntesis proteica Cicloheximida (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 0 a 90 min. Finalizado el experimento, se obtuvo un

extracto total de proteínas y los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  fueron determinados por Western Blot, como se indica en 5.1 y 5.2. Luego, las imágenes digitalizadas fueron analizadas por densitometría. Los valores densitométricos de los niveles de HIF1 $\alpha$ , normalizados por Actina, fueron ajustados con una ecuación de decaimiento de primer orden ( $y=y_0 e^{-kt}$ , donde “k” es la constante de decaimiento, “Y” los niveles de HIF1 $\alpha$  y “t” el tiempo en min) con el programa GraphPad Prisma 5. A partir de esta ecuación se determinó la constante de decaimiento (k) de los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  para células HT29(US) (clones M1 y C14) para cada experimento. La vida media de HIF1 $\alpha$  para cada condición y para cada experimento se calculó usando la expresión  $T_{1/2} = -0,693/k$ . Finalmente, los valores de vida media se promedian y se compararon con una prueba de t no pareada, como se indica en 12.

## **6. Inmunofluorescencia indirecta, cuantificación de imágenes**

### **6.1 Inmunofluorescencia indirecta**

Luego del tratamiento, células sembradas sobre cubreobjetos fueron lavadas con PBS frío, fijadas por 20 min con paraformaldehído al 4% (disuelto en Tampón PIPES 100 mM pH 6,8, con KOH 0,04M, EGTA 2 mM y MgCl<sub>2</sub> 2 mM). A continuación, las células fueron lavadas con PBS frío y permeabilizadas por 10 min con Tritón X-100 0,1% en PBS. Luego de tres lavados con PBS frío, las células fueron bloqueadas con BSA al 2% en PBS durante 1 h. Después, las células fueron incubadas a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos anti-Caveolina-1 policlonal (1:200), anti-HIF1 $\alpha$  monoclonal (1:150), excepto los experimentos de colocalización de Caveolina-1 con NOS3 (anti-NOS3, 1:200) donde los anticuerpos fueron incubados por 1 h a 37°C. Posteriormente, las células fueron incubadas por 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios caprinos anti-IgG de conejo acoplado a Cy3 (1:200), anti-IgG de ratón acoplado a FITC (1:200) o Extravidina TRITC (1:400) preparados en BSA 2%. Luego, las células fueron marcadas con DAPI (0,4  $\mu$ g/mL) por 10 min. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS y una vez con agua nanopura

previo a su montaje sobre portaobjetos con la solución de montaje Mowiol. Las muestras se visualizaron en un microscopio Olympus modelo Fluoview FV1000, objetivo Plapon 60X (Biomedical Neuroscience Institute, Facultad de Medicina, Universidad de Chile). La superposición de las imágenes se realizó con el programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). La reconstrucción en 3D y el corte horizontal de las secciones ópticas se realizó con el programa Imaris (Bitplane AG, Zurich, Suiza).

## **6.2 Cuantificación de las imágenes**

La cuantificación de la fluorescencia de HIF1 $\alpha$  se realizó con el programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Para ello, se consideró como foco, el plano donde se observó la mayor área de los núcleos para un campo de células, mediante la observación de la tinción con DAPI. Una vez definido este foco, se tomaron fotografías de campos aleatorios con al menos 4 células por campo, tomando un total de 7 campos para la condición normoxia y 14 campos para hipoxia. A partir de la imagen correspondiente a la tinción con DAPI, se definió el área nuclear, mediante la generación de una imagen binaria, previo ajuste del umbral y posterior definición de la región de interés óptico (ROI) con la herramienta varita mágica. Luego, se definió el ROI para la imagen correspondiente a la tinción para HIF1 $\alpha$  mediante la herramienta ROI Manager y se cuantificó el área y el promedio de fluorescencia para el ROI definido. Como control del fondo, se cuantificó la fluorescencia correspondiente a HIF1 $\alpha$  en muestras que no fueron incubadas con el anticuerpo anti-HIF1 $\alpha$ . Los resultados obtenidos fueron normalizados por el área nuclear, siendo expresados como Intensidad de Fluorescencia en Pixeles/ $\mu\text{m}^2$ .

## **6.3 Deconvolución de las imágenes**

Para los experimentos de colocalización de Caveolina-1 y NOS3, las imágenes adquiridas fueron deconvolucionadas con el programa Huygens Professional

software (Hilversum, Netherlands). Las imágenes en formato 8 bit (tamaño pixel 0.103  $\mu\text{m}$ ), fueron deconvolucionadas en el modo CMLE, usando una razón señal/ruido 10, con corrección manual del ruido y 40 ciclos de iteraciones. El ruido de las imágenes se calculó con el programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), tomando como valor el promedio de al menos 5 campos aleatorios.

## **7. Cuantificación del mRNA de genes blanco de HIF1 mediante RT-PCR semicuantitativo y PCR en tiempo real.**

### **7.1 Extracción RNA desde cultivos celulares**

Una vez finalizado los experimentos, las células fueron recolectadas con Trizol (800  $\mu\text{L}$  por placa de 60 mm) (Invitrogen, USA) y se realizó una extracción de las proteínas y DNA con cloroformo (200  $\mu\text{L}$ ). Luego de centrifugar a 16.000xg por 20 min a 4°C, se tomó la fase acuosa, la cual fue precipitada con isopropanol a -20°C por 20 min. A continuación, el precipitado fue lavado dos veces con etanol al 80%, centrifugado a 16.000xg por 5 min a 4°C. El precipitado fue secado y el pellet resuspendido en agua nanopura. Finalmente, el RNA fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm y su integridad fue verificada en geles de agarosa al 1% con Gel Red (Biotium Inc, Hayward, CA, USA).

### **7.2 Tratamiento con DNAsa y transcripción reversa.**

El RNA (1  $\mu\text{g}$ ) fue tratado con 0,1U/ $\mu\text{L}$  DNAsa (Promega, USA) a 37°C por 30 min en un tampón consistente en 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM  $\text{MgSO}_4$  y 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . La reacción fue finalizada incubando las muestras a 65°C por 10 min con la solución de detención [1,8 mM EGTA (pH 8.0)]. Luego, se agregaron los partidores al azar (5 ng/mL) a 70°C por 5 min y la mezcla se incubó en hielo por 10 min. A continuación, se agregó la enzima transcriptasa reversa M-MLV 5 U/ $\mu\text{L}$  en un tampón de 50 mM Tris-HCl pH 8.3 con 75 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT, 25

U/μL Inhibidor de Ribonucleasa (RNasin) y 0,5 mM dNTPs. Las muestras se incubaron por 2 h a 42°C y la enzima fue inactivada a 95°C por 5 min.

### 7.3 Reacción de PCR semicuantitativo

Los cDNAs para VEGF, GLUT1 (dilución 1:5), LDH-A (dilución 1:10), Caveolina-1, 18S (dilución 1:100, control interno), Actina (ratón, control interno) fueron amplificados usando la lista de partidores detallados en la Tabla 2. Los cDNAs fueron amplificados con la enzima GoTaq® Flexi DNA Polimerasa 2 U/μL, en un tampón consistente en 0,25 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 μM Partidor sentido, 0,4 μM Partidor antisentido y tampón 5X Green GoTaq® Flexi (pH 8.5). Cada ciclo de amplificación consistió en etapas sucesivas de 1 min a 94°C, 55°C y 72°C. Los productos de PCR fueron analizados después de 25 ciclos de amplificación en geles de agarosa al 2% con Gel Red (Biotium Inc, Hayward, CA, USA). Las intensidades de las bandas resultantes fueron cuantificadas por densitometría utilizando el programa UN-SCAN-IT.

Gen	Partidor	Secuencia 5'→3'	Amplicón (pb)	Uso
VEGF	Sentido	AGGCCAGCACATAGGAGAGA	104,236 y 315	PCR qPCR
	Antisentido	ACCGCCTCGGCTTGTCACAT		
GLUT-1	Sentido	CGGGCCAAGAGTGTGCTAAA	283	PCR
	Antisentido	TGACGATACCGGAGCCAATG		
LDH-A	Sentido	GCCCGACGTGCATTCCCGATTCTT	361	PCR
	Antisentido	GACGGCTTTCTCCCTCTTGCTGACG		
18S	Sentido	CGCCCCCTCGATGCTCTTAG	377	PCR
	Antisentido	CGGCGGGTCATGGGAATAAC		
Caveolina-1	Sentido	GGGCAACATCTAGAAGCCCAACAA	372	PCR
	Antisentido	CTGATGCACTGAATTCCAATCAGGAA		
mActina	Sentido	CATGAGGTAGTCTGTCAGGTC	350	PCR
	Antisentido	GCATTGTAACCAACTGGGACG		
mActina	Sentido	TACCACCATGTACCCAGGCA	97	qPCR
	Antisentido	CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT		

**Tabla 2: Listado de Partidores y Tm utilizados para PCR convencional y qPCR.**

En la tabla se detallan las secuencias, en sentido 5' → 3' de los partidores utilizados para PCR o qPCR. El tamaño del producto de PCR se indica en pares de bases (pb). Los partidores diseñados para ratón se indican con la letra m.

#### **7.4 Reacción de PCR en tiempo real (qPCR).**

Mediante PCR en tiempo real se confirmaron algunos resultados obtenidos por PCR semicuantitativo de la expresión de VEGF en tumores. La amplificación de los productos de PCR (VEGF y Actina) se realizó con la mezcla de reacción consistente en 12,5  $\mu\text{L}$  de Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Fermentas, Vilnius, Lituania), 5  $\mu\text{L}$  de cDNA (dilución 1:7,5), 1  $\mu\text{L}$  partidor sentido (5  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  partidor antisentido (5  $\mu\text{M}$ ) y 5,5  $\mu\text{L}$  de agua nanopura. La reacción se llevó a cabo en el equipo Stratagene Mx3000P, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La expresión relativa de VEGF y Actina se calculó con el método del  $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

### **8. Ensayos de reporteros**

#### **8.1. Medición de la actividad transcripcional de HIF**

Las líneas celulares fueron transfectadas con el plasmidio reportero de la actividad de HIF pGL3-HRE (Brown et al., 2006) y el plasmidio de expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa pON. Luego de 24 h de hipoxia, las células fueron lisadas con un tampón consistente en 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.9), 2.5 mM DTT y 0,5% Triton X-100. Después de 10 min de incubación, los extractos fueron centrifugados a 16.000xg por 5 min.

A partir de este extracto, se determinó la actividad luciferasa en un luminómetro, al agregar 50  $\mu\text{L}$  de solución KTME (100 mM Tris HCl (pH 7.8), 10 mM  $\text{MgSO}_4$  y 2 mM EDTA), 0.073 mM Luciferina y 5.5  $\mu\text{M}$  de ATP en placas blancas de 96 pocillos. Los valores de luminiscencia obtenidos fueron normalizados mediante la cuantificación de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa determinada para cada extracto. La actividad de la  $\beta$ -galactosidasa fue determinada por la metabolización del sustrato 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) a 37°C por 1-4 h, la que se registró mediante espectrofotometría a 410 nm en un lector de ELISA (VERSA Max, Molecular Devices). Los resultados normalizados de luminiscencia, fueron

expresados como veces de incremento de la Actividad Luciferasa con respecto al control.

## **9. Ensayos de viabilidad y ciclo celular.**

### **9.1 Determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo**

La cuantificación del porcentaje de células vivas, apoptóticas y necróticas se realizó de acuerdo a lo publicado previamente por nuestro laboratorio (Hetz et al., 2002). Luego del tratamiento, las células fueron recolectadas con tripsina-EDTA por 5 min. A continuación la tripsina fue neutralizada agregando medio con 10% FBS y las células fueron centrifugadas a 500xg por 5 min. Luego el pellet de células fue resuspendido con 400  $\mu$ L de una solución 10  $\mu$ g/mL de yoduro de propidio. La suspensión de células fue analizada en citómetro de flujo FACS Canto (Beckton Dickinson, USA). La cuantificación de las poblaciones celulares viables, necróticas y apoptóticas se realizó mediante histogramas para la fluorescencia del yoduro de propidio con el programa WinMDI Versión 2.8 y los resultados se expresaron porcentualmente.

### **9.2 Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo**

Finalizado el experimento, las células fueron recolectadas con tripsina-EDTA por 5 min, la que fue neutralizada con medio de cultivo conteniendo 10% FBS. A continuación, la suspensión fue centrifugada a 1000xg por min. Luego, el pellet de células fue cuidadosamente resuspendido en 400  $\mu$ L de metanol a -20°C e incubadas a -20°C por 15 min. A continuación, el pellet fue centrifugado a 1000xg por 5 min y resuspendido en 1 mL de PBS para citometría de flujo. De la suspensión de células, 500  $\mu$ L fueron tratados con 5  $\mu$ L de RNAsa A (10 mg/mL) y las células fueron disgregadas cuidadosamente 3-5 veces con una jeringa de insulina. Luego de 20 min de tratamiento con la RNAsa A, se agregó 5  $\mu$ L de solución de yoduro de propidio (1 mg/mL) y la suspensión de células fue analizada en citómetro de flujo FACS Canto (Beckton Dickinson, USA). Para cuantificar el

contenido de DNA de las muestras, se analizaron histogramas para la intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio con el programa WinMDI Versión 2.8. La distribución del ciclo celular para cada condición, se expresó como el porcentaje de células determinado en cada etapa del ciclo celular.

## **10. Ensayos *in vivo* con ratones inmunosuprimidos SCID-Beige y análisis del tejido tumoral.**

### **10.1 Ensayos de formación de tumores en ratones inmunosuprimidos SCID-Beige.**

Ratones SCID-Beige de 6 a 8 semanas de vida, fueron mantenidos en una instalación libre de patógenos en el MTC Animal Unit (Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology) del Karolinska Institute (Estocolmo, Suecia). Los ratones fueron inoculados en ambos flancos por la vía subcutánea con células HT29(US) ( $1 \times 10^6$ ) clones M1 y C14 o células HT29(US) co-transfectadas con C14/HIF1 $\alpha$ , C14/pcDNA, M1/HIF1 $\alpha$ , M1/pcDNA resuspendidas en 200 $\mu$ L de PBS estéril, previa inducción de la expresión de Caveolina-1 con IPTG 1 mM por 24 h. Una vez que el tumor fue palpable, el diámetro del tumor fue medido con un pie de metro dos veces a la semana por el personal del departamento de Microbiología, Biología Celular y Tumoral del Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia. El volumen de los tumores formados fue calculado utilizando la ecuación  $V = (D \times d^2 \times \Pi) / 6$ , donde D corresponde al diámetro mayor, d al diámetro menor registrado. Finalmente, una vez que los tumores alcanzaron los 523 mm<sup>3</sup> (límite permitido por el comité de ética del Karolinska Institute) los animales fueron sacrificados por el personal del departamento de Microbiología, Biología Celular y Tumoral del Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia, de acuerdo a las normas internas del Instituto Karolinska. Cuando fue pertinente, se realizó la extracción quirúrgica de los tumores para su posterior análisis.

## **10.2 Obtención de extractos totales de proteínas a partir de tumores de células HT29(US).**

Ratones SCID-Beige mantenidos en una instalación libre de patógenos, fueron inoculados con células HT29(US) clones M1 y C14, los tumores formados medidos y los animales sacrificados como se indica en 10.1. A los 29 días post-inoculación los animales fueron sacrificados y se extrajo quirúrgicamente el tumor. El tumor cortado en trozos pequeños con bisturí estéril y homogenizado con buffer de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio y 0.1% SDS, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa). Luego, el tumor fue sonificado a alta velocidad con un homogenizador a 4°C. Para disgregar en su totalidad el tejido, el homogenizado resultante fue sometido a tres ciclos de congelación con hielo seco y descongelación a temperatura ambiente. A continuación el homogenizado fue clarificado por centrifugación a 16.000xg por 15 min a 4°C, se rescató el sobrenadante y las proteínas fueron cuantificadas con el kit BCA (Pierce).

## **10.3 Obtención de líneas celulares *ex-tumor* desde tumores de células HT29(US).**

Se establecieron líneas celulares *ex-tumor* a partir de tumores formados en ratones SCID-Beige, como se indica en 10.1. Luego del sacrificio de los animales, los tumores fueron extirpados quirúrgicamente, cortados en trozos pequeños y digeridos con tripsina por 15 min. A continuación, las células obtenidas fueron subcultivadas por dos pasajes con DMEM alta glucosa 10% FBS (Bender et al., 2000). Cuando correspondió, las células *ex-tumor* fueron tratadas con IPTG 1 mM por 24 h. La confluencia al final del experimento fue de un 70%.

## **11 Ensayos *in vivo* con ratones inmunocompetentes C57BL/6 y análisis del tejido tumoral.**

### **11.1 Ensayos de formación de tumores en ratones inmunocompetentes C57BL/6.**

Luego de 48 h de inducción de la expresión de Caveolina-1 con IPTG 1 mM,  $3 \times 10^5$  células B16F10 establemente transfectadas con Caveolina-1 (población batch Mock y Caveolina-1) fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de suero fisiológico estéril e inoculadas por la vía subcutánea en ratones C57BL/6 de 6 a 8 semanas de vida, peso promedio 20 g, en el bioterio del Centro de Estudios Moleculares de la Célula, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Dependiendo del experimento, los animales fueron inoculados diariamente por vía intraperitoneal, con el inhibidor general de las NOS, L-NAME, disuelto en PBS estéril (7.5, 15 ó 30 mg/kg de peso en un volumen de 100  $\mu$ L). Una vez palpable, los tumores fueron medidos a diario con un pie de metro y el volumen tumoral se calculó del mismo modo que en 10.1. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical una vez que los tumores alcanzaron un volumen de 1800 mm<sup>3</sup> (límite permitido por el comité de ética, Facultad de Medicina Universidad de Chile). Los tumores fueron extraídos quirúrgicamente para su posterior análisis. Todos estos experimentos fueron realizados siguiendo las normas definidas en protocolos aprobados por la comisión de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Protocolo CBA#0417 FMUCH).

### **11.2 Extracción de RNA desde tumores formados por células B16F10.**

A los 10 ó 16 días post-inoculación subcutánea de los ratones C57BL/6 con  $3 \times 10^5$  células B16F10 (Mock y Caveolina-1), como se indica en 11.1, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los tumores fueron extraídos quirúrgicamente. A continuación, los tumores fueron rápidamente congelados con hielo seco y cortado en trozos pequeños con bisturí. Para el análisis de la expresión de VEGF, se tomaron secciones centrales de los tumores, ya que se consideran como áreas hipóxicas (Yasui et al., 2010). Luego de disgregar

mecánicamente el tumor con un homogenizador en Trizol (200  $\mu$ L), se completó hasta 800  $\mu$ L con Trizol y se realizó una extracción con cloroformo (200  $\mu$ L). A continuación, la solución fue separada mediante centrifugación (16.000xg por 20 min a 4°C) y la fase acuosa fue sometida nuevamente a una extracción con Trizol:Cloroformo (400  $\mu$ L: 100  $\mu$ L, respectivamente), logrando mejorar la pureza del RNA obtenido al final del procedimiento. Luego de la separación, la fase acuosa fue precipitada con isopropanol y se continuó el protocolo del mismo modo que en 7.1.

## **12. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Los resultados se compararon utilizando la prueba de t no pareada de dos colas. Para comparaciones múltiples, como para los ensayos de formación de tumores se utilizó un test de ANOVA de dos vías con el post-test de Bonferroni. Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

Para evaluar una eventual correlación entre volumen tumoral y expresión del mRNA de VEGF se calculó el coeficiente de Spearman r, con el programa GraphPad Prisma 5 (San Diego, California, USA). El coeficiente de Spearman se emplea para datos que no poseen distribución normal y presentan un carácter monotónico. Un coeficiente r (+1) indica perfecta correlación de los datos. Por el contrario, un valor r (-1) indica correlación negativa de los datos y un r (0) indica ausencia de correlación entre los datos experimentales.

## RESULTADOS

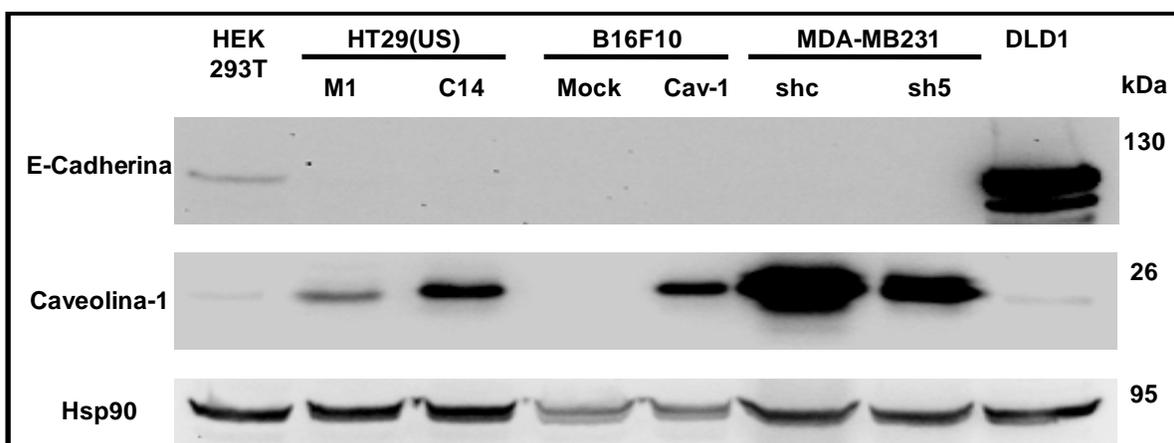
### SECCIÓN 1

**Objetivo Específico 1: Determinar si Caveolina-1 inhibe la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  en hipoxia.**

#### **1.1 Determinar el efecto de la presencia de Caveolina-1 en la actividad de HIF en hipoxia**

Para abordar el primer objetivo de Tesis, fue necesario definir los modelos celulares de trabajo. Resultados de nuestro laboratorio, indican que E-Cadherina promueve pero no es esencial para el efecto supresor de tumor de Caveolina-1 (Bender et al., 2000; Lobos-Gonzalez L., 2013). Por lo tanto, se utilizaron líneas celulares carentes de esta proteína, como las de cáncer colon HT29(US) transfectadas con pLacIOP y pLacIOP(Caveolina-1) (clones M1 y C14), cáncer de mama MDA-MB231 transducidas con sh-sc o sh-Cav-1-5, melanoma murino B16F10 transfectadas con pLacIOP o pLacIOP(Caveolina-1) (población batch Mock y Caveolina-1). Estas fueron cultivadas como se describió en la metodología y mediante Western blot se analizaron los niveles de Caveolina-1 y E-Cadherina (**Figura 4**). Los resultados mostraron que estas líneas celulares efectivamente tienen niveles prácticamente indetectables de E-Cadherina, comparado con DLD-1 (control positivo) o HEK293T (menor expresión de E-Cadherina). Como es esperable, se indujo la expresión de Caveolina-1 luego del tratamiento con IPTG 1 mM en las líneas celulares HT29(US)(C14) y B16F10(Cav-1), mientras que el silenciamiento de Caveolina-1 en la línea MDA-MB231 redujo la expresión de Caveolina-1. Las líneas celulares de adenocarcinoma de colon HT29(US) y de melanoma murino B16F10 además de carecer de E-cadherina fueron usados para experimentos tanto *in vivo*, debido a que ambas líneas celulares forman tumores subcutáneos cuando son inoculados en ratones inmunosuprimidos e inmunocompetentes, respectivamente (Bender et al., 2000; Nicolson et al., 1978). En tanto, para experimentos de silenciamiento de Caveolina-1 se eligió la línea de cáncer de mama MDA-MB231 previamente caracterizada en el laboratorio (Urta et

al., 2012) y células HEK293T para transfecciones transitorias de pLacIOP(Caveolina-1).

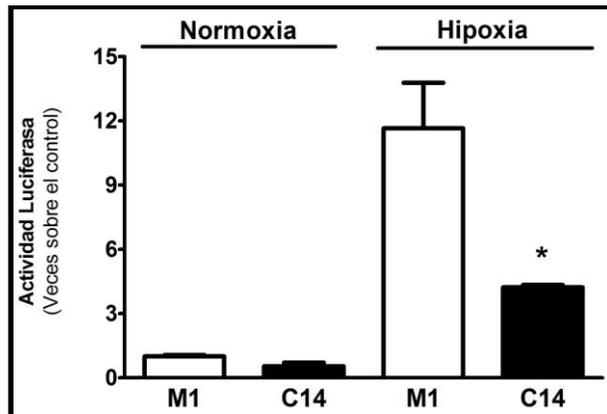


**Figura 4: Caracterización de los niveles proteicos de Caveolina-1 y E-Cadherina en diferentes líneas celulares.**

Las líneas celulares HEK293T, HT29(US) (clones M1 y C14), B16F10 (Mock y Cav-1), MDA-MB231 (shc y sh5) y DLD-1 fueron cultivadas hasta alcanzar el 70% de confluencia. Las líneas celulares HT29(US) y B16F10 fueron incubadas por 24 ó 48 h con IPTG 1 mM, para inducir la expresión de Caveolina-1, respectivamente. A continuación, las células fueron lisadas, obteniéndose un extracto total de proteínas, a partir del cual se analizaron los niveles proteicos de las proteínas E-Cadherina, Caveolina-1 y Hsp90 (control de carga) por Western Blot. El peso molecular de las proteínas es indicado en kDa.

Para evaluar si la presencia de Caveolina-1 inhibe a HIF1 $\alpha$ , se realizaron ensayos de gen reportero de HIF en células HT29(US) (clones M1 y C14) (objetivo específico 1.1), transfectando las células con el plasmidio reportero de HIF pGL3-HRE. Este plasmidio posee tres copias de elementos de respuesta a hipoxia (HRE, por hipoxia-responsive-elements) provenientes de la región promotora del gen de la enzima fosfoglicerato quinasa (Brown et al., 2006). Después de 24 h post-transfección e inducción de la expresión de Caveolina-1, las células fueron incubadas en normoxia o hipoxia por 24 h adicionales (**Figura 5**). En normoxia, no se observó diferencias significativas en la actividad de HIF, dependiente de la sobreexpresión de Caveolina-1. Por otro lado, la hipoxia incrementó 14 veces la

actividad del gen reportero de HIF en comparación a normoxia. Este incremento en la actividad del gen reportero de HIF, se vio reducida en un 60% cuando se sobreexpresó Caveolina-1, comparado con la condición Mock (**Figura 5**).

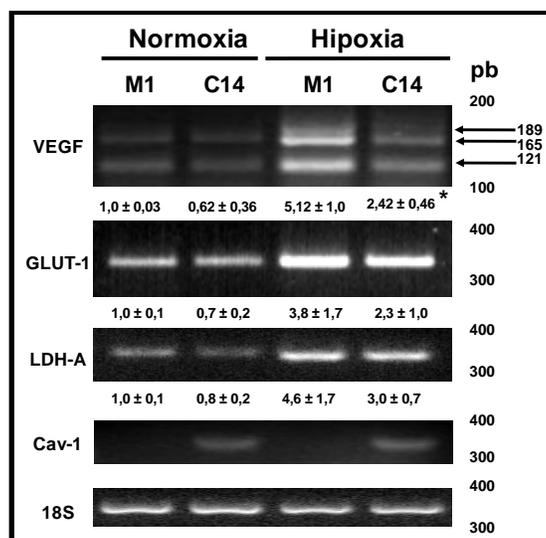


**Figura 5: Efecto de la presencia de Caveolina-1 sobre la actividad transcripcional de HIF en células HT29(US).**

Células HT29(US) (M1 y C14) fueron co-transfectadas con los plasmidios pON y pGL3HRE usando Superfect. Luego de 24 h de inducción de la expresión de Caveolina-1 con IPTG 1 mM, las células fueron expuestas a hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94%N<sub>2</sub>) o bien normoxia (5% CO<sub>2</sub> + 95% aire) por 24 h en presencia de IPTG 1 mM. Finalizado este período, se cuantificó la actividad luciferasa y β- galactosidasa en los extractos celulares. La actividad luciferasa pGL3HRE de cada condición fue normalizada por la actividad de la β-galactosidasa. Los resultados de “Actividad Luciferasa” pGL3-HRE, son expresados como veces sobre el control y corresponden al promedio ± SEM de n = 3 experimentos (\*p≤0.05 M1 vs C14 en hipoxia).

Para confirmar que la reducción en la actividad de HIF observada en células transfectadas con Caveolina-1 es funcional, se determinó los niveles de mRNA de genes blancos de HIF1α por RT-PCR (objetivo específico 1.2). Para ello, se analizó los niveles de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), transportador de glucosa 1 (GLUT1) y lactato deshidrogenasa A (LDH-A) (Jensen et al., 2006; Lee et al., 2009; Rankin and Giaccia, 2008; Semenza, 2011) (**Figura 6**). Se han descrito varias isoformas de VEGF, las cuales codifican para isoformas tanto secretables como no secretables. Mediante RT-PCR pudimos amplificar tres isoformas de mRNA (121, 165 y 189) de las cuales las isoformas

121 y 165 son traducidas a isoformas secretables de VEGF (Campos et al., 2007; Paule et al., 2010; Robinson and Stringer, 2001; Zygalki et al., 2007). En normoxia todos los genes blancos fueron detectados, no observándose diferencias significativas asociadas a la sobreexpresión de Caveolina-1. Por otro lado en hipoxia, se detectó un incremento de 4-5 veces en los niveles de expresión de todos los genes analizados. El análisis densimétrico de los productos de PCR, reveló que la sobreexpresión de Caveolina-1 se asoció con la reducción de la expresión del mRNA de VEGF (\* $p \leq 0,05$  M1 vs C14 en hipoxia). Para GLUT-1 y LDH-A se observó una reducción en la expresión de los mRNA; sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 6). En su conjunto, los resultados indican que la disminución de la actividad del gen reportero de HIF mediada por Caveolina-1, se traduce en una reducción en la expresión de genes blanco de HIF1 $\alpha$  en hipoxia (Figuras 5 y 6).

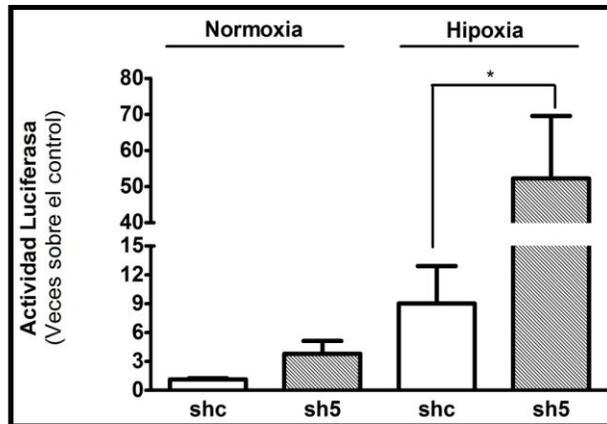


**Figura 6: Expresión de genes blancos de HIF1 $\alpha$  en células HT29(US) en hipoxia.**

Células HT29(US)(M1 y C14) fueron cultivadas en IPTG 1 mM 24 h previas a incubar en normoxia (5% CO<sub>2</sub> + 95% aire) o hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94%N<sub>2</sub>). Luego de la extracción el mRNA con TriZol y transcripción reversa, se amplificaron los cDNAs de VEGF, GLUT-1, LDH-A, Caveolina-1 (Cav-1) y 18S (control interno) mediante PCR semi-cuantitativo. Los valores numéricos corresponden al promedio ± SEM de al menos 3 experimentos. Para VEGF, los resultados se expresaron como el promedio ± SEM para la suma de todas las isoformas de VEGF. El peso molecular de los fragmentos se indica en pares de bases (pb) y con flechas se destacan las isoformas 121, 165 y 189 de VEGF (\*  $p \leq 0,05$  M1 vs C14 en hipoxia).

Para confirmar que la inhibición de HIF por Caveolina-1 no era un evento exclusivo de la línea celular HT29(US), se hicieron experimentos en células HEK293T y B16F10. Células HEK293T fueron tranfectadas con el método del fosfato de calcio con el plasmidio pLacIOP(Caveolina-1) o pLacIOP y se evaluó la actividad del gen reportero de HIF (**Figura Suplementaria S1**). En normoxia, no se observaron variaciones en la respuesta de este sistema. Por otro lado, en hipoxia la sobreexpresión transitoria de Caveolina-1 coincidió con una reducción en la actividad del gen reportero de HIF, comparado con las células tranfectadas con pLacIOP. Resultados similares se obtuvieron en la línea B16F10(Mock) y (Cav-1) establemente tranfectada con el plasmidio reportero de la actividad de HIF pcDNA-HRE-Luc (variante del plasmidio pGL3-HRE subclonada en el laboratorio, **Figura Suplementaria S2**). Por lo tanto, los resultados indican que la sobreexpresión de Caveolina-1 (tanto transitoria como estable) o la expresión transitoria o estable del gen reportero de HIF, coincide con la disminución de la actividad transcripcional de HIF en hipoxia.

Para reafirmar los resultados obtenidos mediante sobreexpresión de Caveolina-1, se evaluó mediante ensayo de gen reportero de HIF el efecto del silenciamiento de la Caveolina-1 endógena en células de cáncer de mama MDA-MB-231 (objetivo específico 1.3).



**Figura 7: Efecto del silenciamiento de la Caveolina-1 endógena en células MDA-MB231 sobre la actividad transcripcional de HIF en hipoxia.**

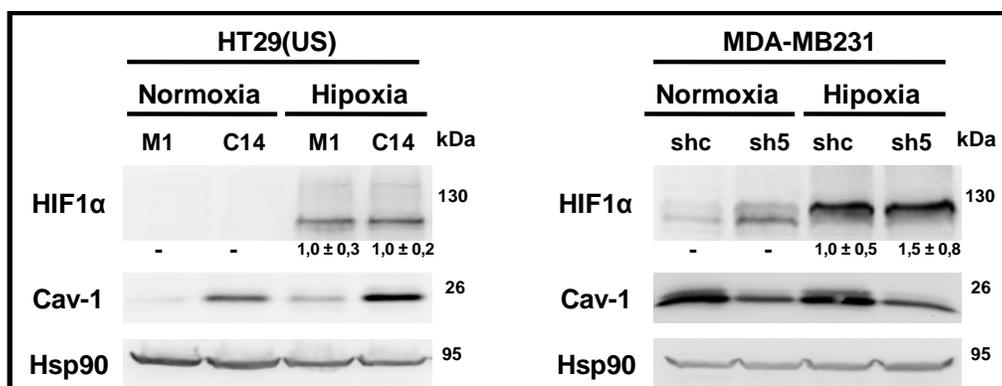
Células MDA-MB231 (sh5) o (shc), fueron co-transfectadas con los plasmidios pON y pGL3HRE utilizando Superfect. Después de la transfección (24 h), el medio de cultivo fue reemplazado y las células fueron incubadas en hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94%N<sub>2</sub>) o normoxia (5% CO<sub>2</sub> + 95% aire) por 24 h. Luego, se obtuvo extractos celulares a partir de los cuales se determinó la actividad luciferasa pGL3HRE de cada condición, la que fue normalizada por la actividad de la β-galactosidasa. Los resultados son expresados como “Veces sobre el Control” y corresponden al promedio ± SEM de n=3 experimentos (\* p≤0,05 shc vs sh5 hipoxia).

No se detectaron diferencias en la actividad de HIF en condiciones basales (normoxia). En tanto, la hipoxia incrementó la actividad del gen reportero de HIF, efecto que fue potenciado cuando se redujeron los niveles de Caveolina-1 con un shRNA (**Figura 7**). De este modo, la inhibición de la actividad de HIF es dependiente de la presencia de Caveolina-1 y es un evento que ocurre en líneas celulares de origen diverso (adenocarcinoma de colon, cáncer de mama, melanoma murino y embrionarias de riñón **Figuras 5, 7 y Figuras Suplementarias S1 y S2**).

### **1.2 Evaluar si la presencia de Caveolina-1 altera los niveles proteicos de HIF1α y la participación del dominio de andamiaje en el efecto inhibitorio sobre HIF1α**

La estabilización proteica de HIF1α en hipoxia es necesaria para su acción como factor de transcripción (Semenza, 2011). Se ha visto que, algunos fármacos inhibidores de HIF1α, como digoxina, actúan impidiendo la síntesis proteica de

HIF1 $\alpha$  (Zhang et al., 2008a). Nuestros resultados mostraron la inhibición en actividad del gen reportero de HIF por Caveolina-1 (**Figuras 5,7, S1 y S2**), por lo que quisimos investigar si la presencia de Caveolina-1 altera los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  (**Figura 8**).

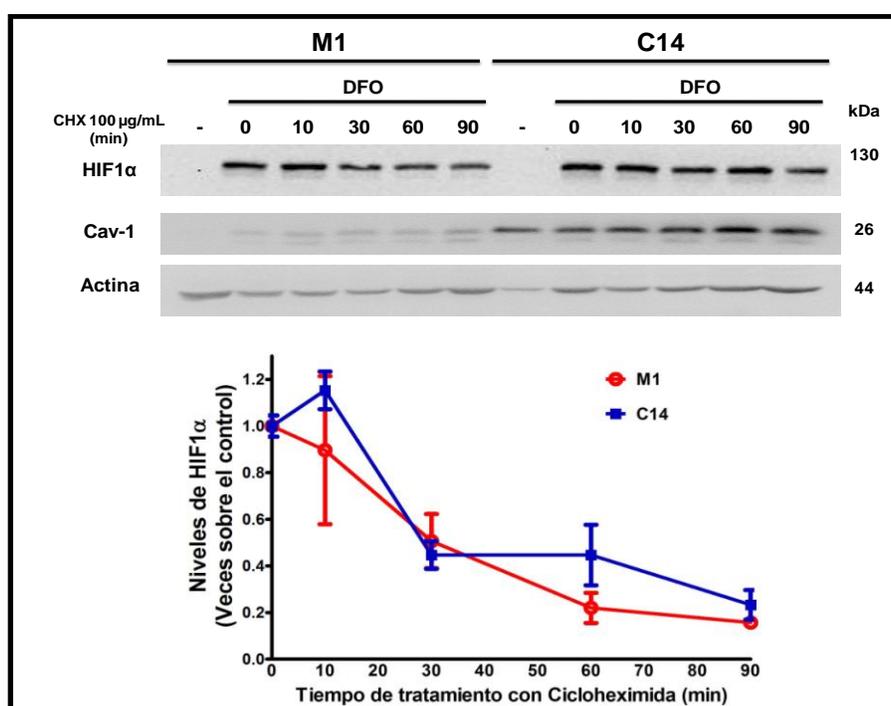


**Figura 8: Niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  en células HT29(US) y MDA-MB231 en hipoxia.**

**a)** Células HT29(US) (clones M1 y C14) y **b)** MDA-MB231 (shc y sh5), fueron sembradas en placas de cultivo celular por 18 a 24 h, con IPTG 1 mM para inducir la expresión de Caveolina-1 cuando correspondió. A continuación, las células fueron incubadas en hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94%N<sub>2</sub>) o normoxia (5% CO<sub>2</sub> + 95% aire) por 24 h en presencia de IPTG 1 mM. A continuación, las células fueron lisadas, se obtuvo un extracto de proteínas totales. A partir de este extracto, se determinaron los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$ , Caveolina-1, Actina y Hsp90 (controles de carga) por Western Blot, los que fueron cuantificados por densitometría. Los valores numéricos corresponden al promedio de los valores densitométricos  $\pm$  SEM de n = 3 experimentos. El peso molecular de las proteínas se indica en kDa.

En normoxia, HIF1 $\alpha$  no fue detectado en ninguna de las líneas celulares analizadas HT29(US), MDA-MB231 (**Figura 8**) o HEK293T (**Figura S3**) a diferencia de hipoxia donde se observó la fuerte estabilización de la proteína, lo que se asoció con el incremento en la actividad del gen reportero (**Figura 7**). Cabe destacar, que la sobreexpresión como el silenciamiento de Caveolina-1 en células HT29(US), o MDA-MB231, respectivamente, no modificó los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  en hipoxia, determinados mediante densitometría (**Figura 8**), indicando que la inhibición de la actividad transcripcional de HIF por Caveolina-1, no era el resultado de la reducción de los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  en hipoxia.

Los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  son finamente controlados por el sistema ubiquitina-proteosoma (Sutter et al., 2000; Yee Koh et al., 2008) y se ha visto que Caveolina-1 promueve degradación de la sintasa de óxido nítrico inducible (NOS2) por el proteosoma (Felley-Bosco et al., 2002; Felley-Bosco et al., 2000), por lo que quisimos investigar si Caveolina-1 altera la estabilidad proteica de HIF1 $\alpha$ , mediante ensayos de determinación de vida media en presencia del inhibidor de la síntesis proteica, cicloheximida (**Figura 9**).



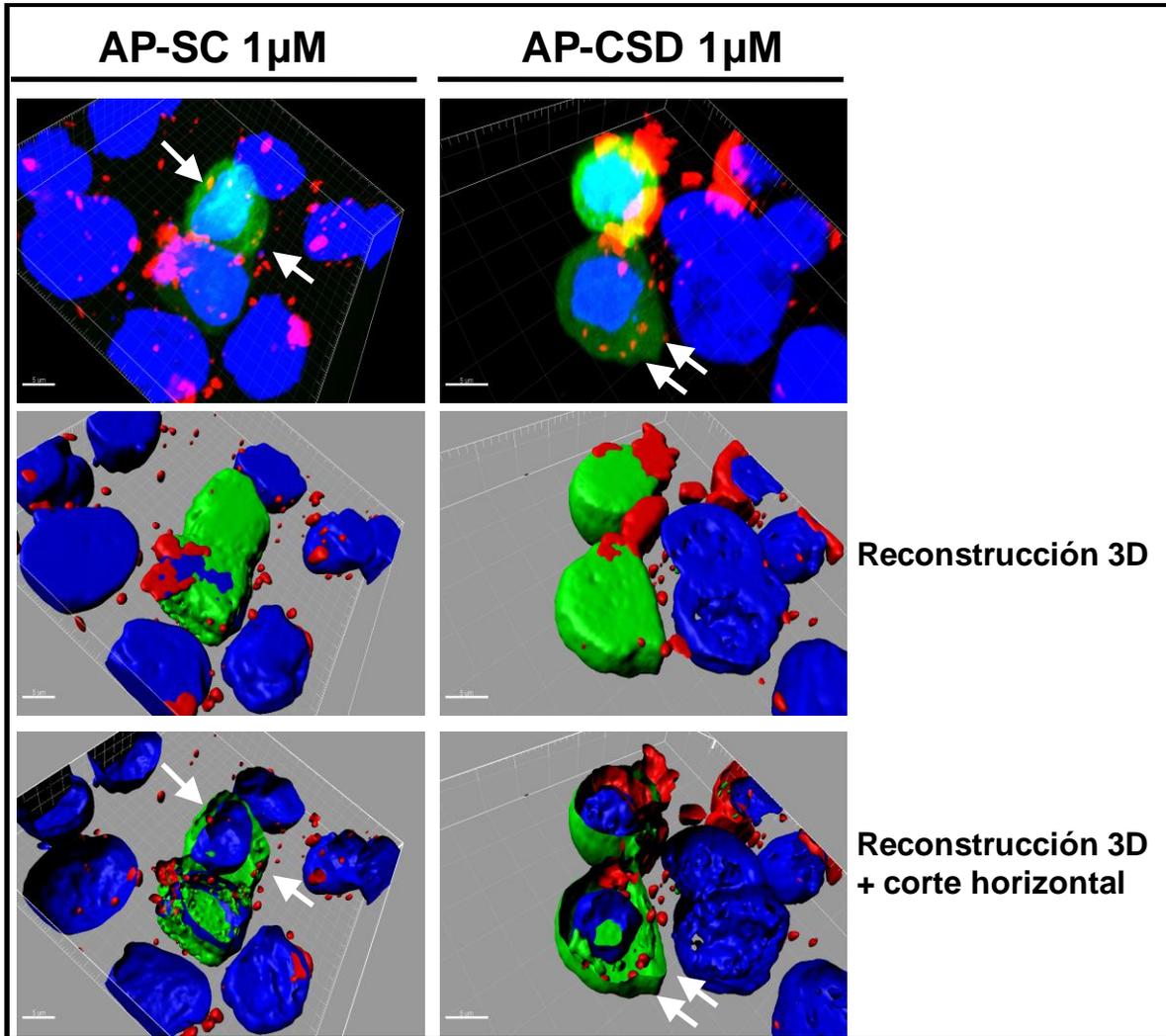
**Figura 9: Vida Media de HIF1 $\alpha$ .**

Células HT29(US) (clones M1 y C14) fueron sembradas por 24 h en presencia de IPTG 1 mM. Finalizado este periodo, se simuló hipoxia con DFO 200  $\mu$ M por 18 h y a continuación las células fueron tratadas con el inhibidor de la síntesis proteica Cicloheximida (100  $\mu$ g/mL) por 0 a 90 minutos, según se indica en la figura. Luego, las células fueron lisadas, obteniéndose un extracto de proteínas totales que fue resuelto en geles de poliacrilamida al 8% y mediante Western Blot, se realizó la inmunodetección de HIF1 $\alpha$ , Caveolina-1 y Actina (control de carga). El peso molecular de las proteínas se indica en kDa. Los niveles de HIF1 $\alpha$  y Actina fueron cuantificados por densitometría. Los valores densitométricos fueron ajustados con una ecuación de decaimiento de primer orden, donde los valores densitométricos obtenidos fueron graficados y se calculó el valor de vida promedio de HIF1 $\alpha$ , como se indica en Metodología, Sección 5.4. Este experimento corresponde al promedio  $\pm$  SEM de n=3 experimentos independientes.

En una primera etapa, se intentó realizar el experimento con células estimuladas en hipoxia. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales no pudimos detectar HIF1 $\alpha$  luego de 10 min de tratamiento con cicloheximida (resultado no mostrado). Por ello, la estrategia experimental consistió en simular hipoxia con el quelante de hierro, Deferroxamina (Kaidi et al., 2007; Wang and Semenza, 1993). Luego de 18 h post-tratamiento con DFO, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco con cicloheximida por los tiempos que se indican (**Figura 9**). El tratamiento con DFO indujo la estabilización de HIF1 $\alpha$ , comparado con la condición no tratada. El análisis densitométrico con posterior ajuste de los datos a una cinética de decaimiento de primer orden, no mostró diferencias significativas en la vida media de HIF1 $\alpha$  en células con o sin Caveolina-1. Los valores de vida media (min) fueron  $42 \pm 27$  y  $46 \pm 23$  para células HT29(US) M1 y C14, respectivamente. Por lo tanto, la inhibición de la actividad transcripcional de HIF por Caveolina-1, no involucra la disminución de los niveles proteicos o un incremento en la degradación de HIF1 $\alpha$  (**Figuras 8, 9 y S3**).

Para evaluar la participación del dominio de andamiaje del Caveolina-1 (objetivo específico 1.4), se usó un péptido correspondiente al dominio de andamiaje de Caveolina-1 (aminoácidos 82-101, péptido AP-CSD) y un péptido control con una secuencia al azar (scrambled, péptido AP-SC). Ambos péptidos fueron fusionados con una secuencia de internalización (tercera hélice del dominio de unión al DNA del factor de transcripción Antennapedia) y biotina, para su detección *in situ* (Bucci et al., 2000; Gratton et al., 2003). Para confirmar que el péptido es internalizado por las células, se realizó un ensayo de captación en células HT29(US) transfectadas con el plasmidio que codifica a la proteína fluorescente verde (GFP) y los péptidos fueron detectados con estreptavidina conjugada a tetrametilrodamina (Estreptavidina-TRITC). Post-incubación (4 h), ambos péptidos fueron detectados con estreptavidina-TRITC (tinción roja) en células GFP positivas, formando estructuras punteadas al interior de las células (flechas

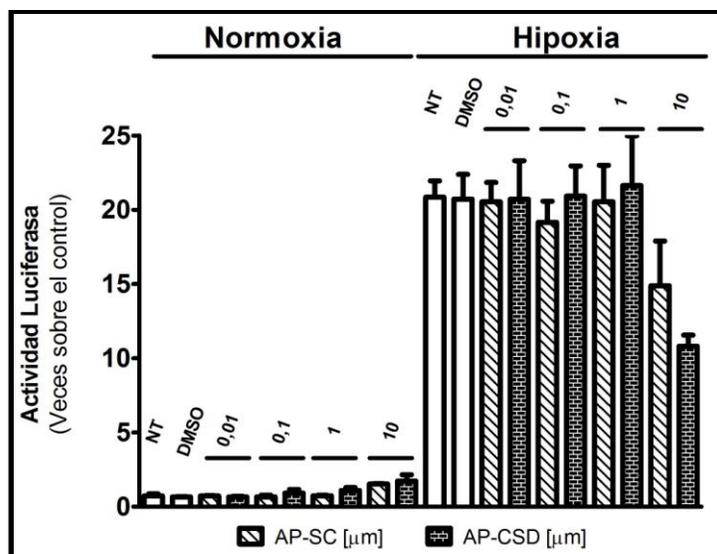
blancas, **Figura 10**). Sin embargo, cabe destacar que solo una pequeña fracción de los péptidos fue encontrada en el interior de las células.



**Figura 10: Ensayo de Captación de Péptido derivado del dominio de andamiaje de Caveolina-1.**

Células HT29(US) fueron transfectadas en suspensión con el plasmidio pEGFP-C1 usando Superfect y la suspensión celular fue sembrada sobre cubreobjetos por 18 h. Luego, las células fueron tratadas con los péptidos AP-SC (control) o AP-CSD 1 μM por 4 h en medio de cultivo libre de suero. A continuación, las células fueron fijadas, permeabilizadas, incubadas con BSA seguido de la incubación con Estreptavidina-TRITC por 1 h. El núcleo fue marcado con DAPI (azul), la célula completa con GFP (verde), los péptidos con Estreptavidina-TRITC (rojo) y las células fueron visualizados en microscopio Confocal. Se obtuvieron galerías en el eje Z de las células y las imágenes resultantes fueron procesadas en el modo de isosuperficie del programa Imaris. Este modo permite crear una imagen artificial a partir de los voxeles disponibles (Reconstrucción en 3D). Luego, la imagen obtenida fué recortada horizontalmente para obtener una mejor visualización del interior de la célula. Las flechas blancas indican los péptidos. Barra de magnificación 5 μm.

A continuación se determinó por ensayo de gen reportero de HIF el efecto del péptido correspondiente al dominio de andamiaje de Caveolina-1 (AP-CSD) y el péptido control (AP-SC) (Figura 11). En normoxia, la administración de ambos péptidos (AP-SC y AP-CSD) no alteró la actividad transcripcional de HIF. En hipoxia, se detectó un incremento de 20 veces del gen reportero de HIF, que no fue afectado por el vehículo (10% DMSO). El tratamiento con el péptido AP-CSD tampoco fue capaz de inhibir la actividad de HIF en un rango de concentraciones 0,001-1 $\mu$ M. A concentraciones más altas (10  $\mu$ M), se detectó una reducción en la actividad del gen reportero de HIF, efecto que fue similar al observado con el péptido control. Este resultado sugiere que la inhibición de la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  es independiente del dominio de andamiaje de Caveolina-1.

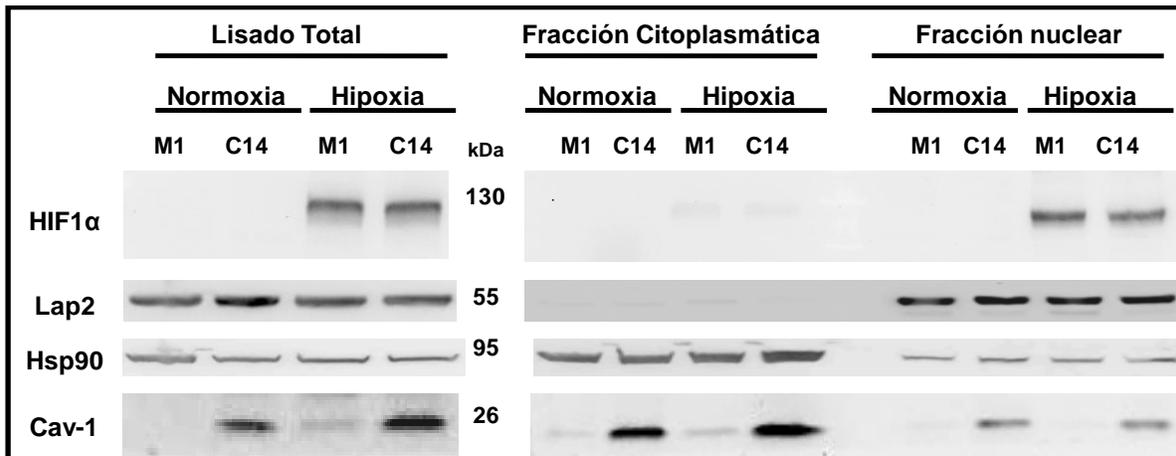


**Figura 11: Efecto del péptido AP-CSD sobre la actividad transcripcional de HIF en células HT29(US) en hipoxia.**

Células HT29(US) fueron co-transfectadas en suspensión con los plásmidos pON y pGL3HRE usando Superfect. Luego de 18 h post-transfección, las células fueron tratadas por 4 h con los péptidos AP-SC o AP-CSD (rango de concentración 0,01-10  $\mu$ M) o el vehículo dimetilsulfóxido 10% (DMSO) en medio de cultivo sin suero. Finalizado el tratamiento, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de cultivo suplementado con FBS y las células fueron cultivadas en normoxia o hipoxia por 24 h. La actividad luciferasa pGL3HRE de cada condición fue cuantificada en los extractos celulares y fue normalizada por la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados son expresados como "Veces sobre el Control" y corresponden al promedio  $\pm$  SEM de n = 3 experimentos.

### **1.3 Evaluar si la presencia de Caveolina-1 altera la translocación de HIF1 $\alpha$ al núcleo**

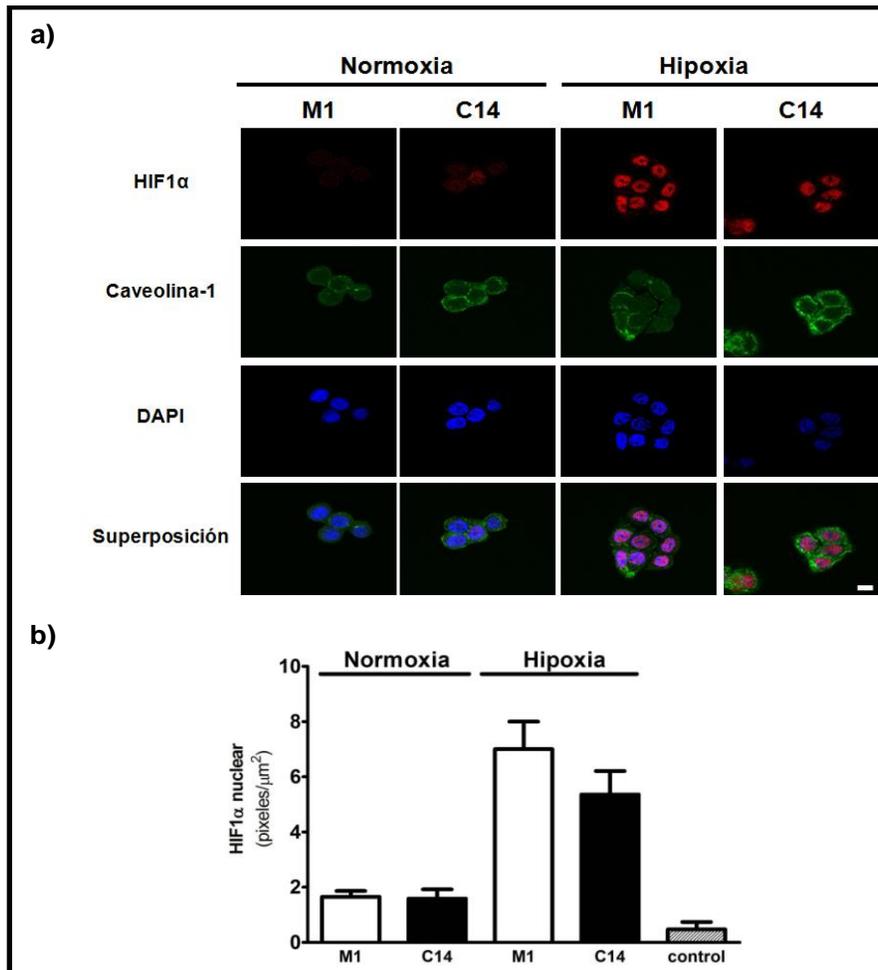
Para determinar si la sobreexpresión de Caveolina-1 altera la translocación de HIF1 $\alpha$  al núcleo (objetivo específico 1.5), debido a la secuestro del factor de transcripción se realizó un ensayo de fraccionamiento subcelular. Para ello, células HT29(US) fueron incubadas por 24 h en hipoxia (o normoxia) y se realizó el fraccionamiento con un kit comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante (**Figura 12**). Producto del procesamiento, se obtuvo tres fracciones (lisado total, citoplasma y núcleo). El análisis por Western blot de los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  reveló que la proteína fue indetectable en normoxia en todas las fracciones analizadas. Por otro lado, en hipoxia no se detectó diferencias en el nivel proteico de HIF1 $\alpha$  en el lisado total, consistentemente con lo observado previamente en las figuras 8 y S3. HIF1 $\alpha$  se presentó abundantemente en la fracción nuclear en comparación con la fracción citoplasmática, donde la proteína prácticamente fue indetectable en hipoxia. No se detectaron diferencias en los niveles de HIF1 $\alpha$  nuclear entre células transfectadas con Caveolina-1 en comparación al control Mock. Como control de pureza de las fracciones citoplasmáticas y nuclear, se analizó por Western blot Hsp90 y Lap2, respectivamente. Ambas proteínas fueron detectadas concentradas en sus respectivas fracciones. En tanto, Caveolina-1 se detectó en mayor abundancia en la fracción citoplasmática respecto a la fracción nuclear. Este resultado indica que la presencia de Caveolina-1 no alteraría la localización nuclear de HIF1 $\alpha$  después de 24 h en hipoxia.



**Figura 12: Distribución subcelular de HIF1 $\alpha$  en células HT29(US) en hipoxia.**

Células HT29(US) (M1 y C14) fueron cultivadas 24 h en presencia de IPTG 1 mM. Luego, las células fueron incubadas en normoxia o hipoxia por 24 h. A continuación, las células fueron recolectadas y se analizó el lisado total y las fracciones citoplasmáticas y nucleares utilizando el kit “NE-PER Nuclear and cytoplasmic extraction reagent”, siguiendo las instrucciones del proveedor. Mediante Western Blot, se determinó la distribución de HIF1 $\alpha$  y Caveolina-1 en las distintas fracciones. Lap2 y Hsp90 fueron utilizados como controles de pureza de las fracciones nucleares y citoplasmáticas, respectivamente. El resultado corresponde a una imagen representativa de 3 experimentos. El peso molecular de las proteínas se indica en kDa.

Para confirmar los resultados del fraccionamiento subcelular, se evaluó mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta la distribución de HIF1 $\alpha$  a 24 h de hipoxia (**Figura 13**). Después de 24 h de hipoxia se observó la translocación de HIF1 $\alpha$  al núcleo, en comparación a normoxia donde la proteína era indetectable. No se detectó colocalización entre ambas proteínas, ni en normoxia como hipoxia (**Figura 13a**), contrariamente a lo observado en experimentos de co-inmunoprecipitación realizados en células tratadas con DFO (resultado no mostrado). Por otro lado, la cuantificación de HIF1 $\alpha$  nuclear, no mostró diferencias dependientes de la presencia de Caveolina-1 (**Figura 13b**). Por lo tanto, los resultados indican que la sobreexpresión de Caveolina-1 en células HT29(US) no modifica la capacidad de HIF1 $\alpha$  de translocar al núcleo, ni favorece la formación de un complejo entre ambas proteínas.

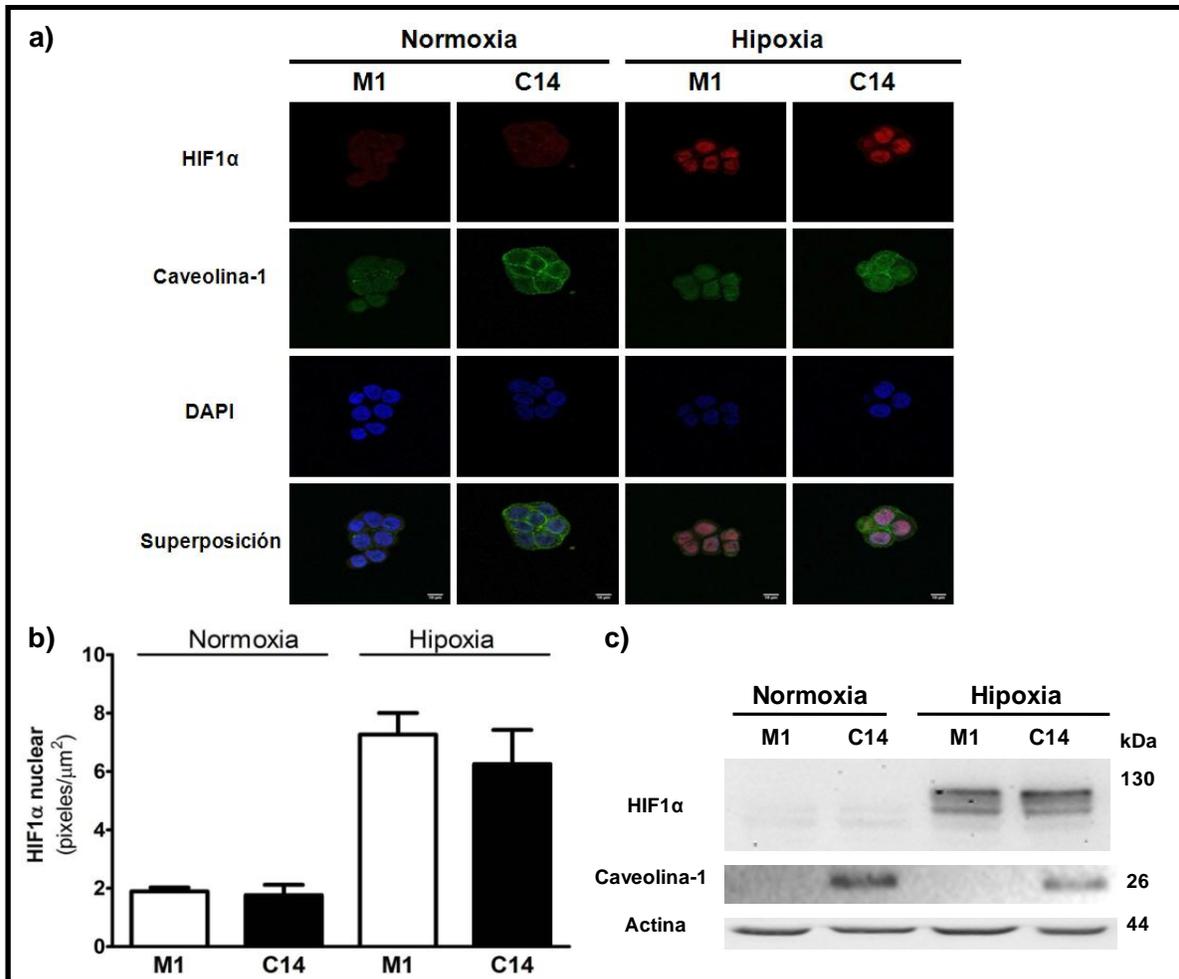


**Figura 13: Localización celular de HIF1 $\alpha$  y Caveolina-1 en células expuestas a hipoxia por 24 h.**

**a)** Células HT29(US) (M1 y C14) fueron sembradas sobre cubreobjetos por 24 h en presencia de IPTG 1 mM. Luego, las células fueron cultivadas en normoxia (5% CO<sub>2</sub> + 95% aire) o hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94%N<sub>2</sub>) por 24 h. A continuación, las células fueron fijadas, permeabilizadas, bloqueadas y posteriormente incubadas con los anticuerpos primarios contra Caveolina-1 y HIF1 $\alpha$ , seguidos de anticuerpos secundarios FITC, CY3 y DAPI para definir el núcleo. La visualización de las células se realizó mediante microscopia confocal. Caveolina-1 se visualiza en verde, HIF1 $\alpha$  rojo y el núcleo en azul. La superposición de las imágenes se realizó con el programa Image J. La barra de magnificación es 10  $\mu\text{m}$ . **b)** A partir de las imágenes obtenidas de (a) se definió la región de interés óptico (ROI) nuclear usando la imagen correspondiente a DAPI con el programa Image J. Con la herramienta ROI manager se cuantificó la intensidad de la tinción nuclear de HIF1 $\alpha$  (píxeles), la que fue normalizada por el área del ROI, según se indica en metodología. Para estimar el ruido de la técnica, se midió la fluorescencia de células que no fueron marcadas con el anticuerpo anti-HIF1 $\alpha$  (control). El resultado corresponde a la intensidad de fluorescencia (píxeles/ $\mu\text{m}^2$ ) para el promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

Debido a que la hipoxia como tal es un proceso dinámico, quisimos evaluar la distribución de HIF1 $\alpha$  mediante inmunofluorescencia indirecta a 4 h de hipoxia (**Figura 14**). A las 4 h de hipoxia, se detectó la estabilización de HIF1 $\alpha$  mientras que en normoxia la proteína fue prácticamente indetectable (**Figura 14c**). La estabilización de HIF1 $\alpha$  se asoció con la translocación de HIF1 $\alpha$  al núcleo, siendo indetectable en células en normoxia. Además, no se observó colocalización entre HIF1 $\alpha$  y Caveolina-1 (**Figura 14a**). Por otro lado, la cuantificación del contenido de HIF1 $\alpha$  en el núcleo no mostró diferencias entre células con o sin Caveolina-1 (**Figura 14b**).

Los resultados indican que la reducción en la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$ , mediada por la presencia de Caveolina-1 no se debe ni a la reducción de los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  (**Figuras 8 y S3**) ni a una reducción en la vida media de HIF1 $\alpha$  (**Figura 9**). Además, el efecto de Caveolina-1 sobre HIF1 $\alpha$  no se debe a la secuestro del factor de transcripción en el citoplasma (**Figuras 13a, 14a**), ni está asociado a una alteración en la translocación al núcleo de HIF1 $\alpha$  (**Figuras 13b y 14b**). Además, parece ser independiente del dominio de andamiaje de Caveolina-1 (**Figura 11**). Por lo tanto, los resultados indican que la inhibición de la actividad de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1 sería potencialmente por un mecanismo indirecto que no involucraría la formación de un complejo multiproteico.

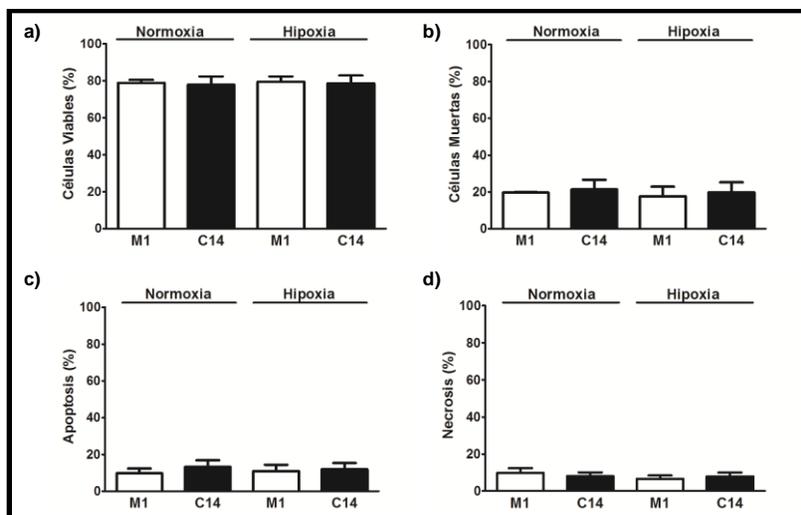


**Figura 14: Localización celular de HIF1α y Caveolina-1 en células expuestas a hipoxia por 4 h**

**a)** Células HT29(US) (M1 y C14) fueron sembradas sobre cubreobjetos por 24 h en presencia de IPTG 1 mM. A continuación, las células fueron cultivadas en normoxia (5% CO<sub>2</sub> + 95% aire) o hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94%N<sub>2</sub>) por 4 h. Luego de fijación, permeabilización y posterior bloqueo, las células fueron marcadas con anticuerpos primarios contra Caveolina-1 y HIF1α, seguidos de anticuerpos secundarios acoplados a FITC o CY3 y DAPI para definir el núcleo. La visualización de las células se realizó mediante microscopía confocal. Caveolina-1 se visualiza en verde, HIF1α rojo y el núcleo en azul. La superposición de las imágenes se realizó con el programa Image J. La barra de magnificación es 10 μm. **b)** a partir de las imágenes de (a) se definió la región de interés óptico nuclear (ROI) usando la imagen correspondiente a DAPI con el programa Image J. A partir del ROI, se midió la intensidad de la marca nuclear de HIF1α (píxeles) con la herramienta ROI manager, la que normalizada por el área del ROI, como se señala en la metodología. El resultado se expresa como intensidad de fluorescencia (píxeles/μm<sup>2</sup>) y corresponde al promedio ± SEM de tres experimentos. **c)** Las células HT29(US), fueron tratadas en hipoxia por 4 h como se indica en (a). A continuación, las células fueron lisadas y a partir de este extracto celular, se determinó por Western blot los niveles proteicos de HIF1α, Caveolina-1 y Actina (control de carga). La masa molecular de las proteínas se indica en kDa.

## 1.4 Determinar el efecto de hipoxia en la viabilidad y ciclo celular

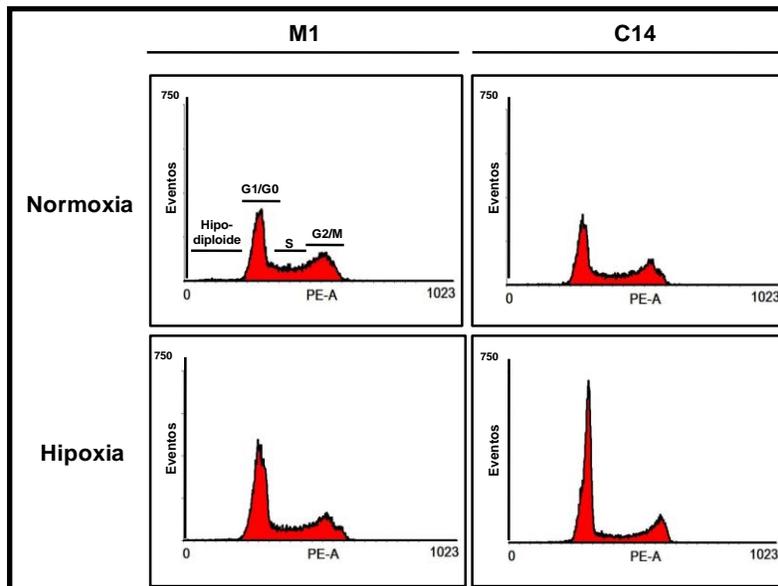
Distintas líneas de investigación han revelado que Caveolina-1 puede favorecer muerte celular. Se ha visto, que Caveolina-1 sensibiliza a la muerte celular inducida por agentes antineoplásicos como cisplatino (Pongjit and Chanvorachote, 2011), paclitaxel (Shajahan et al., 2012), hiperoxia (Zhang et al., 2011), estrés de retículo por tunicamicina (Diaz, 2013) y palmitato (Nuñez., 2013). Por otro lado, HIF1 $\alpha$  induce la expresión en hipoxia de factores inductores de muerte celular como BNIP3 y NIX (Bcl2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3, Nip3-like protein X, respectivamente) (Sowter et al., 2001), por lo que nos preguntamos si la presencia de Caveolina-1 sensibiliza a la muerte celular en hipoxia de células HT29(US) (objetivo específico 1.6). El tratamiento de hipoxia por 24 h no alteró la viabilidad ni incrementó la muerte celular. El análisis de la población de células muertas no reveló diferencias en apoptosis o necrosis. Por lo tanto, el resultado sugiere que Caveolina-1 no sensibiliza a las células a la muerte celular en hipoxia (**Figura 15**).



**Figura 15: Efecto de la hipoxia sobre la viabilidad celular de HT29(US).**

Células HT29(US) (M1 y C14) fueron cultivadas en normoxia o hipoxia por 24 h. A continuación, las células fueron recolectadas y resuspendidas en una solución de yoduro de propidio [10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] para su posterior análisis de viabilidad por citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM de  $n = 3$  experimentos de **a) porcentaje de células viables, b) porcentaje de células muertas, c) porcentaje de células apoptóticas y d) porcentaje de células necróticas.**

Se ha visto que HIF1 $\alpha$  induce la detención del ciclo celular en hipoxia, mediante un mecanismo transcripcional a través la inducción de p21 y p27 o por medio de una vía no transcripcional como impedir la formación de orígenes de replicación en el DNA (Goda et al., 2003; Hubbi et al., 2013). Por otro lado, Caveolina-1 induce detención del ciclo celular en G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> por inducción de p53/p21 WAF1/Cip1 (Galbiati et al., 2001) o G<sub>2</sub>/M por represión de la expresión de Survivina (Torres et al., 2006), por lo que nos preguntamos si la sobreexpresión de Caveolina-1 afecta la distribución del ciclo celular en hipoxia (objetivo específico 1.6). Para ello, se analizó, mediante citometría de flujo el contenido de DNA (**Figura 16**). En normoxia, la presencia de Caveolina-1 no alteró la distribución del ciclo celular comparado con las células Mock. Sin embargo, la hipoxia indujo la detención del ciclo celular en fase G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>, tanto en células transfectadas con Caveolina-1 como Mock, lo que se reflejó con un aumento del área bajo la curva correspondiente a G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> en los histogramas de fluorescencia para yoduro de propidio. En ambos casos, la detención en fase G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> fue asociada a la reducción del número de células en fase S, sin afectar la proporción de células en fase G<sub>2</sub>/M.



**Figura 16: Efecto de la hipoxia sobre la distribución del ciclo celular de HT29(US).**

Células HT29(US) (M1 y C14) fueron cultivadas en normoxia o hipoxia por 24 h. Luego de ser recolectadas, fijadas en metanol, tratadas con RNasa y resuspendidas en una solución de yoduro de propidio las células fueron analizadas mediante citometría de flujo. El resultado corresponde a un histograma de fluorescencia del yoduro de propidio representativo de tres experimentos independientes.

La cuantificación del porcentaje de células en las distintas fases se presenta en la **Tabla 3**. No hubo diferencias en normoxia, dependientes de la sobreexpresión de Caveolina-1. Por otro lado, en hipoxia la presencia de Caveolina-1 incrementó el porcentaje de células en G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> (47,8 vs 56,9%) y redujo el porcentaje de células en fase S (35,7 vs 26%) en comparación a Mock, sin afectar el porcentaje de células con contenido de DNA hipodiploides o en fase G<sub>2</sub>/M (**Tabla 3**). Estos resultados indican que la sobreexpresión de Caveolina-1 favorece el arresto del ciclo celular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en hipoxia, disminuyendo el porcentaje de células en fase S, sin alterar la viabilidad celular (**Figura 15**).

	<b>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></b>	<b>S</b>	<b>G<sub>2</sub>/M</b>	<b>Hipodiploide</b>
<b>M1 Normoxia</b>	38 ± 1	42 ± 2	18 ± 1	2,0 ± 1
<b>C14 Normoxia</b>	39 ± 2	41 ± 1	18 ± 1	1,5 ± 0
<b>M1 Hipoxia</b>	48 ± 1	36 ± 1	15 ± 0	1,1 ± 0
<b>C14 Hipoxia</b>	<b>57 ± 2 **</b>	<b>26 ± 1 **</b>	16 ± 1	1,6 ± 0

**Tabla 3: Distribución del ciclo celular en células HT29(US) en hipoxia.**

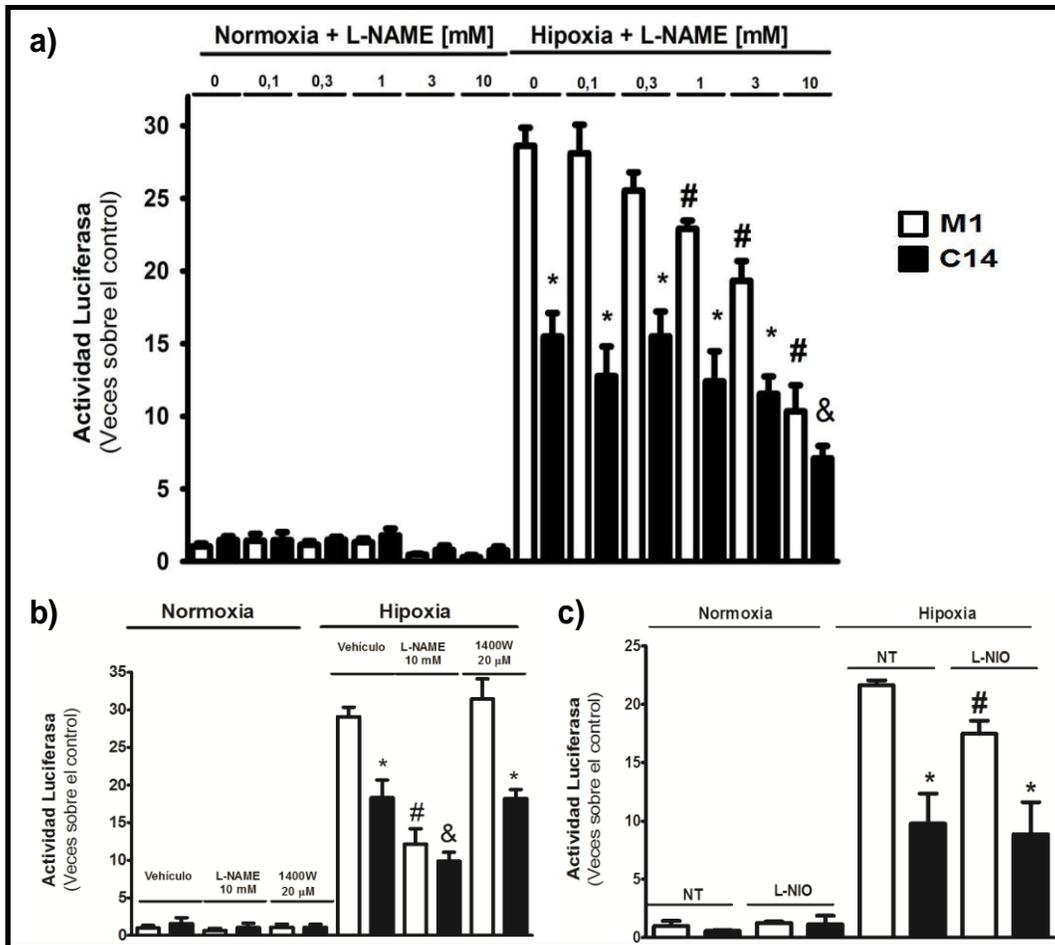
Se presentan los resultados obtenidos de la distribución porcentual del ciclo celular en células HT29(US) expuestas a normoxia o hipoxia por 24 h, los valores corresponden al promedio ± SEM de tres experimentos independientes (\*\*p≤0.01 C14 hipoxia vs M1 hipoxia).

## SECCIÓN 2

### **Objetivo Específico 2: Evaluar la participación de las enzimas óxido nítrico sintasas en la inhibición de HIF1 $\alpha$ por Caveolina-1.**

#### **2.1 Identificar la isoforma de NOS asociada al efecto inhibidor de Caveolina-1**

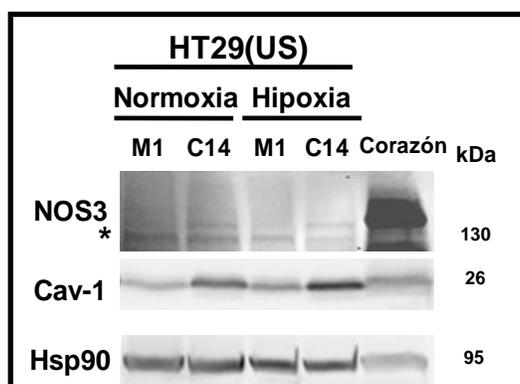
La vía de señalización del NO y las enzimas NOS son importantes para la estabilización y actividad transactivadora de HIF1 $\alpha$ . Se ha visto que el NO estabiliza a HIF1 $\alpha$  en carcinoma oral de células escamosas (Quintero et al., 2006) y bajas concentraciones de NO estabilizan HIF1 $\alpha$  en hipoxia (Chowdhury et al., 2012). Además, el tratamiento con el dador de NO, SNAP (S-Nitroso-N-acetilpenicilamina), incrementa la asociación de HIF1 $\alpha$  con su co-activador transcripcional p300/CBP (Park et al., 2008). Por otro lado, Caveolina-1 es un potente inhibidor de las isoformas de NOS1, 2 y 3 (Felley-Bosco et al., 2002; Felley-Bosco et al., 2000; Garcia-Cardena et al., 1997; Sato et al., 2004). Para evaluar la participación de las NOS en la inhibición de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1, se usaron distintos inhibidores de las isoformas de NOS, como L-NAME, 1400W y L-NIO, un inhibidor general de NOS, inhibidor de NOS2 e inhibidor NOS3, respectivamente. Para evaluar la participación de NOS (objetivo específico 2.1), se determinó mediante un ensayo de gen reportero de HIF el efecto de los inhibidores L-NAME, 1400W y L-NIO (**Figura 17**). La inhibición de todas las isoformas de NOS con L-NAME, previno el incremento en la actividad del gen reportero de HIF en hipoxia, a niveles comparables con lo observado en células transfectadas con Caveolina-1, efecto que fue dependiente de la concentración de L-NAME. Este resultado sugiere que el aumento en la actividad de HIF fue debida en parte a la actividad de NOS en hipoxia (**Figura 17a**). Para identificar qué isoforma de NOS se asocia con el aumento de la actividad de HIF en hipoxia, se evaluó el efecto de los inhibidores de NOS2 y NOS3. La inhibición de NOS2 con 1400W no alteró la inducción del gen reportero de HIF en hipoxia, indicando que esta isoforma de NOS no está involucrada en el incremento de la actividad de HIF en hipoxia (**Figura 17b**).



**Figura 17: Efecto de los inhibidores de las isoformas de óxido nítrico sintasas, L-NAME, 1400W y L-NIO sobre la actividad de HIF en células HT29(US) en hipoxia.**

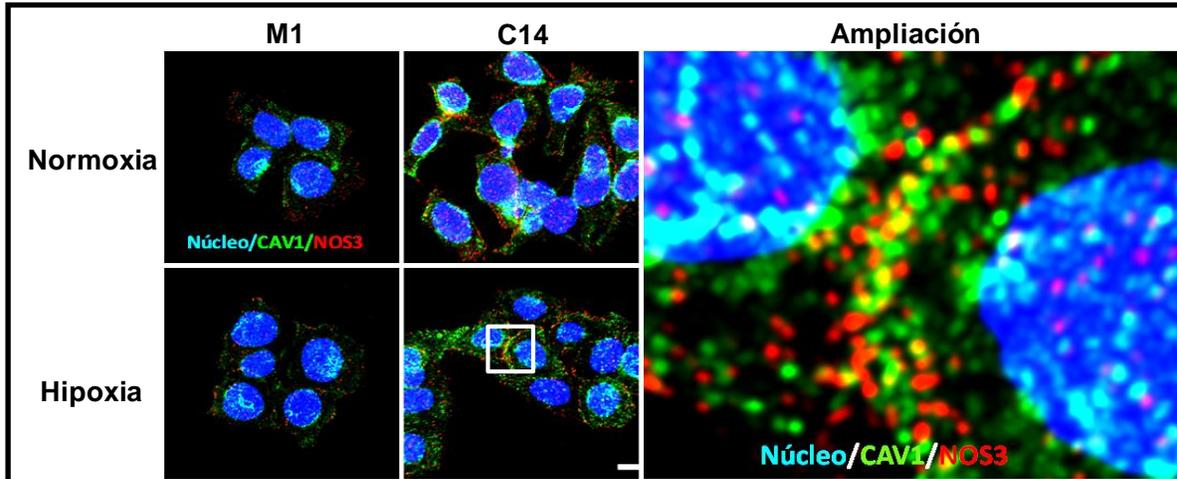
Células HT29(US) (M1 y C14) se co-transfectaron en suspensión con los plasmidios pON y pGL3HRE usando Superfect. Luego de inducir la expresión de Caveolina-1 con IPTG 1 mM por 24 h, las células se trataron con **a)** el inhibidor general de NOS, L-NAME (rango concentraciones 0,1-10 mM), **b)** el inhibidor de NOS2, 1400W (20 μM) o **c)** el inhibidor de NOS3, L-NIO (100 μM). A continuación, las células fueron lisadas y se cuantificó la actividad luciferasa pGL3-HRE (expresada como veces sobre el control), la que fue normalizada por la actividad de la β-galactosidasa en los extractos celulares. Los resultados corresponden al promedio ± SEM de al menos tres experimentos independientes. \* p≤0,05 M1 vs C14; # p≤0,05 M1 hipoxia vs M1 hipoxia + inhibidor de NOS (L-NAME o L-NIO); & p≤0,05 C14 hipoxia vs C14 hipoxia L-NAME).

Por otro lado, la inhibición de NOS3 con L-NIO bloqueó parcialmente el aumento en la actividad del gen reportero de HIF en hipoxia en células Mock (**Figura 17c**), sugiriendo que la actividad de NOS3 es importante para el incremento de la actividad del gen reportero de HIF en hipoxia. Por otro lado, análisis por Western Blot mostraron que las células HT29(US) expresan NOS3, tanto en normoxia como hipoxia (**Figura 18**). Además, análisis de la inmunolocalización de NOS3 por microscopía confocal, reveló que NOS3 se presenta principalmente en la membrana plasmática, donde colocaliza con Caveolina-1 tanto en normoxia como hipoxia (**Figura 19**). En conjunto, estos resultados indican que el aumento en la actividad del gen reportero de HIF es mediado por NOS3. Caveolina-1 colocaliza con NOS3, potencialmente inhibiendo la activación de la enzima, como ha sido descrito previamente (Liu et al., 2009; Mukhopadhyay et al., 2007).



**Figura 18: NOS3 se expresa en células HT29(US).**

Células HT29(US) fueron sembradas en placas de cultivo celular por 24 h en presencia de IPTG 1 mM. Luego, las células fueron tratadas en hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94%N<sub>2</sub>) o normoxia (5% CO<sub>2</sub> + 95% aire). A continuación, las células fueron lisadas obteniéndose un extracto de proteínas a partir del cual se determinaron los niveles proteicos de NOS3, Caveolina-1 y Hsp90 (control de carga) mediante Western Blot. Un extracto de corazón de ratón se incluyó como control positivo de la expresión de NOS3. El resultado corresponde a un panel representativo de 2 experimentos independientes. \* indica banda inespecífica.



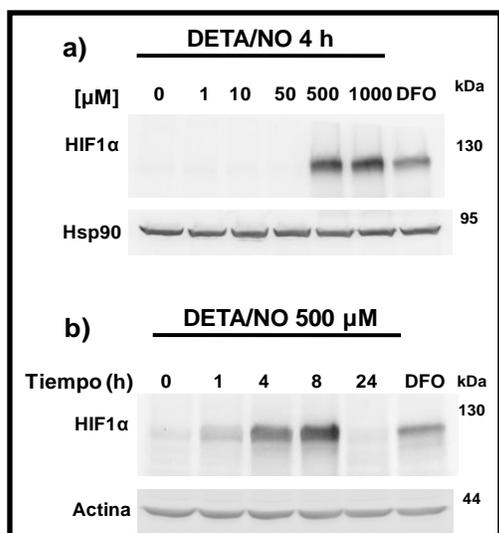
**Figura 19: NOS3 colocaliza con Caveolina-1 en células HT29(US).**

Células HT29(US) (clones M1 y C14) fueron sembradas sobre cubreobjetos por 24 h en presencia de IPTG 1 mM para inducir la expresión de Caveolina-1. Posteriormente, las células fueron incubadas en hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94%N<sub>2</sub>) o normoxia (5% CO<sub>2</sub> + 95% aire) por 24 h adicionales en presencia de IPTG 1 mM. Luego, de fijación, permeabilización y bloqueo con solución de BSA, las células fueron incubadas con anticuerpos primarios anti-Caveolina-1 y anti-NOS3 por 1 h a 37°C, seguidos de anticuerpos secundarios acoplados a FITC o CY3 y DAPI para marcar la región nuclear. Las muestras fueron posteriormente visualizadas en microscopio confocal. Caveolina-1 es visualizada en verde, NOS3 en rojo y el núcleo en azul. Las imágenes adquiridas fueron deconvolucionadas con el programa Huygens Professional. Para observar en mayor detalle la colocalización de Caveolina-1 con NOS3, se hizo una ampliación de una región periférica (demarcada en un recuadro blanco) de células HT29(US)C14 en hipoxia. Se presenta un panel correspondiente a dos experimentos independientes. Escala 10 µm.

## 2.2 Evaluar el efecto de dador de NO

Caveolina-1 es un potente inhibidor de diferentes isoformas de NOS (Felley-Bosco et al., 2002; Felley-Bosco et al., 2000; Garcia-Cardena et al., 1997; Sato et al., 2004) y dado que el tratamiento con el inhibidor L-NAME o L-NIO previene el aumento en la actividad del gen reportero de HIF a valores comparables con lo observado en células con Caveolina-1, realizamos un experimento de rescate con el dador de NO, DETA/NO (objetivo específico 2.2). Se ha visto que el tratamiento con altas concentraciones de dadores de NO estabilizan HIF1α independientemente de la concentración de oxígeno (Mateo et al., 2003). El

análisis de los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  mediante Western Blot, reveló que el tratamiento con 500 y 1000  $\mu$ M de DETA/NO produjo la estabilización de HIF1 $\alpha$  en normoxia, de modo similar que Deferroxamina (**Figura 20a**). Los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  se mantuvieron elevados durante al menos 8 h post-tratamiento con DETA/NO 500  $\mu$ M, luego de 24 h HIF1 $\alpha$  no fue detectado (**Figura 20b**).

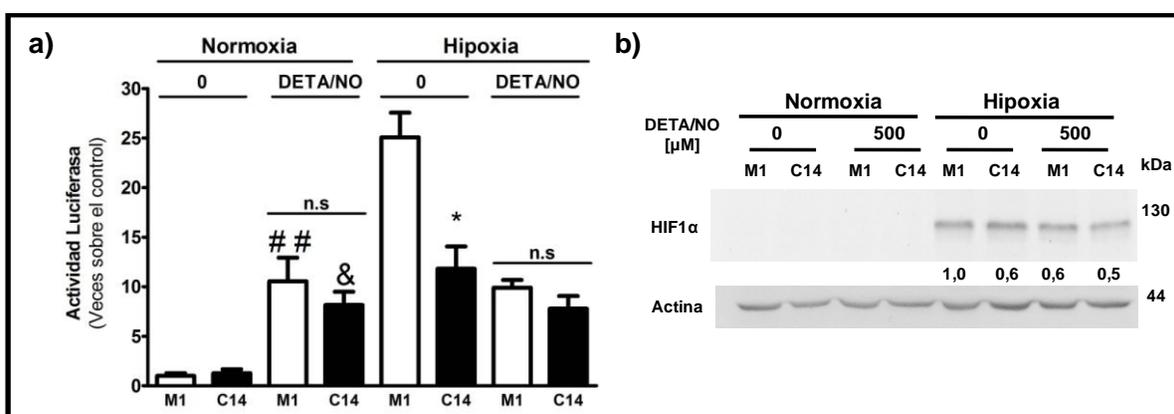


**Figura 20 Efecto del dador de NO, DETA/NO sobre la estabilización de HIF1 $\alpha$ .**

Células HT29(US) fueron sembradas en placas de cultivo por 18 h. A continuación, las células fueron tratadas con **a)** DETA/NO, rango de concentraciones 1-1000  $\mu$ M) por 4 h ó **b)** DETA/NO 500  $\mu$ M por 0 a 24 h de tratamiento. Luego, las células fueron lisadas y a partir del extracto celular se determinaron los niveles de HIF1 $\alpha$ , Hsp90 y Actina (controles de carga) por Western Blot. Un panel de células tratadas con DFO 200  $\mu$ M por 18 h fue incluido como control positivo en ambos experimentos. Los resultados corresponden a imágenes representativas de 3 experimentos independientes. El peso molecular de las proteínas es indicado en kDa.

A continuación, evaluamos mediante ensayo de gen reportero de HIF el efecto del dador de NO. En normoxia, el tratamiento con DETA/NO indujo el aumento en la actividad transcripcional de HIF sin diferencias dependientes de la sobreexpresión de Caveolina-1, sugiriendo que la adición de NO es capaz de prevenir la inhibición de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1. Por otro lado, en hipoxia se observó un incremento en la actividad de HIF, similar a lo mostrado en las figuras 5 y 17. Inesperadamente, el tratamiento con DETA/NO en hipoxia no fue capaz de producir un efecto aditivo con hipoxia en la actividad del gen reportero de HIF, detectándose un aumento en la actividad de HIF de 10 veces, magnitud similar a la observada en normoxia (**Figura 21a**). A continuación se investigó el efecto de DETA/NO a distintos tiempos de hipoxia (4 h pre-tratamiento DETA/NO, seguido de hipoxia sin DETA/NO, 4 h tratamiento de DETA/NO luego de 20 h de hipoxia) cómo el efecto de distintas concentraciones de DETA/NO (0 a 500  $\mu$ M), observándose en todos

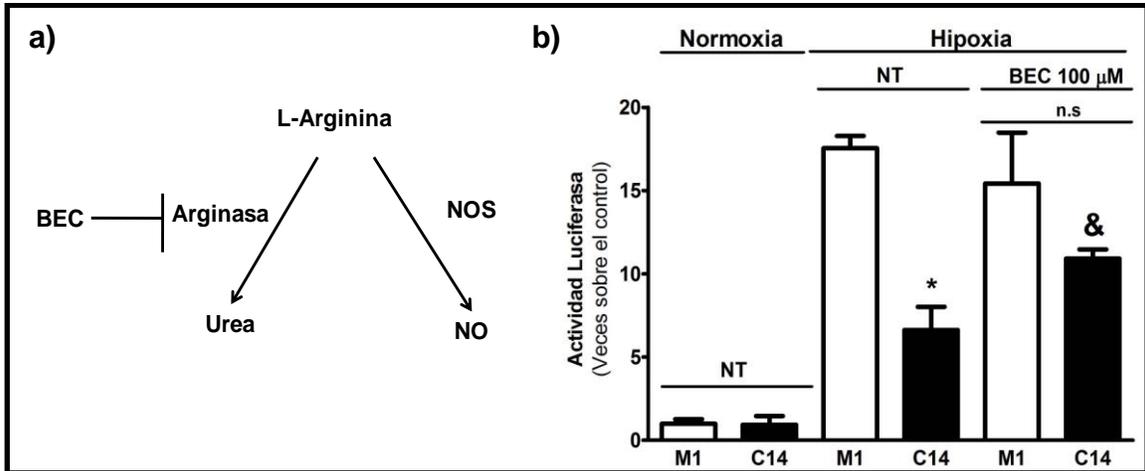
los casos la ausencia de un efecto aditivo entre la hipoxia y DETA/NO (resultados no mostrados). Por otro lado, evaluamos que ocurre con los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  por acción del tratamiento con DETA/NO por tiempos prolongados, detectándose una reducción en los niveles de HIF1 $\alpha$  en hipoxia (**Figura 21b**). Por lo tanto, no nos es posible evaluar con DETA/NO la contribución del NO en la activación de HIF1 $\alpha$  en hipoxia, debido a que el dador reduce los niveles proteicos de la HIF1 $\alpha$ .



**Figura 21: Efecto del dador de NO, DETA/NO sobre la actividad de HIF en células HT29(US) en hipoxia.**

**a)** Células HT29(US) (M1 y C14) fueron co-transfectadas en suspensión con los plasmidios pON y pGL3HRE usando Superfect. Luego de la transfección (18 h), las células fueron pretratadas con DETA/NO 500  $\mu$ M, el medio de cultivo fue cambiado por medio fresco y las células fueron incubadas en normoxia o hipoxia por 24 h en presencia del dador de NO. Se obtuvieron extractos celulares, donde se cuantificó la actividad luciferasa pGL3-HRE y  $\beta$ -galactosidasa. Por cada condición, la actividad luciferasa fue normalizada por la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados de Actividad Luciferasa (expresados como veces el control), corresponden al promedio  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos (\*p<0.05 Mock vs Cav-1 hipoxia, ## p<0.001 Mock normoxia vs Mock normoxia DETA/NO, & p<0.05 Cav-1 vs Cav-1 DETA/NO). **b)** Células HT29(US) (M1 y C14) incubadas con IPTG (1 mM, 24 h), fueron tratadas con DETA/NO 500  $\mu$ M por 4 h previo a incubar las células en normoxia o hipoxia por 24 h con DETA/NO. Finalizado el experimento, se obtuvo un extracto total de proteínas donde se analizó por Western Blot los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  y Actina (control de carga), correspondiendo a un experimento. La masa molecular de las proteínas es señalada en kDa.

La síntesis de NO depende de la disponibilidad de su sustrato, L-arginina. Este último es usado para la síntesis de NO por las isoformas de NOS y para la producción de urea por la enzima arginasa (**Figura 22a**) (Durante et al., 2007). Debido a que DETA/NO parece afectar la estabilidad de HIF1 $\alpha$  en hipoxia (**Figura 21b**) y para evaluar la contribución del NO a la inhibición de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1 en hipoxia, decidimos determinar el efecto del inhibidor específico de arginasa, BEC. Se ha reportado que BEC produce el incremento en la producción de NO, sin inhibir a NOS (Kim et al., 2001). En normoxia, el tratamiento con BEC no alteró la actividad del gen reportero de HIF (resultado no mostrado, n=2). Por otro lado, en hipoxia el tratamiento con BEC aumentó la actividad del gen reportero de HIF en células HT29(US)C14, comparado con las células C14 no tratadas con el inhibidor en hipoxia. Es importante recalcar, que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad del gen reportero de HIF entre células M1 y C14 tratadas con BEC en hipoxia (**Figura 22b**). Por lo tanto, los resultados indican que la inhibición de arginasa con BEC, bloquea parcialmente la inhibición de la actividad del gen reportero de HIF por Caveolina-1, potencialmente mediante un incremento en la producción de NO.



**Figura 22: Efecto del inhibidor de arginasa (BEC) sobre la actividad de HIF en células HT29(US) en hipoxia.**

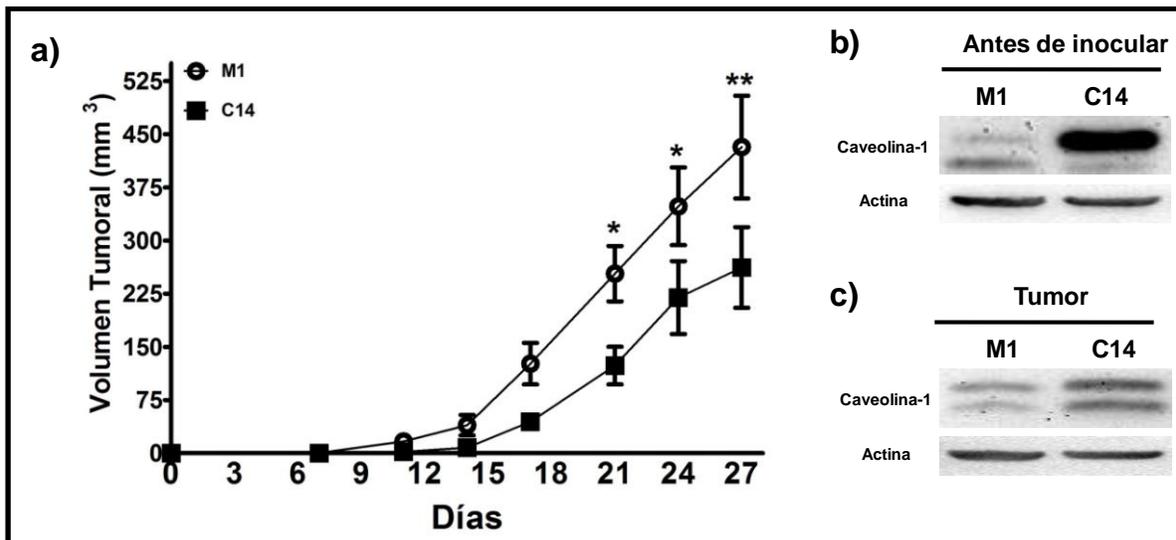
**a)** Esquema general que muestra como L-Arginina es utilizada como sustrato por NOS y Arginasa, para la producción de NO y Urea, respectivamente. BEC inhibe a Arginasa, favoreciendo la producción de NO, por mayor disponibilidad de L-arginina. **b)** Células HT29(US) (M1 y C14) fueron co-transfectadas en suspensión con los plasmidios pON y pGL3HRE usando Superfect. Las células fueron tratadas con el inhibidor de arginasa BEC 100 μM, 24 h post-inducción de la expresión de Caveolina-1 con IPTG 1 mM por 24 h adicionales en normoxia o hipoxia. Luego, se determinó la actividad Luciferasa pGL3-HRE en los extractos celulares (expresada como veces sobre el control), la que fue normalizada por la actividad de la β-galactosidasa. El resultado corresponde al promedio ± SEM de al menos 3 experimentos. \*p≤0,05 M1 vs C14 hipoxia, C14 hipoxia vs M1 hipoxia + BEC; & p≤0,05 C14 hipoxia vs C14 hipoxia + BEC.

## SECCIÓN 3

**Objetivo Específico 3: Evaluar *in vivo* si la inhibición de HIF1 $\alpha$  y NOS contribuyen a su papel supresor de tumores de Caveolina-1**

**3.1 Determinar si la sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  previene efecto supresor de tumores de Caveolina-1.**

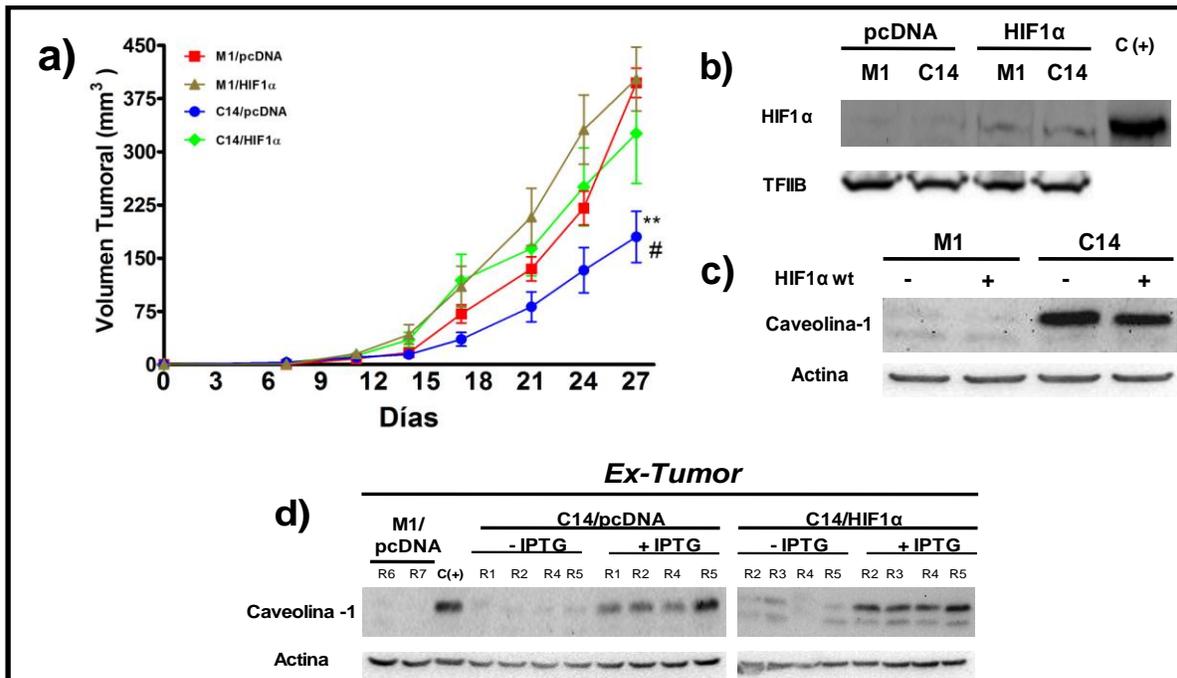
Para abordar este objetivo se realizaron ensayos de formación de tumores con células HT29(US) (clones M1 y C14) en ratones inmunosuprimidos de la cepa SCID-Beige (Colaboración con el Dr. Rolf Kiessling, Karolinska Institute, Suecia). En ratones inmunocompetentes C57BL/6, los ensayos de formación de tumores se realizaron con la línea isogénica B16F10 (Lobos-Gonzalez L., 2013). El primer experimento consistió en confirmar la acción supresora de tumores de Caveolina-1 en ratones inmunosuprimidos (Bender et al., 2000) (objetivo específico 3.1) (**Figura 23**). Ratones SCID-Beige fueron inoculados por la vía subcutánea con células HT29(US) (clones M1 y C14) en ambos flancos. Para ello, las células fueron sembradas con IPTG 1 mM por 24 h para inducir la expresión de Caveolina-1 (**Figura 23b**). A continuación los animales se inocularon con  $1 \times 10^6$  células y una vez que el tumor fue palpable, el tumor se midió con un pie de metro y el volumen tumoral se calculó, como se indica en la metodología. Los resultados del experimento mostraron que la presencia de Caveolina-1 en las células inyectadas redujo en un 45% el volumen del tumor, 27 días post-inoculación de las células en comparación al volumen del tumor formado por células Mock (**Figura 23a**). El análisis de Caveolina-1 por Western Blot mostró que los niveles de la proteína se mantienen ligeramente elevados 29 días post-inoculación de las células (**Figura 23c**), comparado con los niveles de la proteína antes de inocular las células (**Figura 23b**). El resultado sugiere que la presencia de Caveolina-1 en las células tumorales suprime el crecimiento del tumor en ratones inmunosuprimidos.



**Figura 23: Formación de tumores en ratones SCID-Beige inoculados con células HT29(US).**

Células HT29(US) (M1 y C14) se cultivaron en placas de cultivo con IPTG 1 mM por 24 h. A continuación, **a)** las células se contaron ( $1 \times 10^6$  células) e inocularon (vía subcutánea) en ambos flancos en ratones SCID-Beige. Dos veces por semana se midió el tumor y el volumen tumoral se calculó según lo indicado en la metodología. El resultado (promedio  $\pm$  SEM) corresponde a un experimento con  $n=7$  animales ( $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$  tumor M1 vs C14). Niveles proteicos de Caveolina-1 en **b)** células HT29(US) (M1 y C14) antes de ser inoculados en los ratones SCID-Beige y **c)** en tumores derivados de células HT29(US) (M1 y C14) (volumen tumores  $523 \text{ mm}^3$ ) luego de 29 días de inoculación en ratones SCID-Beige. Los niveles proteicos de Caveolina-1 y Actina (control de carga) fueron determinados por Western Blot.

A continuación, se determinó el efecto de la sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  en ensayos de formación de tumores con células HT29(US) (M1 y C14). Para ello, las células fueron transfectadas con el plasmidio que codifica para la variante silvestre de HIF1 $\alpha$  o el plasmidio control pcDNA. Un mes post-transfección y selección de las células con los antibióticos G418 e higromicina, se detectó una sobreexpresión moderada de HIF1 $\alpha$  (5 veces de aumento con respecto al control pcDNA) en las células. Un extracto proteico de células hipóxicas fue usada como control positivo de HIF1 $\alpha$  (**Figura 24b**).



**Figura 24: Formación de tumores en ratones SCID-Beige inoculados con células HT29(US) (M1 y C14) establemente transfectadas con HIF1 $\alpha$ .**

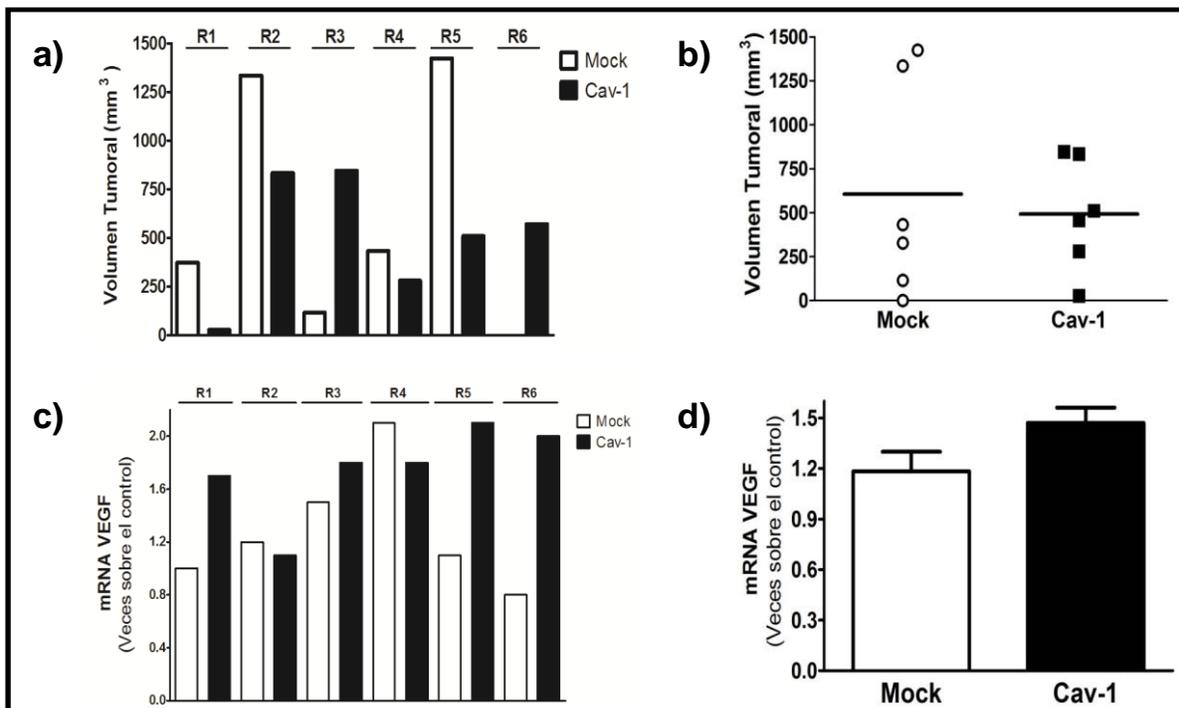
**a)** Dos grupos de ratones SCID-Beige (un experimento con 7 animales por grupo) fueron inoculados en ambos flancos con  $1 \times 10^6$  células HT29(US) M1/pcDNA, HT29(US) M1/HIF1 $\alpha$  (grupo 1) y HT29(US) C14/pcDNA y HT29(US) C14/HIF1 $\alpha$  (grupo 2). Las células fueron mantenidas en cultivo 24 h de incubación con IPTG (1 mM), para inducir la expresión de Caveolina-1 previo a ser inoculadas en los animales. Una vez que el tumor fue palpable, este fue medido dos veces por semana y el volumen tumoral fue calculado como se indica en materiales y métodos. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (\* $p \leq 0.05$  C14/pcDNA vs M1/pcDNA, # $p \leq 0.05$  C14/pcDNA vs C14/HIF1 $\alpha$ ). **b)** Niveles de HIF1 $\alpha$  en extractos nucleares y **c)** niveles proteicos de Caveolina-1 en células HT29(US) co-transfectadas con HIF1 $\alpha$  Caveolina-1, posteriores al tratamiento con IPTG 1 mM. A continuación, las células fueron lisadas, y se obtuvieron extractos totales como nucleares, a partir de los cuales se determinó los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$ , Caveolina-1, TFIIIB (control fracción nuclear) y Actina (control de carga) por Western blot. Un extracto de células HT29(US) tratadas por 24 h en hipoxia (1% O $_2$ ) fue usado como control positivo (C+) para HIF1 $\alpha$ . **d)** Niveles de Caveolina-1 en células *ex-tumor*. Los tumores desarrollados a partir de las células HT29(US) de la figura (a) fueron extirpados con bisturí y digeridos con tripsina. Las células resultantes fueron subcultivadas por dos pasajes, como se describe en materiales y métodos. A continuación las células fueron lisadas y los niveles de Caveolina-1 y Actina fueron determinados por Western Blot. Los niveles de Caveolina-1 de las células *Ex-Tumor* fueron comparados con los niveles de las células antes de inocular (c +) y con células *Ex-Tumor* tratadas con IPTG 1 mM por 24 h. El resultado corresponde a 10 líneas *Ex-Tumor* obtenidas a partir de los ensayos de formación de tumores.

Además, la transfección de las células con el plasmidio HIF1 $\alpha$ , no alteró la capacidad de las células de inducir la expresión de Caveolina-1 con IPTG 1 mM por 24 h (**Figura 24c**). A continuación, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  por ensayo de formación de tumores. La sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  en células HT29(US)M1 incrementó el tamaño de los tumores formados, sin observarse diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, la sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  en células HT29(US)C14 previno la supresión del tumor impuesta por Caveolina-1. El tamaño de los tumores formados por las células HT29(US)C14/HIF1 $\alpha$  fue comparable al tamaño de los tumores derivados de las células HT29(US)M1/pcDNA (**Figura 24a**). Para comprobar la expresión de Caveolina-1 en los tumores, se estableció líneas celulares a partir de los tumores (células *ex-tumor*). Dos pasajes después de la extracción de las células desde el tumor, las células expresaron bajos niveles proteicos de Caveolina-1. Sin embargo, al incubar las células con IPTG 1 mM por 24 h, se indujo la expresión de Caveolina-1 (**Figura 24d**). Estos resultados indican que, la sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  previene el efecto supresor de tumores de Caveolina-1.

### **3.2 Determinar los niveles de expresión de genes blanco de HIF1 $\alpha$ en tumores derivados de células transfectadas con Caveolina-1.**

Debido a que VEGF fue el gen cuya expresión se vio más reducida por la sobreexpresión de Caveolina-1 en hipoxia (**Figura 6**), decidimos determinar sus niveles de expresión *in vivo* (objetivo específico 3.2). Por otro lado, debido a que la hipoxia ocurre al cuarto día post-implantación de las células en ensayos de formación de tumores (Dewhirst et al., 2007) y se mantiene de manera crónica una vez que el tumor es palpable (Yasui et al., 2010), quisimos evaluar tempranamente los niveles de expresión de VEGF. Para ello, se inoculó por la vía subcutánea ratones C57BL/6 en ambos flancos con células B16F10 (Mock y Cav-1) y una vez que los tumores fueron palpables, se determinó el volumen de los tumores. Al día 10 post-inoculación, se detectó que la presencia de Caveolina-1 suprimió la formación de tumores en 4 de 6 animales (ratones, 1, 2, 4 y 5, **Figura 25a**). Sin

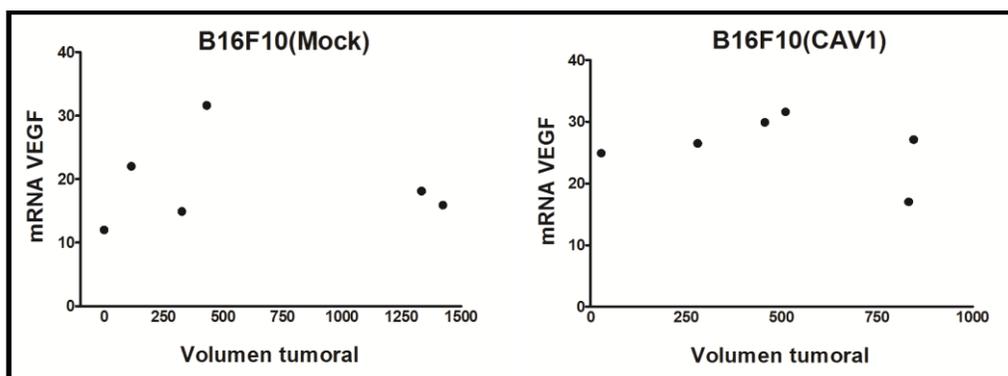
embargo, no detectaron diferencias al comparar el promedio del tamaño de los tumores B16F10(Mock) con B16F10(Cav-1) (Figura 25b). A continuación, analizamos por qPCR los niveles del mRNA de VEGF en los tumores, no se observándose una correlación entre supresión de tumores por Caveolina-1 y nivel de expresión de VEGF al comparar cada animal del experimento (Figuras 25a y 25c) o los promedios (Figura 25d) al día 10 post-inoculación de las células.



**Figura 25: Formación de tumores en ratones C57BL/6 inoculados con células B16F10(Mock) y (Cav-1).**

**a)** Ratones C57BL/6 fueron inoculados en ambos flancos, vía subcutánea con  $3 \times 10^5$  células B16F10 (Mock) y (Cav-1), respectivamente. Una vez que el tumor fue palpable, este fue medido a diario y se calculó el volumen del tumor, como se indica en materiales y métodos. Los números sobre las barras, indica el número de identificación del animal y en **b)** se gráfica el promedio del volumen tumoral  $\pm$  SEM de  $n=6$  animales de un experimento, después de 10 días post-inoculación. **c)** y **d)** niveles del mRNA de VEGF al día 10 post-inoculación. Los tumores de la figura (a), fueron extraídos quirúrgicamente, se aisló RNA de los tumores como se detalla en materiales y métodos. La expresión del mRNA fue determinada por qPCR y el nivel de expresión de VEGF se cálculo con el método del  $2^{\Delta\Delta CT}$ . Se representan los valores del mRNA de VEGF (expresado como veces sobre el control) para c) cada animal y d) promedio  $\pm$  SEM de 6 tumores por grupo, de un experimento.

Recientemente, se ha propuesto que la hipoxia observada en tumores no parece depender del tamaño del tumor (Yasui et al., 2010). Entonces, nos preguntamos si la expresión del mRNA de VEGF depende del tamaño del tumor (**Figura 26**). Para ello, se realizó un análisis de correlación entre la expresión del mRNA de VEGF y el tamaño de los tumores de la figura 25. No se observó correlación entre tamaño tumoral y expresión de VEGF. El coeficiente de Spearman calculado para cada grupo fue 0.31 y 0.14 para tumores B16F10(Mock) y B16F10(Cav-1), indicando que no existe una correlación directa entre el tamaño tumoral y expresión del mRNA de VEGF (**Figura 26**).

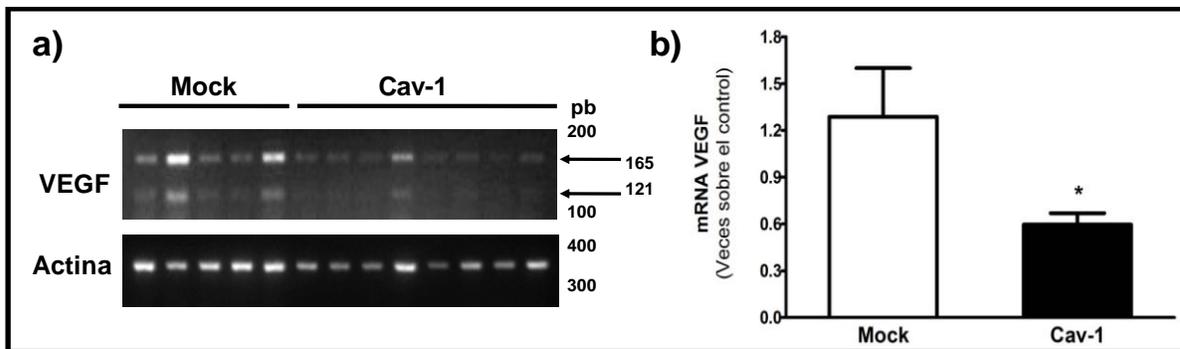


**Figura 26: Análisis de correlación expresión del mRNA de VEGF y tamaño tumoral.**

A partir de los valores de volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) y expresión del mRNA de VEGF obtenidos de un ensayo de formación de tumores de la Figura 25, se realizó un análisis de correlación de Spearman. Los coeficientes de Spearman  $r$  calculados fueron 0.31 y 0.14 para tumores B16F10(Mock) y B16F10(Cav-1), respectivamente. Los valores de volumen tumoral se encuentran en  $\text{mm}^3$  y mRNA VEGF en unidades arbitrarias de amplificación, con 6 ratones por grupo.

A continuación quisimos confirmar si la sobreexpresión de Caveolina-1 es capaz de modular la expresión de genes blanco de HIF1 $\alpha$  como VEGF *in vivo* (objetivo específico 3.2), para ello decidimos determinar los niveles de expresión de VEGF en tumores 15 días post-inoculación subcutánea de las células tumorales, debido a que al día 15, la diferencia en volumen tumoral se hace más notable entre Mock y Cav-1 (Lobos-Gonzalez L., 2013). El análisis de los tumores por RT-PCR reveló una menor expresión de las isoformas de VEGF 121 y 165 en tumores derivados

de células B16F10(Cav-1), en comparación a los tumores formados por células B16F10(Mock) (**Figura 27a**). Para confirmar esta diferencia, los cDNAs fueron analizados mediante qPCR y los perfiles de amplificación fueron cuantificados con el método del  $2^{\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001). El análisis mediante qPCR confirmó que los tumores formados a partir de células B16F10(Cav-1) expresaron un 40% menos VEGF que los derivados de células B16F10(Mock) (**Figura 27b**). Por lo tanto, los resultados sugieren que la sobreexpresión de Caveolina-1 se asocia con la reducción en la expresión de VEGF tanto *in vitro* como *in vivo*.



**Figura 27: Niveles del mRNA de VEGF en tumores al día 15 post-inoculación ratones C57BL/6 inoculados con células B16F10(Mock) y (Cav-1).**

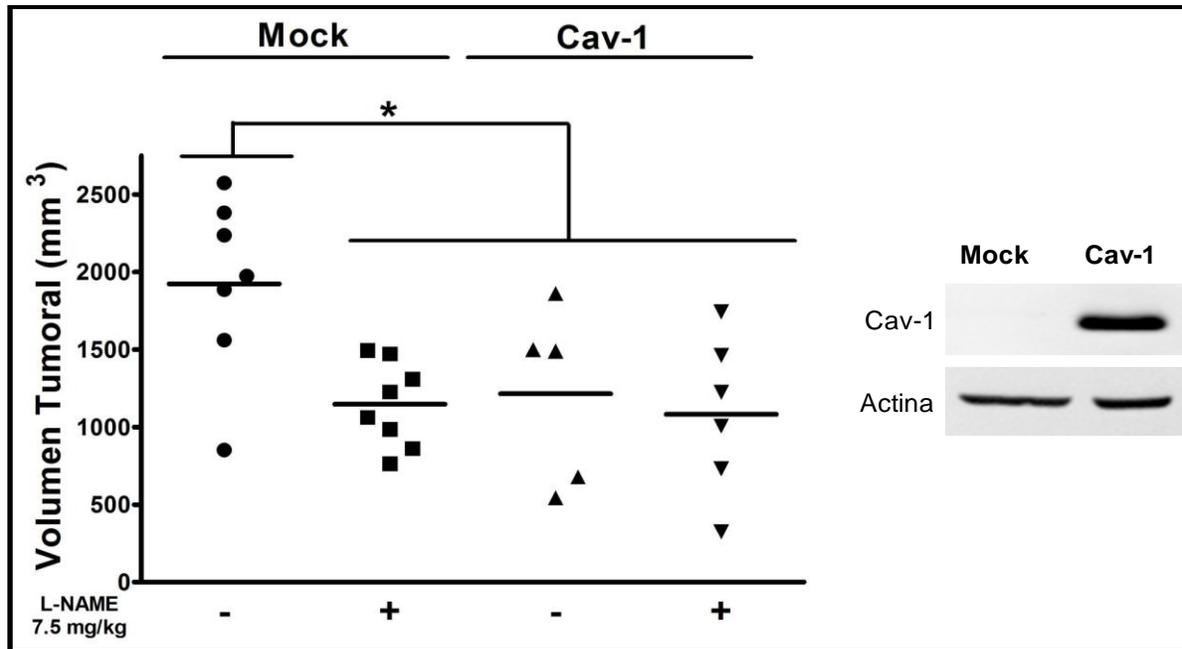
**a)** Ratones C57BL/6 fueron inoculados en un flanco con  $3 \times 10^5$  células B16F10(Mock) o (Cav-1). Al cabo de 15 días post-inoculación, los animales fueron sacrificados, los tumores extraídos y se aisló el mRNA como se indica en la metodología. La expresión de VEGF en los tumores fue analizada por RT-PCR. Actina fue usado como control interno. El resultado corresponde a un gel representativo para la amplificación de VEGF de 5 tumores derivados de células B16F10(Mock) y 8 tumores derivados de células B16F10(Cav-1). El peso molecular de los fragmentos se indica en pares de bases (pb) y con flechas se destacan las isoformas de VEGF 121 y 165. **b)** Análisis por qPCR de los niveles de expresión de VEGF de los cDNAs de la figura a). El nivel de expresión del mRNA de VEGF fue calculado usando el método del  $2^{\Delta\Delta CT}$ . El resultado, expresado como veces sobre el control corresponde al promedio  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes con 8 tumores derivados de células B16F10(Mock) y 13 tumores B16F10(Cav-1) (\* $p \leq 0,05$ ).

### **3.3 Evaluar el efecto de L-NAME sobre la acción supresora de tumores de Caveolina-1.**

Para evaluar la contribución de NOS a la acción supresora de tumores de Caveolina-1 y su relación con HIF1 $\alpha$  (objetivo específico 3.3), en la primera aproximación experimental se realizó un ensayo de formación de tumores tratando los animales con el inhibidor general de NOS, L-NAME (**Figuras 28 y S4**). Para ello, se hizo un experimento piloto, en el cual los animales fueron inoculados vía subcutánea con  $3 \times 10^5$  células B16F10(Mock) y (Cav-1). Los animales fueron subdivididos en grupos experimentales para recibir vía intraperitoneal L-NAME, disuelto en PBS estéril 7.5, 15 ó 30 mg/kg de peso (**Figura S4**). El tratamiento con L-NAME mostró un marcado efecto antitumoral, reduciendo el tamaño de los tumores formados de células B16F10(Mock), como ha sido reportado previamente (Egilmez et al., 2011; Ohtsu et al., 2010; Roy et al., 2011). Aparentemente, el efecto antitumoral de L-NAME fue concentración-dependiente y la inoculación intraperitoneal del vehículo (PBS) no produjo efecto. Por otro lado, el tratamiento con L-NAME pareció no incrementar el efecto supresor de tumor de Caveolina-1, debido a que se observó una amplia dispersión de los datos experimentales. El mayor efecto antitumoral con L-NAME, se observó en los animales tratados con 7,5 mg/kg de peso (**Figura S4**).

Para confirmar este efecto, el experimento se repitió, para ello tratando los animales inoculados con células B16F10(Mock) y (Cav-1) con L-NAME 7,5 mg/Kg peso (**Figura 28**). El tratamiento con L-NAME por la vía intraperitoneal, redujó el tamaño de los tumores derivados de células B16F10(Mock) a nivel similar al tamaño tumoral formado por células B16F10(Cav-1). Por otro lado, el tratamiento con L-NAME parece no potenciar el efecto supresor de tumores de Caveolina-1, sugiriendo que el efecto antitumoral de L-NAME es por inhibición de la actividad de NOS presente en las células tumorales en vez de su acción en otro nivel (**Figura 28**). Este resultado indica que la inhibición de NOS con L-NAME ejerce un efecto antitumoral en tumores derivados de células B16F10(Mock), probablemente

porque estas células presentan una incrementada actividad NOS a diferencia de las células B16F10(Cav-1).

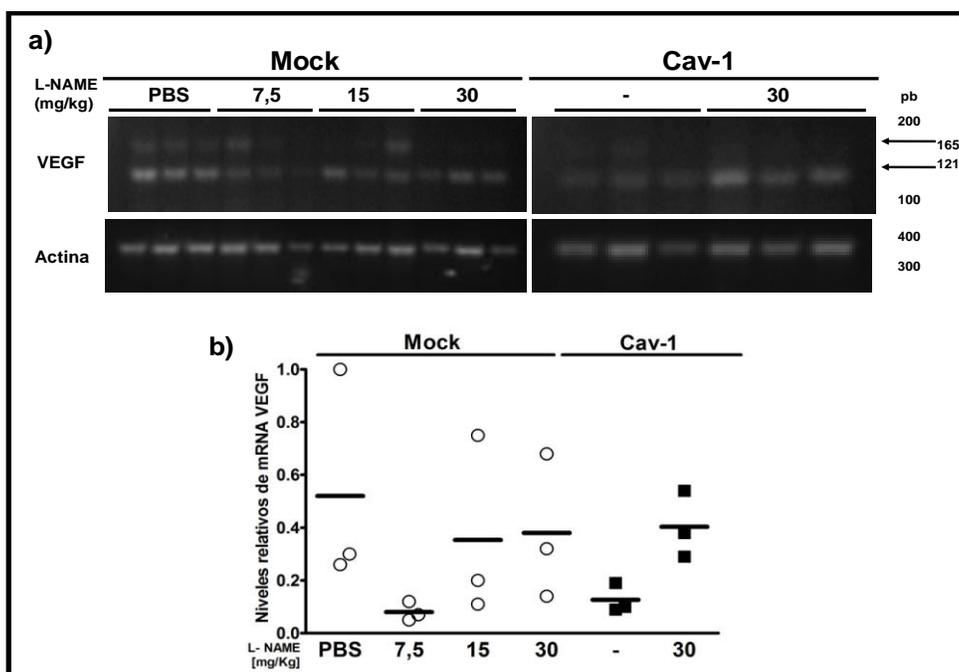


**Figura 28: Formación de tumores en ratones C57BL/6 inoculados con células B16F10(Mock) y (Cav-1) tratados con L-NAME.**

Ratones C57BL/6 se inocularon en un flanco con  $3 \times 10^5$  células B16F10(Mock) o (Cav-1), respectivamente. Las células fueron incubadas con IPTG 1 mM por 48 h previas a la inoculación en ratones C57BL/6. En paralelo, se obtuvo un extracto de proteínas donde se evaluaron los niveles proteicos de Caveolina-1 en estas células por Western Blot (Actina control de carga). A partir del día 1 de inoculación, los animales fueron tratados con L-NAME 7.5mg/Kg de peso por la vía intraperitoneal, hasta el día de su sacrificio. Como control, un grupo de animales fue inoculado intraperitonealmente con PBS. Una vez palpable, el tumor se midió a diario y se estimó el volumen de éste, como se detalla en la metodología. El resultado corresponde al promedio del volumen tumoral al día 16 post-inoculación de dos experimentos independientes. (n = 7, 8, 5 y 6 animales por grupo experimental, respectivamente) (\* $p \leq 0,05$  Mock vs Mock L-NAME, Mock vs Cav-1, Mock vs Cav-L-NAME).

Finalmente, quisimos relacionar si la inhibición de NOS con L-NAME *in vivo*, afecta la expresión de VEGF (gen blanco de HIF1 $\alpha$ ) en tumores. Para ello, se aisló mRNA de los tumores de la **Figura S4** y mediante RT-PCR se cuantificó los niveles de expresión de VEGF (**Figura 29**). El análisis de los tumores mostró que el tratamiento con L-NAME redujo los niveles relativos del mRNA de VEGF en

tumores de células B16F10(Mock). La mayor reducción parece ocurrir a dosis bajas de L-NAME (7.5 mg/kg de L-NAME). Por otro lado, los tumores de células B16F10(Cav-1) presentaron niveles reducidos de VEGF, similarmente como se detectó en la figura 24. Sin embargo, en tumores de células B16F10(Cav-1) el tratamiento con concentraciones más elevadas de L-NAME (30 mg/kg) parecía promover la expresión de VEGF *in vivo*. Por lo tanto, los resultados sugieren que el incremento en el tamaño tumoral y la expresión de VEGF esta mediado por una enzima NOS en tumores de células B16F10(Mock), mientras que los tumores de células B16F10(Cav-1) presentarían una menor actividad NOS y por ende un tamaño tumoral reducido y una menor expresión de VEGF *in vivo*.



**Figura 29: Expresión de VEGF en tumores en ratones C57BL/6 inoculados con células B16F10(Mock) y (Cav-1) tratados con L-NAME.**

**a)** niveles del mRNA de VEGF analizados por RT-PCR en ratones tratados con L-NAME. Se aisló mRNA de tumores provenientes de ratones tratados vía intraperitoneal con L-NAME (rango concentración 7,5 a 30 mg/kg peso). El mRNA fue tratado con DNAsa, se sintetizó cDNAs a partir del cual se amplificó VEGF y Actina (control de carga). La masa molecular de los fragmentos de PCR se indica en pares de bases (pb) y con flechas se señalan las isoformas 121 y 165 de VEGF. **b)** Posteriormente, los niveles de VEGF normalizados por Actina, fueron analizados por densitometría. n=3 ratones por grupo experimental).

## Resumen de los principales resultados

1. Caveolina-1 reduce actividad gen reportero de HIF en hipoxia en líneas celulares de origen diverso, mediante la sobreexpresión estable de pLacIOP(Caveolina-1) en células HT29(US) y B16F10, transitoria en células HEK293T o mediado por el *knock down* de Caveolina-1 en MDA-MB231.
2. Caveolina-1 reduce la expresión de genes blanco de HIF1 $\alpha$ , *in vitro* e *in vivo*, en líneas celulares en hipoxia (HT29(US)C14) o en tumores formados por células establemente transfectadas con Caveolina-1 (B16F10(Cav-1)).
3. La reducción en la actividad del gen reportero de HIF, no se asoció con reducción en los niveles proteicos, la reducción en la vida media de HIF1 $\alpha$ , ni alteraciones en la localización nuclear de la proteína en células HT29(US).
4. En normoxia, el tratamiento con DETA/NO indujo el aumento en la actividad transcripcional de HIF en células HT29(US) sin diferencias dependientes de la sobreexpresión de Caveolina-1, sugiriendo que la adición de NO es capaz de prevenir la inhibición de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1.
5. En hipoxia, el tratamiento con inhibidor de arginasa, BEC, incrementó la actividad del gen reportero de HIF en células HT29(US) transfectadas con pLacIOP(Caveolina-1), indicando que la inhibición de arginasa, bloquea parcialmente la inhibición de la actividad de HIF por Caveolina-1, probablemente vía aumento de la producción de NO.
6. El tratamiento con los inhibidores de NOS L-NAME (general) y L-NIO (selectivo NOS3) inhibe el aumento del gen reportero de HIF en hipoxia, en células HT29(US) sugiriendo que NOS3 y NO está implicado en la activación de HIF en hipoxia. Además, se detectó colocalización entre Caveolina-1 y NOS3 tanto en normoxia como hipoxia.
7. *In vivo*, la sobreexpresión de Caveolina-1 en células HT29(US) y B16F10 redujo el crecimiento tumoral y la expresión de VEGF. La sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  previno la supresión de tumores por Cav-1, en células HT29(US)C14 inoculadas

por la vía subcutánea en ratones SCID-Beige, mientras que el tratamiento sistémico con L-NAME, redujo el tamaño de tumores B16F10(Mock) y la expresión de VEGF comparable a los tumores B16F10(Cav-1) en ratones C57BL/6, sugiriendo *in vitro* e *in vivo* que el incremento de actividad de HIF depende de NOS.

## DISCUSIÓN

En esta tesis, se evaluó el rol de HIF1 $\alpha$  en la función supresora de tumores de Caveolina-1 en células carentes de E-Cadherina. Caveolina-1 ha sido descrita como un potente supresor tumoral en distintos modelos celulares, como carcinoma de colon (Bender et al., 2000), melanoma murino (Diaz, 2013; Lobos-Gonzalez L., 2013), cáncer de mama (Lee et al., 1998), carcinoma laríngeo (Gu et al., 2007). Nuestro laboratorio, propuso que el efecto supresor de tumores de Caveolina-1 pudiese estar asociado con la inhibición de la vía de  $\beta$ -Catenina TCF/LEF en adenocarcinoma de colon, dependiente de la expresión de la proteína de adhesión celular E-Cadherina (Rodriguez et al., 2009; Torres et al., 2007; Torres et al., 2006). Sin embargo, la inhibición de la transcripción de la vía de  $\beta$ -Catenina TCF/LEF no es esencial para el efecto supresor de tumores de Caveolina-1, ya que en ausencia de la expresión de E-Cadherina, Caveolina-1 suprime igualmente el crecimiento tumoral (Lobos-Gonzalez L., 2013), lo que sugiere que debe existir mecanismo(s) adicionales que expliquen este efecto de Caveolina-1.

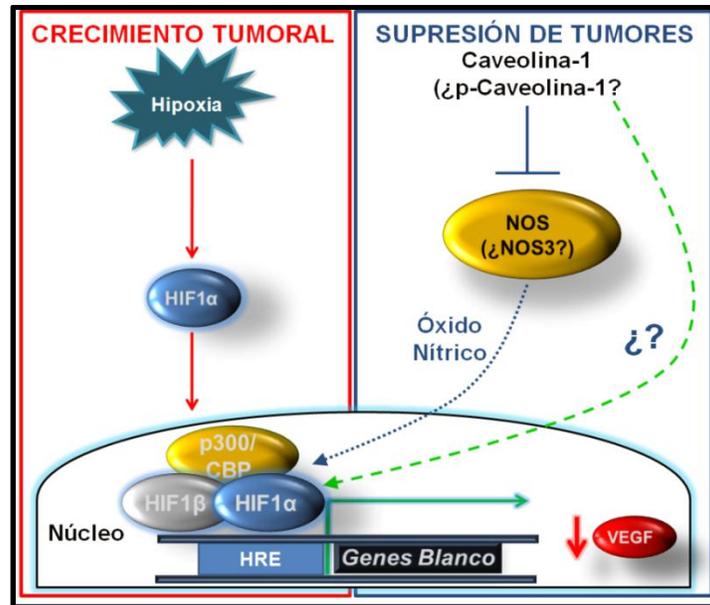
Por otro lado, resultados obtenidos por el grupo de M. Lisanti, analizando el estroma de pacientes con cáncer mamario y fibroblastos del ratón K.O para Caveolina-1, encontraron un incremento en la expresión de genes blancos de HIF1 $\alpha$ , sugiriendo la existencia de una relación inversa entre la expresión de Caveolina-1 y HIF1 $\alpha$  en estroma. Este efecto fue asociado a recurrencia de tumor mamario, sugiriendo que este balance podría determinar la formación de un tumor, en un mecanismo desconocido hasta este momento (Martinez-Outschoorn et al., 2010; Pavlides et al., 2010; Witkiewicz et al., 2011). Es importante destacar que hasta esta fecha, no se han publicado trabajos que investiguen la contribución de HIF1 $\alpha$  en la acción supresora de tumores de Caveolina-1 en células tumorales en hipoxia.

Por lo demás, cabe resaltar que ensayos de formación de tumores realizados en xenógrafos, han demostrado que tumores derivados de células HT29 y B16F10 son hipóxicos, debido a que al inicio del ensayo las células crecen en un ambiente avascular (Dings et al., 2007; Li et al., 2007b). Por ello, consideramos relevante desde el punto de vista biológico, emplear hipoxia para simular el microambiente tumoral.

Para determinar si Caveolina-1 modifica la señalización vía HIF en hipoxia, se realizaron ensayos de gen reportero. Se usó un gen reportero que contiene tres copias de elementos de respuesta a hipoxia (HRE), provenientes de la región promotora del gen de la enzima fosfoglicerato quinasa (Brown et al., 2006). Los resultados mostraron que la sobreexpresión de Caveolina-1 en células HT29(US) reduce la actividad del gen reportero de HIF en hipoxia mientras que el silenciamiento de la expresión de Caveolina-1 con un shRNA en células MDA-MB231 incrementó la actividad del gen reportero de HIF en hipoxia (**Figuras 5, 7**). Puesto que los elementos de respuesta a hipoxia HRE, son comunes para todos los factores inducibles por hipoxia (Greer et al., 2012) y que actualmente existe un intenso debate en sí las distintas isoformas sensibles a oxígeno de HIF pueden regular la expresión de un mismo gen (Kaidi et al., 2006; Keith et al., 2011; Xue and Shah, 2013), optamos por determinar la expresión de varios genes blanco de HIF1 $\alpha$ . Para ello, analizamos la expresión del mRNA de VEGF, GLUT-1 y LDH-A (Jensen et al., 2006; Lee et al., 2009). Nuestros experimentos mostraron que la expresión del mRNA de VEGF fue la más afectada por la sobreexpresión de Caveolina-1 tanto en hipoxia como *in vivo* (**Figuras 6 y 27**). Por otro lado, ensayos de formación de tumores en ratones inmunosuprimidos SCID-Beige, inoculados con células establemente transfectadas con Caveolina-1 y HIF1 $\alpha$ , mostraron que la expresión forzada de HIF1 $\alpha$  fue capaz de prevenir el efecto supresor de tumor de Caveolina-1 *in vivo* (**Figura 24a**), sugiriendo que HIF1 $\alpha$  es inhibido por Caveolina-1 tanto *in vitro* como *in vivo*.

Además, el tratamiento con el dador de NO, DETA/NO incrementó la actividad del gen reportero de HIF y los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$ , previniendo la inhibición de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1 en normoxia (**Figura 21**). Además, la inhibición de arginasa con BEC, bloqueó parcialmente la inhibición de la actividad del gen reportero de HIF en hipoxia (**Figura 22**) indicando que la inhibición de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1 involucra al NO. Asimismo, mediante el uso de los inhibidores de las isoformas de NOS L-NAME (general), L-NIO (NOS3) y 1400W (NOS2), pudimos identificar que NOS3 participa en el aumento de la actividad de HIF1 $\alpha$  en hipoxia (**Figura 17**) e *in vivo*, la inhibición de NOS con L-NAME reduce el tamaño de los tumores B16F10(Mock) al mismo nivel que tumores B16F10(Cav-1) (**Figura 28**), indicando que la diferencia en el volumen de los tumores puede ser consecuencia de un incremento en la actividad NOS presente en tumores B16F10(Mock).

**Por lo tanto, en base a los resultados anteriormente expuestos proponemos el siguiente modelo:**



**Figura 30: Caveolina-1 reduce la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  y la expresión de VEGF *in vitro* e *in vivo* involucrando la inhibición de la síntesis de NO.**

En hipoxia, HIF1 $\alpha$  se estabiliza permitiendo su translocación al núcleo donde heterodimeriza con HIF1 $\beta$ . En forma de heterodímero, HIF1 $\alpha$  se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) presentes en las regiones promotoras de sus genes blancos, entre ellos el factor de crecimiento vascular de endotelio (VEGF). Para promover la transcripción, HIF1 $\alpha$  debe asociarse con co-activadores transcripcionales como p300/CBP, que entre otras funciones, bloquea la hidroxilación inhibitoria del dominio C-terminal. Cuando Caveolina-1 se expresa, se inhibe la señalización vía HIF1 $\alpha$  en un mecanismo indirecto que involucra al óxido nítrico y la actividad de NOS (eventualmente NOS3), potencialmente reduciendo la asociación de HIF1 $\alpha$  con el co-activador transcripcional p300/CBP, llevando a la disminución de la expresión de VEGF y el crecimiento tumoral (línea azul punteada en el esquema). Por otro lado, eventualmente pueden existir vías alternativas que sean modulados por la presencia de Caveolina-1, independientes de la inhibición de NOS que den cuenta en parte de la inhibición de HIF1 $\alpha$  (línea punteada verde). Además, Caveolina-1 es fosforilado en tirosina 14 en hipoxia, eventualmente alterando la asociación a proteínas en hipoxia como NOS3. Por otro lado, la presencia de Caveolina-1 induce arresto en el ciclo celular en hipoxia, probablemente reduciendo la proliferación celular.

### 1.1. Caveolina-1 reduce la actividad dependiente de HIF1 $\alpha$ en hipoxia.

Los experimentos mostraron que la inhibición de la actividad del gen reportero de HIF depende de la presencia de Caveolina-1 (Figuras 5, 7) y conlleva la reducción de la expresión de VEGF *in vitro* e *in vivo* (Figuras 6, 27). Además, este efecto fue observado en líneas celulares de origen diverso: HT29(US) (adenocarcinoma de colon), MDA-MB231 (cáncer de mama), B16F10 (melanoma murino) y HEK293T

(células embrionarias de riñón humano) (**Figuras 5,7 S1 y S2**). Igualmente, la inhibición de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1 ocurrió independientemente de la sobreexpresión estable (**Figura 5**) o transitoria (**Figura S1**) de Caveolina-1. Similar resultado se obtuvo cuando, la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  se evaluó en células establemente transfectadas con el plasmidio reportero de HIF pcDNA-HRE-Luc (**Figura S2**). Por otro lado, la inhibición del gen reportero de HIF por Caveolina-1 fue específica, ya que la sobreexpresión de Caveolina-1 fue incapaz de inhibir la expresión de Luciferasa de un vector de expresión constitutiva como pCMV-Luc en células HT29(US) o B16F10 (**Figura S5**). **Por lo tanto, los resultados indican que la presencia de Caveolina-1 reduce la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  en hipoxia, asociándose con la reducción de la expresión de VEGF (Figura 30).**

## **1.2 La inhibición de la actividad dependiente de HIF1 $\alpha$ involucra la acción de sintasas de óxido nítrico *in vitro* e *in vivo***

Nuestros resultados indicaron que la inhibición de la actividad de HIF1 $\alpha$  no involucra un mecanismo de secuestro por parte de Caveolina-1 (**Figuras 12, 13 y 14**), sugiriendo que la inhibición de la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  involucra un mecanismo indirecto de inhibición. Comúnmente, las células tumorales expresan NOS2 y con menor frecuencia NOS3 o NOS1 (Fukumura et al., 2006). En particular, NOS3 es detectada en un modelo de carcinogénesis inducida por azoximetano, como en biopsias de pacientes con cáncer de colon (Escribano et al., 2004; Yagihashi et al., 2000). Además, NOS3 es ampliamente expresado en otros tipos de cáncer, como tumor mamario (Martin et al., 2000), melanoma maligno (Tu et al., 2006), entre otros (Fukumura et al., 2006) y la activación de NOS3 es requerido tanto para la iniciación como para el mantenimiento de los tumores (Lim et al., 2008), sugiriendo que NOS3 es importante para el desarrollo tumoral. Por lo demás, el NO y la actividad de NOS es importante para la estabilización proteica, como en la capacidad transactivadora de HIF1 $\alpha$  en normoxia como hipoxia (Chowdhury et al., 2012; Li et al., 2007a; Mateo et al.,

2003; Park et al., 2008; Quintero et al., 2006). Por otro lado, la sobreexpresión de Caveolina-1, reduce la producción de NO, a través de la disminución de los niveles proteicos de NOS2 en hipoxia (2% O<sub>2</sub>) en células SK-N-MC (Shen et al., 2008). Además, se ha detectado un aumento en la liberación de NO en células vasculares lisas de aorta provenientes del ratón K.O. de Caveolina-1 (Drab et al., 2001), indicando que Caveolina-1 reduce la producción de NO, por modulación de la actividad NOS. Debido a estos antecedentes nos interesó evaluar la contribución del NO y NOS en la inhibición de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1.

El tratamiento con concentraciones crecientes del inhibidor general de NOS, L-NAME, bloqueó el incremento en la actividad del gen reportero de HIF en hipoxia a niveles similares a células con Caveolina-1 (**Figura 17a**). Interesantemente, *in vivo* la inhibición de NOS con L-NAME (administrado vía intraperitoneal), tuvo un marcado efecto antitumoral, reduciendo el volumen de los tumores formados por células B16F10(Mock), a un nivel similar a los tumores formados por células B16F10(Cav-1) (**Figura 28**) y reduciendo la expresión del mRNA de VEGF *in vivo* (**Figura 29**). Consistentemente con nuestros resultados, la inhibición de NOS3 con L-NAME, presenta un importante efecto antitumoral en xenógrafos de cáncer de páncreas (Lampson et al., 2012). Por lo demás, el tratamiento con inhibidores selectivos de las NOS sugieren que la inhibición de la actividad del gen reportero de HIF involucra la activación de NOS3, pero no de NOS2 (**Figura 17**). Además, la expresión proteica de NOS3 fue detectada en células HT29(US), donde colocalizó con Caveolina-1 en la membrana plasmática (**Figuras 18 y 19**), sugiriendo que la inhibición de NOS3 por Caveolina-1 reduce la actividad de HIF1 $\alpha$ .

Para evaluar la contribución del NO usamos dos aproximaciones: suplementar con NO exógeno usando el dador de NO DETA/NO o incrementar la producción de NO endógena a niveles más fisiológicos con el inhibidor de arginasa BEC. DETA/NO libera NO a razón de 2 moles/mol de dador con una vida media de 20 h a 37°C

(Maragos et al., 1993). El tratamiento con DETA/NO, incrementó la actividad del gen reportero de HIF y los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$ , previniendo la inhibición de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1 en normoxia. Inesperadamente, no observamos una respuesta aditiva del gen reportero de HIF en hipoxia, lo que impidió evaluar la contribución del NO en hipoxia con este dador de NO (**Figuras 20 y 21a**). Es importante destacar que los dadores de NO presentan algunos inconvenientes, debido a que la liberación de NO a partir de estos compuestos no es uniforme en el tiempo, además de presentarse algunos efectos biológicos asociados a la formación de especies reactivas de nitrógeno, distintas a NO (peroxinitrito, nitrosotioles, dióxido de nitrógeno radical) (Chowdhury et al., 2012). Por otro lado, dadores de NO como DETA/NO o nitrosoglutatión en etapas tempranas de la hipoxia inducen la estabilización de HIF1 $\alpha$ , mientras que a tiempos más prolongados induce su degradación (Callapina et al., 2005), debido a que aumentan la actividad de PHD en hipoxia, promoviendo la degradación de HIF1 $\alpha$  (Berchner-Pfannschmidt et al., 2007).

En hipoxia, se requiere bajos niveles fisiológicos de NO para lograr la estabilización proteica de HIF1 $\alpha$  (Chowdhury et al., 2012). Para aumentar los niveles de NO en hipoxia a niveles más fisiológicos, inhibimos la enzima Arginasa (competidor de NOS por el uso del sustrato L-Arginina) con BEC (100  $\mu$ M) (**Figura 22a**) (Durante et al., 2007; Khong et al., 2012). Asimismo, se ha visto que la inhibición de arginasa con BEC o con siRNA incrementa la producción de NO en hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 24 h) en células microvasculares endoteliales de pulmón humano (Krotova et al., 2010). El tratamiento con BEC, revirtió parcialmente la inhibición de la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1 en hipoxia (**Figura 22b**). Por otro lado, es importante destacar que el análisis de inmunoprecipitados de Caveolina-1, por espectrometría de masas, identificó que arginasa-1 co-inmunoprecipita con Caveolina-1 en células HT29(US) (Rodriguez, 2009) y hemos logrado medir actividad arginasa (medido como producción de urea) en células HT29(US), indicando que nuestras células expresan arginasa (resultado preliminar no mostrado). Por lo tanto, proponemos que la sobreexpresión de Caveolina-1

produce una reducción en la actividad de NOS, posiblemente NOS3, disminuyendo la producción de NO, reduciendo la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  *in vitro*, reduciendo el crecimiento de tumores y la expresión de un gen blanco de HIF1 $\alpha$  (VEGF) *in vivo* (Figura 30).

**En conjunto, los resultados indican que la inhibición de la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1 involucra la inhibición NOS, potencialmente NOS3, reduciendo la producción de NO, lo que se asociaría con crecimiento tumoral.**

### **1.3 NOS3 y Caveolina-1.**

NOS3 sintetiza NO de manera pulsátil, dependiendo de la concentración de calcio y de la asociación de muchas proteínas que pueden activar o disminuir su actividad. Caveolina-1 es un conocido inhibidor de la actividad de NOS3 al desplazar a Calmodulina y Hsp90, llevando a la inhibición de la enzima (Forstermann and Sessa, 2012) mediante asociación directa (Garcia-Cardena et al., 1996). Mecanísticamente, no existe mucha claridad en cómo Caveolina-1 inhibe la activación de NOS3 en hipoxia. Se ha propuesto que la hipoxia incrementa la asociación de Caveolina-1 con NOS3 en células endoteliales de pulmón (John et al., 2006; Liu et al., 2009) y que la hipoxia prolongada induce la relocalización de NOS3 desde la membrana plasmática al aparato de Golgi y al retículo endoplasmático, donde NOS3 es secuestrado por Caveolina-1 en células del endotelio pulmonar (Mukhopadhyay et al., 2007). Por otro lado, se ha visto que el tratamiento con el ionóforo de calcio A23187 en células HUVEC (células endoteliales provenientes de la vena del cordón umbilical) aumenta la asociación de NOS3 con Caveolina-1, involucrando a la fosforilación de Caveolina-1 en tirosina 14. Además, la sobreexpresión de la variante fosfomimética de Caveolina-1 (Y14D) redujo la actividad de NOS3 comparado con la variante fosfonula (Y14F), sugiriendo que la inhibición de la actividad de NOS3 depende de la fosforilación de Caveolina-1 en tirosina 14 (Chen et al., 2012). Sin embargo, a diferencia de

endotelio, en nuestras células, NOS3 se distribuye principalmente en la membrana plasmática donde colocalizó con Caveolina-1, sin observarse una acumulación en algún compartimento intracelular (**Figuras 18, 19**). Además, hipoxia indujo la fosforilación de Caveolina-1 en tirosina 14 (**Figura S7**). **Cuál es la función de la fosforilación de Caveolina-1 en tirosina 14 en la asociación de Caveolina-1 y NOS3 en hipoxia y cómo esto contribuye a la inhibición de la señalización vía HIF1 $\alpha$ , son interrogantes que serán evaluadas en futuras investigaciones (Figura 30).**

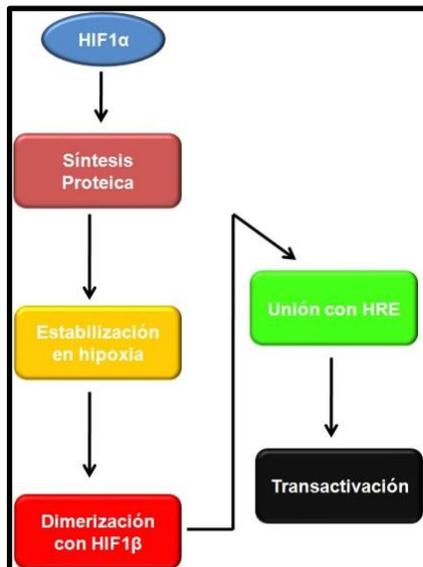
#### **1.4. HIF1 $\alpha$ y el efecto supresor de tumores de Caveolina-1.**

La activación de HIF1 $\alpha$  en tumores es necesaria para el desarrollo tumoral (Hopfl et al., 2002). La expresión forzada de HIF1 $\alpha$  incrementa el crecimiento de tumores y la inhibición de HIF1 $\alpha$  a través de inhibidores farmacológicos como mediante el silenciamiento de la proteína producen el efecto opuesto (Semenza, 2010), indicando que la activación de HIF1 $\alpha$  es importante para el desarrollo tumoral. Para evaluar la contribución de HIF1 $\alpha$  en supresión de tumores mediada por Caveolina-1, realizamos ensayos de formación de tumores en dos modelos distintos: ratones SCID-Beige inoculados con células HT29(US) y ratones C57BL/6 inoculados con células B16F10 (**Figuras 23, 28**). En ambos casos, la sobreexpresión de Caveolina-1 redujo el crecimiento de los tumores, en concordancia por lo reportado anteriormente por nuestro laboratorio (Bender et al., 2000; Diaz, 2013; Lobos-Gonzalez L., 2013). Por otro lado, logramos establecer líneas celulares con bajos niveles de sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  (**Figura 24b**), las que al ser usadas en este ensayo revelaron que la sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  previene el efecto supresor de tumor de Caveolina-1 *in vivo* (**Figura 24a**), en concordancia con lo publicado por otros grupos (Akakura et al., 2001; Ravi et al., 2000), **sugiriendo que HIF1 $\alpha$  es un blanco de acción de Caveolina-1 *in vivo*.**

Además, en nuestros experimentos pudimos observar la disminución de la expresión proteica de Caveolina-1 *in vivo* (**Figura 23**), de modo similar a lo publicado por nuestro grupo anteriormente (Bender et al., 2000) y podría ser el resultado de la activación de la autofagia y la inducción de HIF1 $\alpha$  en el tumor (Martinez-Outschoorn et al., 2010).

### 1.5 Caveolina-1 y regulación de HIF1 $\alpha$

En base a nuestro modelo propuesto (**Figura 30**), la producción de NO vía disminución actividad NOS se ve disminuida cuando se sobreexpresa Caveolina-1 reduciendo la actividad de HIF1 $\alpha$  en hipoxia. Sin embargo, nos preguntamos a qué nivel Caveolina-1 regula a HIF1 $\alpha$ . Debido a la regulación de HIF1 $\alpha$ , una vez que se sintetiza, HIF1 $\alpha$  debe ser estabilizado, lo que permite su translocación y posterior dimerización en el núcleo con HIF1 $\beta$ . A continuación, HIF1 $\alpha$  se puede unir a sus elementos de respuesta presentes en las regiones promotoras de sus genes blancos y mediante el reclutamiento de coactivadores, HIF1 $\alpha$  promueve transcripción (**Figura 31**).



**Figura 31: Eventos asociados a la activación de HIF1 $\alpha$  en donde Caveolina-1 pudiese inhibir a HIF1 $\alpha$ .**

HIF1 $\alpha$  es sintetizado constantemente y concomitantemente degradado en normoxia. La hipoxia permite la estabilización de la proteína, con posterior translocación al núcleo y unión a los HRE en forma de heterodímero con HIF1 $\beta$ . Posteriormente, HIF1 $\alpha$  recluta a co-activadores permitiendo la transcripción de sus genes blancos. Figura adaptada desde (Semenza, 2012).

De esta manera, la inhibición de HIF1 $\alpha$  mediada por Caveolina-1, puede ser el resultado de la acción de Caveolina-1 a distintos niveles involucrados en la activación de HIF1 $\alpha$  (**Figura 31**). La presencia de Caveolina-1 podría: **i) modificar los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$** : sea alterando la síntesis proteica o modificando la estabilidad proteica; **ii) Afectar la translocación al núcleo**: comprometiendo la dimerización con HIF1 $\beta$  o reduciendo la unión de HIF1 $\alpha$  a las regiones promotoras de sus genes blancos o bien afectando la función transactivadora de HIF1 $\alpha$  (Semenza, 2012).

### **i) Niveles proteicos de HIF1 $\alpha$**

Se ha descrito que algunos inhibidores de HIF1 $\alpha$  (agonistas del receptor  $\alpha$  de los proliferadores peroxisomales, inhibidores de Hsp90, inhibidores de las histonas desacetilazas) reducen los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  induciendo la degradación vía proteosoma (Liu et al., 2007; Qian et al., 2006; Zhou et al., 2012), mientras que otros no modifican los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$ .

Nuestros resultados mostraron que la presencia de Caveolina-1, mediada por la sobreexpresión en células HT29(US), HEK293T o a través del *knock-down* de la proteína en células MDA-MB231, no modificó los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  en hipoxia (**Figuras 8 y S3**), ni alteró la vida media de HIF1 $\alpha$  al simular hipoxia en células HT29(US) (**Figura 9**), **indicando que Caveolina-1 no altera los niveles de HIF1 $\alpha$  en hipoxia.**

Es importante destacar que la inhibición de HIF1 $\alpha$  con doxorubicina (un agente antineoplásico) reduce la señalización de HIF1 $\alpha$  al reducir la unión de HIF1 $\alpha$  a sus regiones consensos en el ADN, sin modificar los niveles proteicos (Lee et al., 2009). Por otro lado, Bortezomib (inhibidor del proteosoma) inhibe al dominio de activación C-terminal de HIF1 $\alpha$  (C-TAD), teniendo como consecuencia la reducción de la expresión de VEGF y la anhidrasa carbónica IX en hipoxia (Kaluz et al., 2006). **Lo anterior, permite plantearse la alternativa de que la presencia de Caveolina-1 afecte eventos asociados a la translocación al núcleo y/o eventos relacionados con la transactivación de HIF1 $\alpha$  en hipoxia.**

## ii) **Afectar la translocación al núcleo**

Otra alternativa para explicar el efecto inhibitorio de Caveolina-1 sobre HIF1 $\alpha$ , es que Caveolina-1 retenga a HIF1 $\alpha$  en el citoplasma, previniendo la translocación al núcleo de HIF1 $\alpha$ , por ende reduciendo la heterodimerización con HIF1 $\beta$ , la asociación con los elementos HRE y la transactivación de sus genes blancos (**Figura 31**). Frecuentemente, Caveolina-1 causa la secuestro de proteínas a través de su dominio de andamiaje, vía interacción CSD-CBD (Quest et al., 2013). Por otro lado, se ha visto que la localización subcelular de Caveolina-1 es variable, detectándose incluso en el núcleo de líneas células de cáncer de ovario (Li et al., 2001; Sanna et al., 2007). Inesperadamente, los análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal no mostraron colocalización entre ambas proteínas en células HT29(US) en normoxia como en hipoxia (**Figuras 13 y 14**), a pesar de haber detectado co-inmunoprecipitación entre HIF1 $\alpha$  y Caveolina-1 en células HT29(US) tratadas con DFO. Cabe destacar que en este último caso, fallamos en detectar co-inmunoprecipitación al realizar la inmunoprecipitación recíproca (es decir, inmunoprecipitación contra Caveolina-1 y Western blot para HIF1 $\alpha$ ) y no pudimos inmunoprecipitar HIF1 $\alpha$  en hipoxia (resultados no mostrados).

En concordancia, ambas proteínas se detectaron en compartimentos distintos en los experimentos. Además, la sobreexpresión de Caveolina-1, no fue capaz de alterar la translocación al núcleo de HIF1 $\alpha$ , ni retener una fracción de HIF1 $\alpha$  en el citoplasma (**Figuras 12, 13 y 14**). Asimismo, el tratamiento con un péptido correspondiente al dominio de andamiaje de Caveolina-1, fue incapaz de inhibir la actividad del gen reportero de HIF (**Figura 11**), sugiriendo que la inhibición de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1 parece no depender del dominio de andamiaje de Caveolina-1. **Por lo tanto, en conjunto, los resultados indican que la sobreexpresión de Caveolina-1 no secuestra a HIF1 $\alpha$  ni altera su capacidad de translocar al núcleo. Además, estos resultados, dejan en evidencia que la inhibición de HIF1 $\alpha$  por Caveolina-1 es indirecta, ya que no involucra la secuestro de HIF1 $\alpha$  (**Figuras 30, 31**).**

## 1.6 Vías alternativas para la inhibición de HIF1 $\alpha$ por Caveolina-1

Nuestros resultados experimentales, no nos permiten descartar la existencia de otros mecanismos alternativos que expliquen la inhibición de la actividad de HIF1 $\alpha$  en hipoxia mediada por Caveolina-1 (**Figura 30**). Además, las células tumorales presentan frecuentemente múltiples alteraciones que les permiten adquirir el fenotipo tumoral (Hanahan and Weinberg, 2000). En cáncer de colon, la señalización de  $\beta$ -catenina TCF/LEF, se encuentra alterada promoviendo proliferación celular (Morin et al., 1997). Por otro lado, resultados obtenidos en el Laboratorio indican que Caveolina-1 es incapaz de inhibir la transcripción de  $\beta$ -Catenina TCF/LEF en células HT29(US) ni en B16F10, debido a que Caveolina-1 no interactúa con  $\beta$ -Catenina en normoxia (Torres et al., 2007). Se ha propuesto que  $\beta$ -Catenina actúa como co-factor de HIF1 $\alpha$  en hipoxia, incrementando la transcripción mediada por HIF1 $\alpha$ , promoviendo sobrevivencia celular y adaptación a hipoxia, a través de la asociación entre ambas proteínas en hipoxia (Kaidi et al., 2007; Xi et al., 2012). Por otro lado, especulamos que la fosforilación en tirosina 14 de Caveolina-1 observada en hipoxia (**Figura S7**) podría dar un ambiente apropiado para permitir la asociación con  $\beta$ -Catenina, por ende reduciendo la transcripción dependiente de HIF1 $\alpha$  en hipoxia. **Experimentos futuros, como análisis de inmunoprecipitados de Caveolina-1 mediante espectrometría de masas, deberán identificar proteínas que se asocian a Caveolina-1 en hipoxia. Por otro lado, se deberán evaluar cuáles, de estas asociaciones, son dependientes de la fosforilación de Caveolina-1.**

## 1.7. Efecto de la hipoxia en la viabilidad celular

En este trabajo nos propusimos investigar el rol de Caveolina-1 en hipoxia en células tumorales. Inesperadamente, hasta la fecha, esto ha sido muy poco abordado en la literatura. Quisimos evaluar si la hipoxia afecta la viabilidad celular o compromete la progresión del ciclo celular.

Distintas líneas de investigación han mostrado que Caveolina-1 reduce la proliferación celular. Por ejemplo, se ha visto que la sobreexpresión de Caveolina-

1 reduce la proliferación celular e induce muerte en células MCF7 (Wu et al., 2008). Sin embargo, no se ha evaluado aún cuál es el efecto de la sobreexpresión de Caveolina-1 en la viabilidad celular y la progresión del ciclo celular en hipoxia. Por otro lado, en células de carcinoma escamoso laríngeo, la presencia de Caveolina-1 produce arresto del ciclo celular en fase  $G_1/G_0$ , incrementando la muerte celular, debida a inhibición de la vía de MAPK (Gu et al., 2007). Importante, en ambos casos Caveolina-1 inhibe la formación de tumores. Sin embargo, en nuestras células (HT29(US) y B16F10, líneas celulares utilizadas en los ensayos de formación de tumores) la sobreexpresión de Caveolina-1 no altera la viabilidad ni afecta el ciclo celular en condiciones basales (normoxia) (**Figuras 15 y 16**) (Torres et al., 2007). No obstante, en hipoxia la sobreexpresión de Caveolina-1 causó el arresto del ciclo celular en fase  $G_1/G_0$ , con la consiguiente reducción en el porcentaje de células en fases S sin afectar la fracción de células en  $G_2/M$  (**Figura 16, Tabla 3**), ni producir la muerte celular (**Figura 15**). Además, la detención del ciclo celular mediada por la presencia de Caveolina-1, aparentemente no es causada por la inhibición de la vía de MAPK, debido a que no observamos cambios en el estado de fosforilación de ERK a las 24 h de hipoxia (**Figura S6**), contrariamente a lo reportado por otros grupos (Gu et al., 2007; Salem et al., 2011). Además, este efecto sería independiente de la inhibición de la vía de  $\beta$ -Catenina TCF/LEF (Torres et al., 2007), indicando que la presencia de Caveolina-1 altera la progresión del ciclo celular en un contexto tumoral (hipoxia). Sin embargo, no podemos descartar que a exposiciones más prolongadas de hipoxia, la presencia de Caveolina-1 favorezca la muerte celular; aunque, en algunos experimentos pilotos realizados a 72 h de hipoxia, no observamos un claro incremento en la muerte celular debido a la sobreexpresión de Caveolina-1 (resultado no mostrado). Además, se ha demostrado que HIF1 $\alpha$  estabiliza a p53, mediante la interacción entre ambas proteínas a través del dominio ODD de HIF1 $\alpha$ . Por su parte, una vez estabilizado p53 induce la degradación proteosomal de HIF1 $\alpha$ , mediada por la ubiquitina ligasa Mdm2, llevando a la muerte celular por apoptosis en células incubadas en hipoxias sometidas a radiación ionizante, indicando que la activación de p53 gatilla muerte celular frente a daño al DNA

(Mazumdar et al., 2009). Por otro lado, p53 se encuentra mutado en células HT29 [línea parental de la que deriva HT29(US)] (Rodrigues et al., 1990; Torres et al., 2007) y cuando p53 está mutado, no induce muerte celular (Mazumdar et al., 2009). **Por lo tanto, experimentos adicionales deberán confirmar cómo el arresto en el ciclo celular lleva a la reducción en la proliferación celular tanto *in vitro* como *in vivo* o si además, la presencia de Caveolina-1 sensibiliza a las células a la muerte celular *in vivo* lo que podría además explicar el efecto en supresión de tumores.**

## **1.8 Limitaciones de nuestros hallazgos**

### **i) Condiciones experimentales y microambiente tumoral**

El microambiente tumoral es sumamente complejo. Recientemente, se ha identificado regiones donde la hipoxia es crónica, mientras otras zonas sufren períodos alternados de hipoxia/reoxigenación, definidos como regiones de hipoxia cíclica. Por otro lado, el área tumoral que está sometida a hipoxia parece ser característica del tipo de tumor analizado (Matsumoto et al., 2010; Yasui et al., 2010). Las condiciones experimentales que usamos en nuestros experimentos (1% O<sub>2</sub>, 24 horas), nos permiten extrapolar los resultados a una condición de hipoxia moderada y aguda. Pudimos verificar que la presencia de Caveolina-1 no alteró la viabilidad celular en hipoxia (**Figura 15**), indicando que la disminución en la actividad del gen reportero de HIF no era causada por muerte de las células. Por lo tanto, es plausible especular que nuestras condiciones de hipoxia (1% O<sub>2</sub>) son compatibles con la supervivencia celular. Sin embargo, no podemos descartar que la viabilidad se vea afectada a exposiciones más prolongadas.

Por otro lado, la hipoxia causa que el microambiente tumoral sea ácido, debido a que las células tumorales utilizan la glicólisis como principal fuente energética para la producción de ATP, generando un exceso de protones. Importantemente, la disminución del pH intracelular compromete la viabilidad celular (Hanahan and Weinberg, 2011; Vander Heiden et al., 2009). Recientemente, se ha descrito que la hipoxia (1% O<sub>2</sub>) protege a las células de la muerte celular, ya que los niveles de

ATP se mantienen elevados preservando la viabilidad celular, mientras que en anoxia (0.1 % O<sub>2</sub>) la producción de ATP decae, induciendo muerte celular. Asimismo, la depleción de ATP producida mediante el uso del análogo 2-deoxiglucosa induce la pérdida de la protección a la muerte celular en hipoxia, reduciendo los niveles de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  (Parks et al., 2013). **Cómo la presencia de Caveolina-1 pudiese sensibilizar a la muerte celular a través de la inhibición de la actividad de HIF1 $\alpha$  en hipoxia/reoxigenación o hipoxia combinada con acidez podría ser interesante de evaluar en un estudio posterior.**

## ii) NO y NOS3

Se debe notar que el tratamiento con el péptido AP-CSD, un inhibidor específico de NOS3 (Bucci et al., 2000; Gratton et al., 2003), no fue capaz de prevenir el incremento en la actividad del gen reportero de HIF en hipoxia (**Figura 11**). Probablemente, esto fuese debido a una baja internalización por las células y/o por su baja solubilidad, la que se manifestó con la precipitación del péptido a concentraciones de 10  $\mu$ M (**Figura 10** y resultado no mostrado), a pesar de que este péptido posee una secuencia de internalización (Derossi et al., 1996; Derossi et al., 1994). **Por lo tanto, estrategias experimentales que contemplen mejorar la solubilidad, incrementar la captación o reducir la duración de la hipoxia, deberán realizarse para confirmar este resultado.**

## 1.9 Perspectivas

### i) Sintetas de óxido nítrico y arginasa

En este trabajo proponemos que el efecto inhibitorio de HIF1 $\alpha$  mediado por Caveolina-1 es mediado por NO y activación de NOS3. El NO es un mensajero gaseoso de vida media muy reducida *in vivo* (1-5 s) (Burke et al., 2013), el que se produce en baja concentración por parte de NOS3 (Forstermann and Sessa, 2012). Intentamos determinar la producción de NO en nuestras células mediante

la reacción de Greiss (Felley-Bosco et al., 2000; Pfeiffer et al., 1997). Sin embargo, no nos fue posible detectar acumulación de nitrito en sobrenadantes de células en hipoxia, debido a la baja sensibilidad de esta metodología (Silva P., resultados sin publicar), por lo que podemos especular que la producción de NO es moderada bajo nuestras condiciones experimentales. Recientemente, Chowdhury y cols., reportó en células de cáncer de colon HCT116 tratadas en hipoxia (3% O<sub>2</sub> por 4-6 h), que la producción de NO es aproximadamente 300 nM (Chowdhury et al., 2012). **Por lo tanto métodos más sensibles para la determinación de NO deberán realizarse para confirmar que la sobreexpresión de Caveolina-1 reduce la producción de NO en hipoxia.**

Nuestros experimentos muestran que NOS3 es expresado y colocaliza con Caveolina-1 en células HT29(US). Sin embargo, experimentos de inmunoprecipitación, deberán confirmar la asociación entre ambas proteínas. Además, se necesita realizar experimentos que intervengan el complejo formado. Recientemente, se ha desarrollado un péptido derivado del dominio de andamiaje de Caveolina-1, denominado Cavnoxina, el cual desplaza a NOS3 del complejo con Caveolina-1, restaurando la producción de NO (Bernatchez et al., 2011). **Por lo tanto, una buena estrategia para confirmar la causalidad del efecto, sería evaluar si el tratamiento con Cavnoxina altera el efecto supresor de tumores de Caveolina-1 y la expresión del mRNA de VEGF en ensayos de formación de tumores en ratones C57BL/6.**

Además, en base a las condiciones experimentales que usamos en los experimentos (1% O<sub>2</sub>, 24 h principalmente), planteamos que hipoxia moderada, podría ser un buen modelo para estudiar la contribución de NOS3 a la progresión del cáncer en ausencia de inducción de NOS2, ya que la inducción de NOS2 parece estar más restringida a hipoxia severa (Frerart et al., 2009). En este sentido, especulamos que en la hipoxia se produce un switch entre las isoformas de NOS: en hipoxia moderada Caveolina-1 inhibe a NOS3; mientras que en hipoxia severa, NOS2 se induce y es inhibida por Caveolina-1.

Por otro lado, las células HT29(US) expresan arginasa (competidor endógeno de NOS) y presentan actividad arginasa medible (resultado preliminar no mostrado) y el inhibidor de arginasa, BEC revierte parcialmente la inhibición de la actividad del gen reportero de HIF en hipoxia (**Figura 22**). Un escenario posible es que Caveolina-1 favorezca la actividad arginasa en las células, contribuyendo a disminuir la producción de NO. Experimentos adicionales, deberán realizarse para comprobar este escenario.

## **ii) Factores inducibles por hipoxia**

La respuesta a hipoxia es compleja, involucrando la acción de distintas vías de señalización. Nosotros nos focalizamos en HIF1 $\alpha$ , como el principal representante de la familia de factores inducibles por hipoxia. Nuestros experimentos no nos permitieron identificar con claridad a qué nivel la señalización vía HIF1 $\alpha$  es afectada por la sobreexpresión de Caveolina-1 (**Figura 31**). Intentamos evaluar si la presencia de Caveolina-1 reduce la asociación de HIF1 $\alpha$  a los elementos de respuesta HRE mediante geles de retardo electroforético (EMSA). Sin embargo, no fue posible montar la técnica para llevar a cabo los experimentos.

Proponemos estudiar las distintas etapas involucradas en la transactivación mediada por HIF1 $\alpha$ . Para abordar si Caveolina-1 afecta la heterodimerización de HIF1 $\alpha$  con HIF1 $\beta$ , deberán realizarse ensayos de precipitación por afinidad (pulldown), como ha sido descrito previamente (Lee et al., 2009). Además, ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) podrían confirmar si Caveolina-1 interfiere con la asociación de HIF1 $\alpha$  con los elementos de respuesta a hipoxia.

Por otro lado, aún cuando no es del todo comprendido, se puede modificar la función transactivadora de HIF1 $\alpha$  sin alterar los niveles proteicos, ni su asociación con las regiones promotoras (Kaluz et al., 2006), por lo tanto, ensayos de inmunoprecipitación de HIF1 $\alpha$  con p300/CBP o evaluando la respuesta transactivadora con el sistema C-TAD-Gal4 (Jiang et al., 1997) podrían ayudar a responder estas interrogantes.

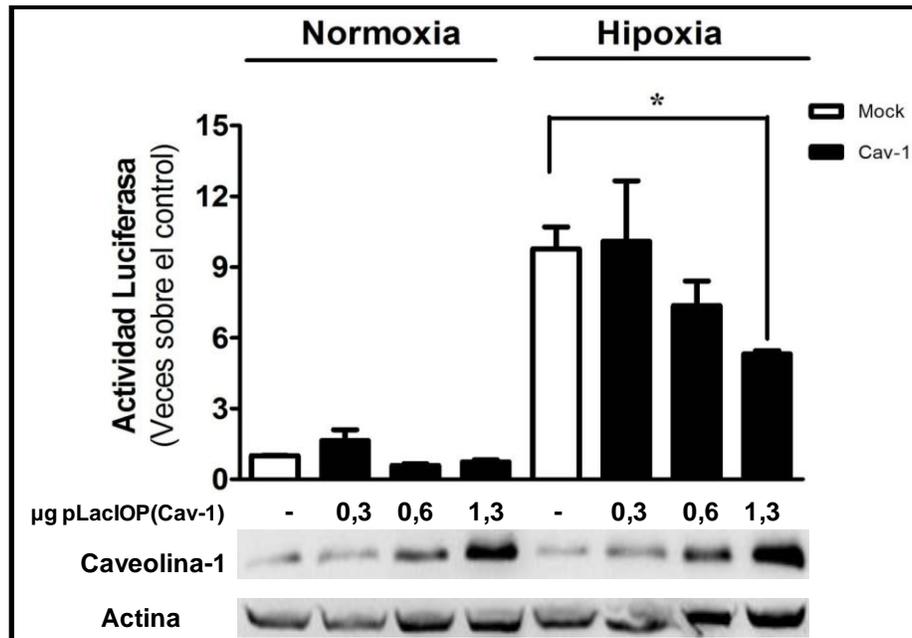
Finalmente, la activación tanto de HIF1 $\alpha$  como HIF2 $\alpha$  ocurre en cáncer (Semenza, 2010). Ambas isoformas son importantes para la adaptación a la hipoxia (Keith et al., 2011). Si Caveolina-1 puede afectar la activación de HIF2 $\alpha$  en cáncer es una pregunta que no podemos responder con los experimentos realizados hasta ahora y que sería interesante de evaluar en el futuro.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo, nos permiten proponer un modelo para explicar el efecto supresor de tumores de Caveolina-1 en células carentes de E-Cadherina, en un contexto que involucra el microambiente tumoral (hipoxia). Además, los resultados revelaron que la inhibición de la actividad de NOS por Caveolina-1, reduce la activación de HIF1 $\alpha$  en hipoxia e *in vivo*, contribuyendo al efecto supresor de tumores de Caveolina-1, validando nuestra hipótesis.

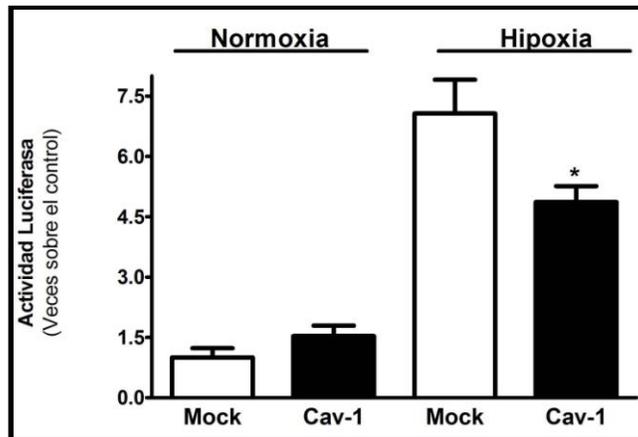
En base a estos resultados y considerando que la expresión de Caveolina-1 se pierde en cáncer, la inhibición de HIF1 $\alpha$  mediada por Caveolina-1 pudiese ser importante en las etapas tempranas de proceso de tumorigénesis. En base estos hallazgos, pudiese ser interesante en el futuro diseñar estrategias farmacológicas con el fin de impedir la adaptación de las células tumorales a la hipoxia en cáncer.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO



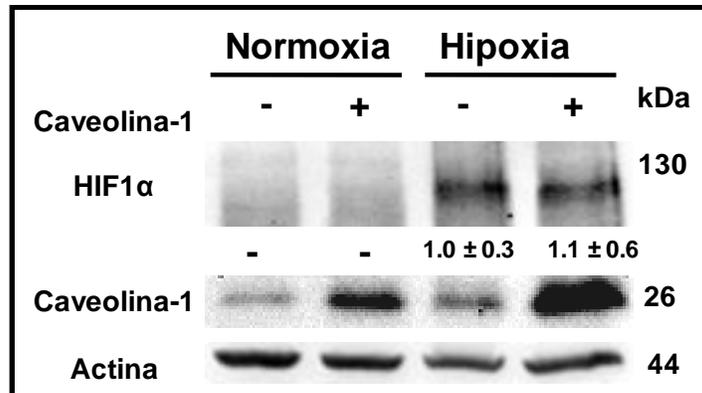
**Figura Suplementaria 1: La presencia de Caveolina-1 reduce la actividad transcripcional de HIF en células HEK293T.**

Células HEK293T ( $1 \times 10^6$ ) fueron co-transfectadas con concentraciones crecientes del plasmidio pLacIOP(Cav-1) (0.3 a 1.3 µg de ADN) y los plasmidios pON y pGL3HRE. Como control se co-transfectó células HEK293T con 1.3 µg de plasmidio pLacIOP y los plasmidios pON y pGL3HRE. Después de 24 h de inducción con IPTG 1 mM, las células fueron expuestas a hipoxia (1% oxígeno en cámara de hipoxia Biospheryx) o bien normoxia (5% CO<sub>2</sub> + 95% aire) por 24 h en presencia de IPTG 1 mM. Finalizado este período, las células fueron recolectadas y se determinó la actividad luciferasa y la actividad β-galactosidasa. La actividad luciferasa pGL3HRE de cada punto fue normalizada por la actividad de la β-galactosidasa. Además, se verificó la sobreexpresión de Caveolina-1 en extractos celulares, mediante Western Blot. Se determinaron los niveles de Actina como control interno. Los resultados corresponden al promedio ± SEM de n = 3 experimentos (\* p ≤ 0.05 Mock vs Cav-1).



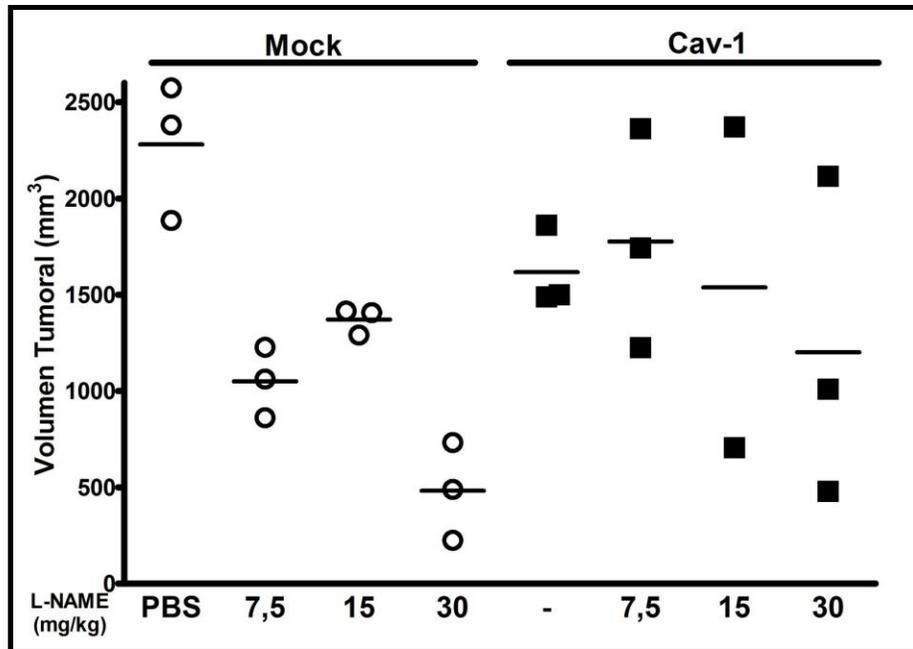
**Figura Suplementaria 2: Efecto de la presencia de Caveolina-1 sobre la actividad transcripcional de HIF en células B16F10 establemente transfectadas con el gen reportero de HIF pcDNA-HRE-Luc.**

Células B16F10 (Mock) y (Cav-1) establemente transfectadas con el gen reportero de HIF (plasmidio pcDNA-HRE-Luc) fueron cultivadas por 24 h con IPTG (1 mM) para inducir la expresión de Caveolina-1. A continuación, las células fueron incubadas en hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>) o bien normoxia (5% CO<sub>2</sub> + 95% aire) por 24 h en presencia de IPTG 1 mM. Finalizado este período, se cuantificó la actividad luciferasa en los extractos celulares, la que fue normalizada por mg de proteína. Los resultados de la actividad Luciferasa son expresados como veces sobre el control y corresponden al promedio ± SEM de n = 3 experimentos (\*p ≤ 0.05 Mock vs Cav-1 en hipoxia).



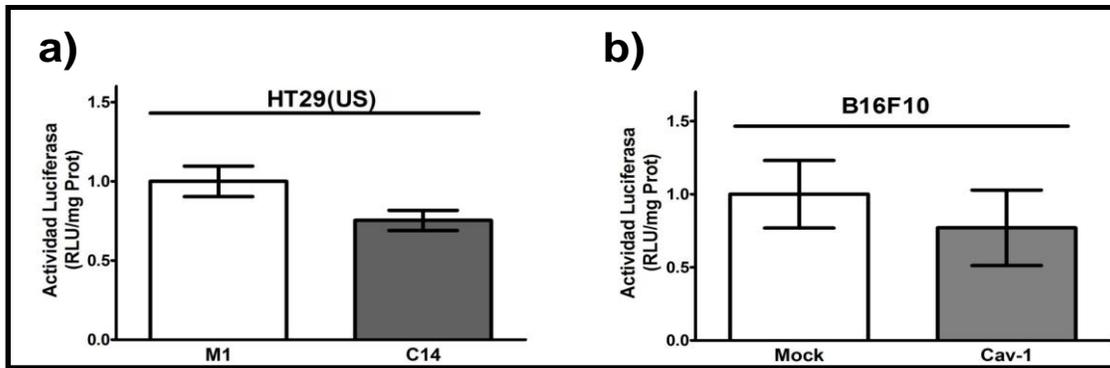
**Figura Suplementaria 3: La presencia de Caveolina-1 no reduce los niveles proteicos de HIF1α en células HEK293T expuestas a hipoxia.**

Células HEK293T ( $1 \times 10^6$ ) de fueron co-transfectadas con 1.3  $\mu\text{g}$  del plasmidio pLacIOP(Cav-1) (Caveolina-1 +) y los plasmidios pON y pGL3HRE. Como control se co-transfectó células HEK293T con 1.3  $\mu\text{g}$  de plasmidio pLacIOP (Caveolina-1 -) y los plasmidios pON y pGL3HRE. Después de 24 h de inducción con IPTG 1 mM, las células fueron expuestas a hipoxia (1% oxígeno, cámara de hipoxia Biospheryx) o bien normoxia (5%  $\text{CO}_2$  + 95% aire) por 24 h en presencia de IPTG 1 mM. Finalizado este periodo las células fueron lisadas para determinar los niveles proteicos de HIF1α mediante Western blot. Los resultados son expresados como los niveles de HIF1α normalizados por Actina y se presenta el promedio  $\pm$  SEM de  $n = 3$  experimentos. La masa molecular de las proteínas se indica en kDa.



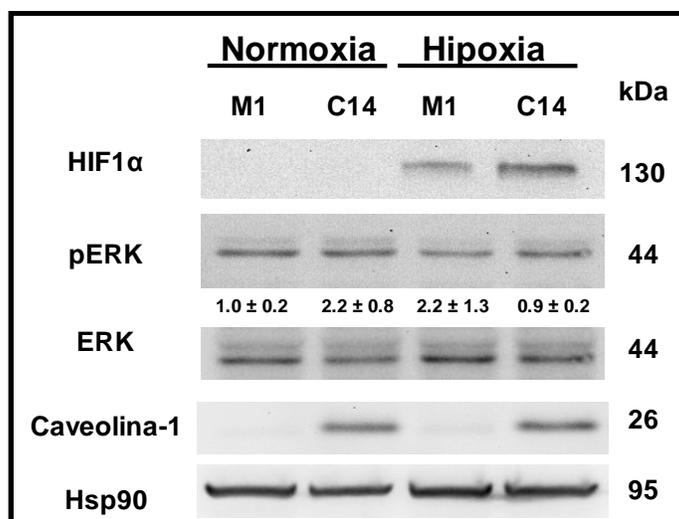
**Figura Suplementaria 4: Formación de tumores en ratones C57BL/6 inoculados con células B16F10(Mock) y (Cav-1) tratados con L-NAME.**

Ratones C57BL/6 fueron inoculados en un flanco con  $3 \times 10^5$  células B16F10 (Mock) o (Cav-1), respectivamente. Las células fueron incubadas con IPTG 1 mM por 48 h previas a la inoculación en ratones C57BL/6. Los animales fueron tratados con L-NAME 7.5, 15 ó 30 mg/Kg de peso por la vía intraperitoneal diariamente hasta el día de su sacrificio. En paralelo, los tumores fueron medidos todos los días y se calculó el tamaño del tumor formado, de acuerdo a lo indicado en la metodología. El resultado corresponde al promedio del tamaño tumoral 16 días post-inoculación de las células para un experimento con n=3 animales por grupo.



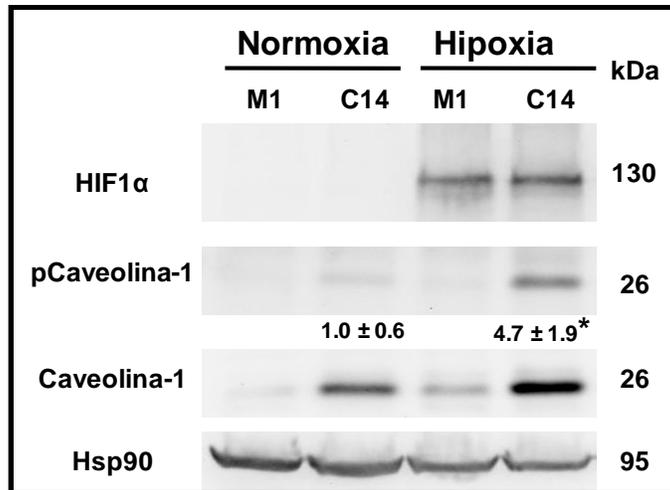
**Figura Suplementaria 5: Efecto de la presencia de Caveolina-1 sobre la actividad luciferasa del vector de expresión constitutiva pCMV-luc.**

Células HT29(US) (clones M1 y C14) y células B16F10 (Mock y Cav-1) (a y b, respectivamente), fueron establemente transfectadas con el plasmidio de expresión constitutiva del gen de la luciferasa pCMV-Luc. Luego de 24 h post-inducción de la expresión de Caveolina-1 con IPTG 1 mM, las células fueron lisadas y se determinó la actividad luciferasa en los extractos. La actividad luciferasa, fue normalizada por mg de proteína. Los resultados de la actividad Luciferasa son expresado como veces sobre el control y corresponden al promedio  $\pm$  SEM de n = 3 experimentos.



**Figura Suplementaria 6: La presencia de Caveolina-1 no afecta la activación de ERK en hipoxia.**

Células HT29(US) (M1 y C14) fueron incubadas con IPTG 1 mM por 24 h, para inducir la expresión de Caveolina-1. Finalizado este periodo, las células fueron expuestas a hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94%N<sub>2</sub>) o bien normoxia (5% CO<sub>2</sub> + 95% aire) por 24 h en presencia de IPTG 1 mM. Luego, las células fueron lisadas y a partir de este extracto celular, se determinó por Western blot los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$ , pERK, ERK, Caveolina-1 y Hsp90 (control interno). Los resultados son expresados como los niveles de pERK normalizados por ERK y se presenta el promedio  $\pm$  SEM de n = 3 experimentos. El peso molecular de las proteínas se indica en kDa.



**Figura Suplementaria 7: La hipoxia aumenta la fosforilación de Caveolina-1.**

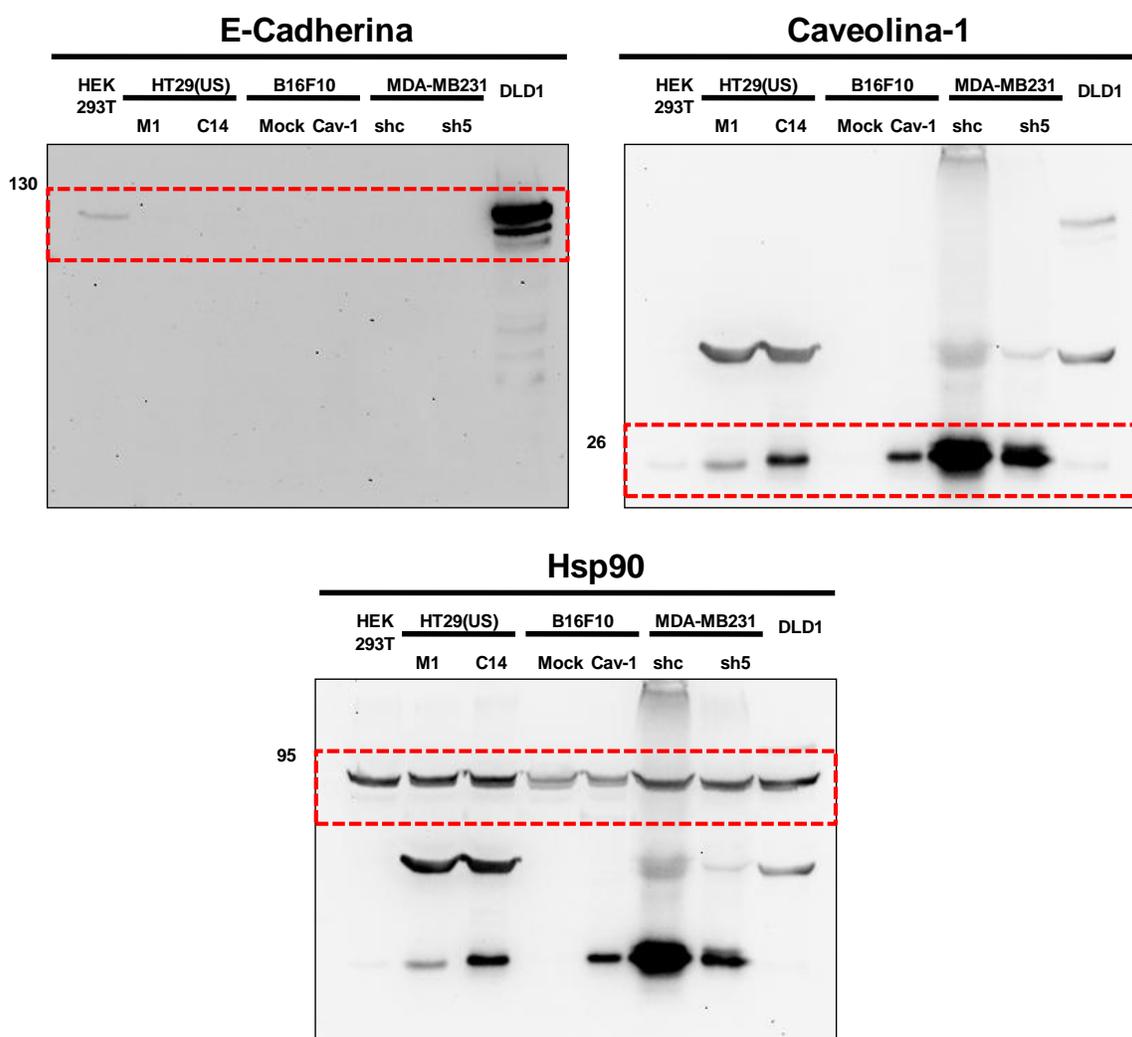
Células HT29(US) (M1 y C14) fueron incubadas con IPTG 1mM por 24 h, para inducir la expresión de Caveolina-1. Finalizado este periodo, las células fueron expuestas a hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94%N<sub>2</sub>) o bien normoxia (5% CO<sub>2</sub> + 95% aire) por 24 h en presencia de IPTG 1mM. Luego, las células fueron lisadas y a partir de este extracto celular, se determinó por Western blot los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$ , pCaveolina-1, Caveolina-1 y Hsp90 (control de carga). Los resultados son expresados como los niveles de pCaveolina-1 normalizados por Caveolina-1 y se presenta el promedio  $\pm$  SEM de n = 4 experimentos. (\*p $\leq$ 0.05 C14 normoxia vs C14 hipoxia). La masa molecular de las proteínas se indica en kDa.

## ANEXOS

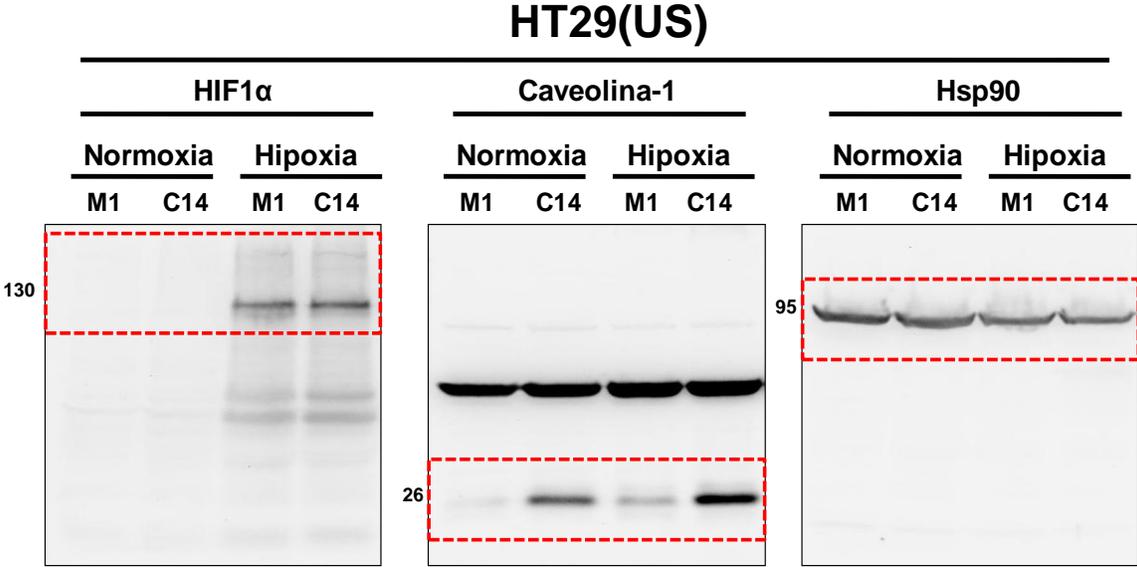
En esta sección se presentan gran parte las imágenes correspondientes a Western Blots presentadas en la sección resultados y material suplementario.

En esta sección, se indica a que Figura corresponde la imagen, el peso molecular aparente (kDa) y en un recuadro la banda correspondiente a la proteína indicada.

**Figura 4: Caracterización de los niveles proteicos de Caveolina-1 y E-Cadherina en diferentes líneas celulares.**



**Figura 8: Niveles proteicos de HIF1α en células HT29(US) (M1 y C14) y MDA-MB231 en hipoxia.**



**Figura 9: Vida Media de HIF1α**

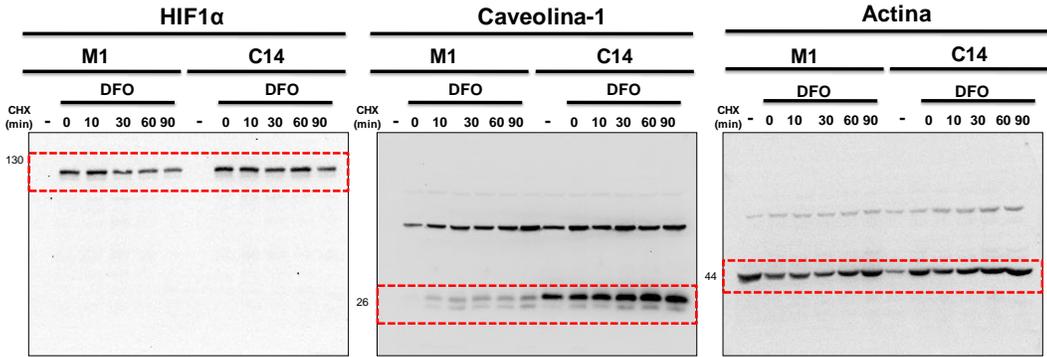


Figura 12: Distribución subcelular de HIF1α en células HT29(US) en hipoxia

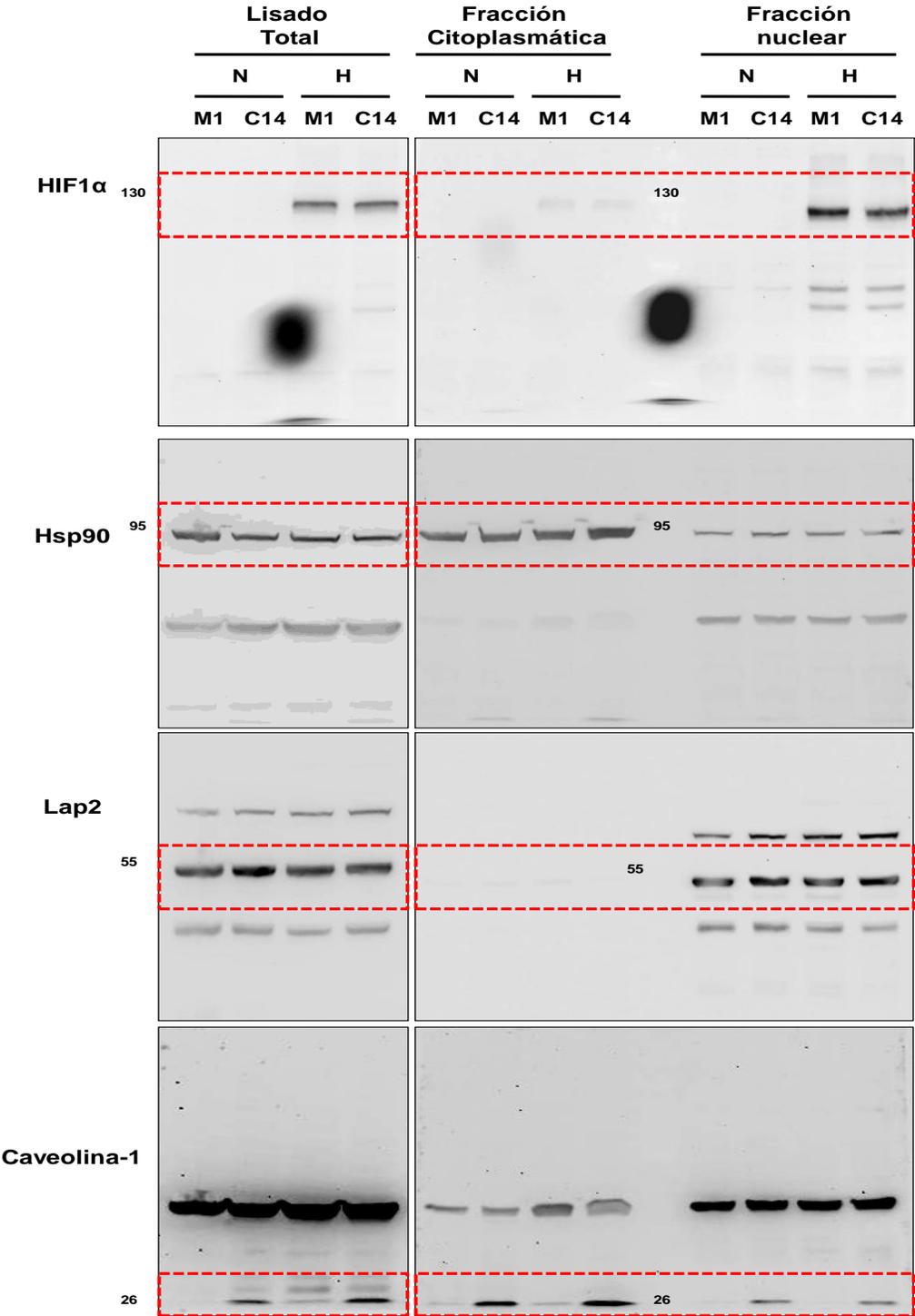


Figura 18: Efecto del dador de NO, DETA/NO sobre la estabilización de HIF1α

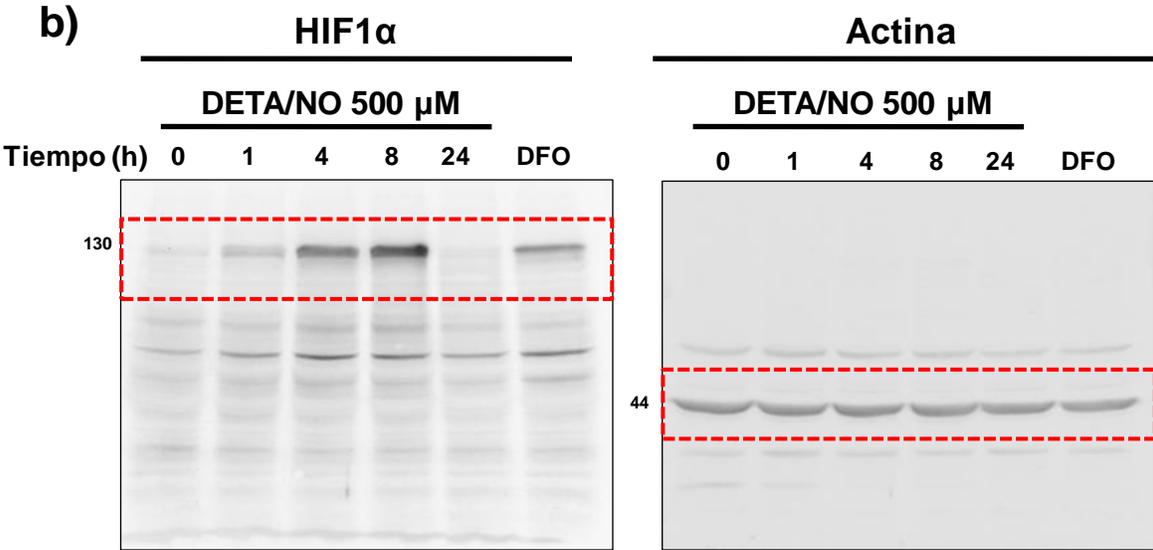
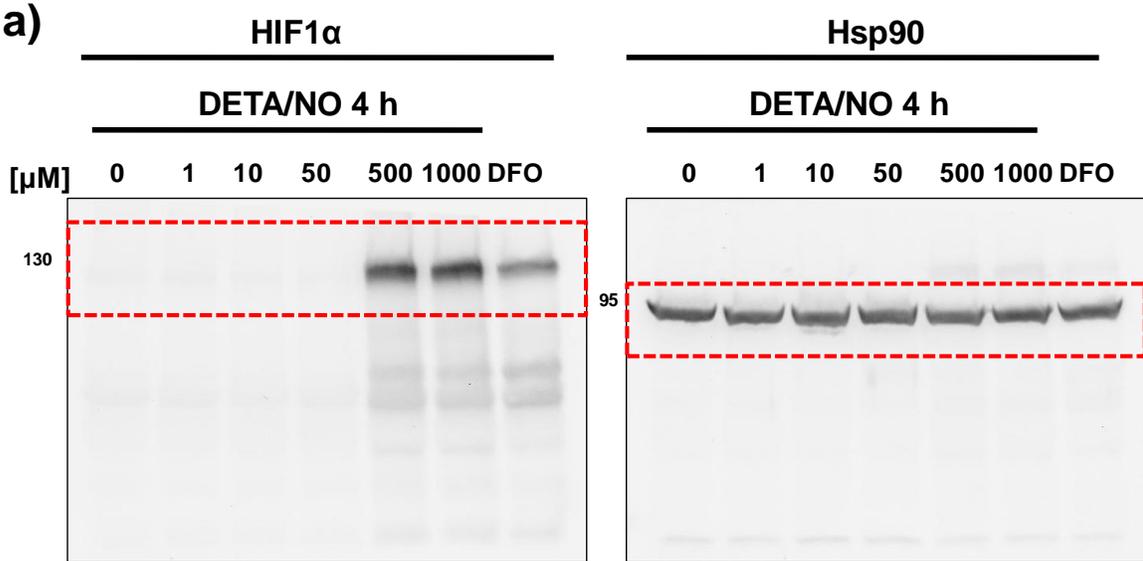
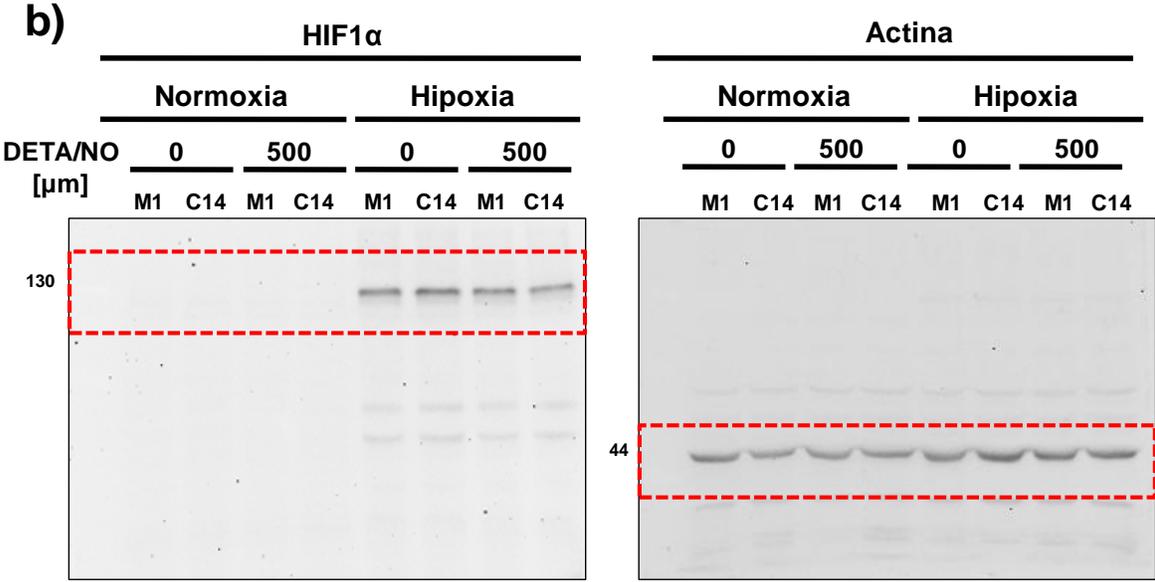


Figura 19: Efecto del dador de NO, DETA/NO sobre la actividad de HIF en células HT29(US) en hipoxia.



**Figura Suplementaria 6: La presencia de Caveolina-1 no afecta la activación de ERK en hipoxia.**

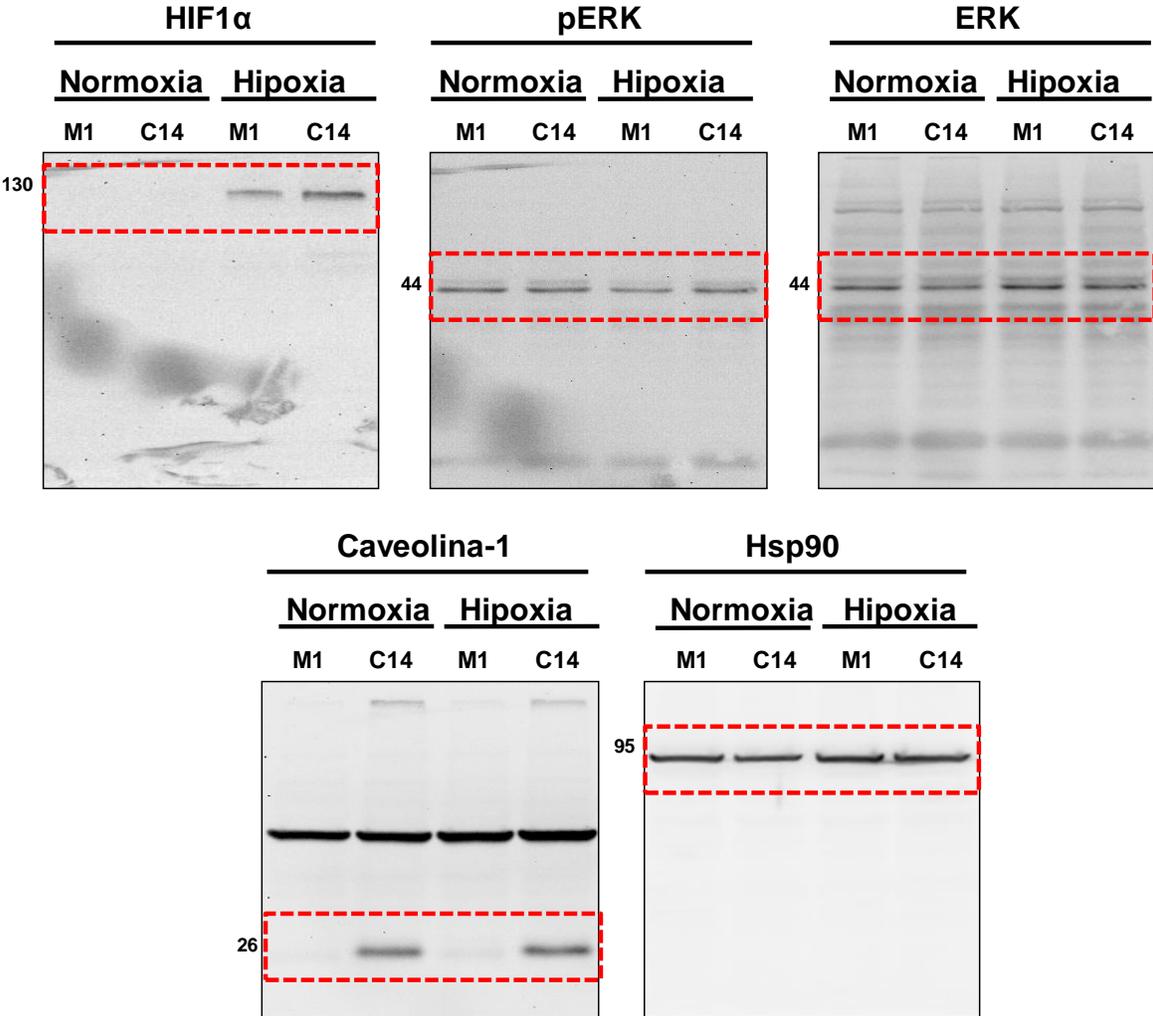
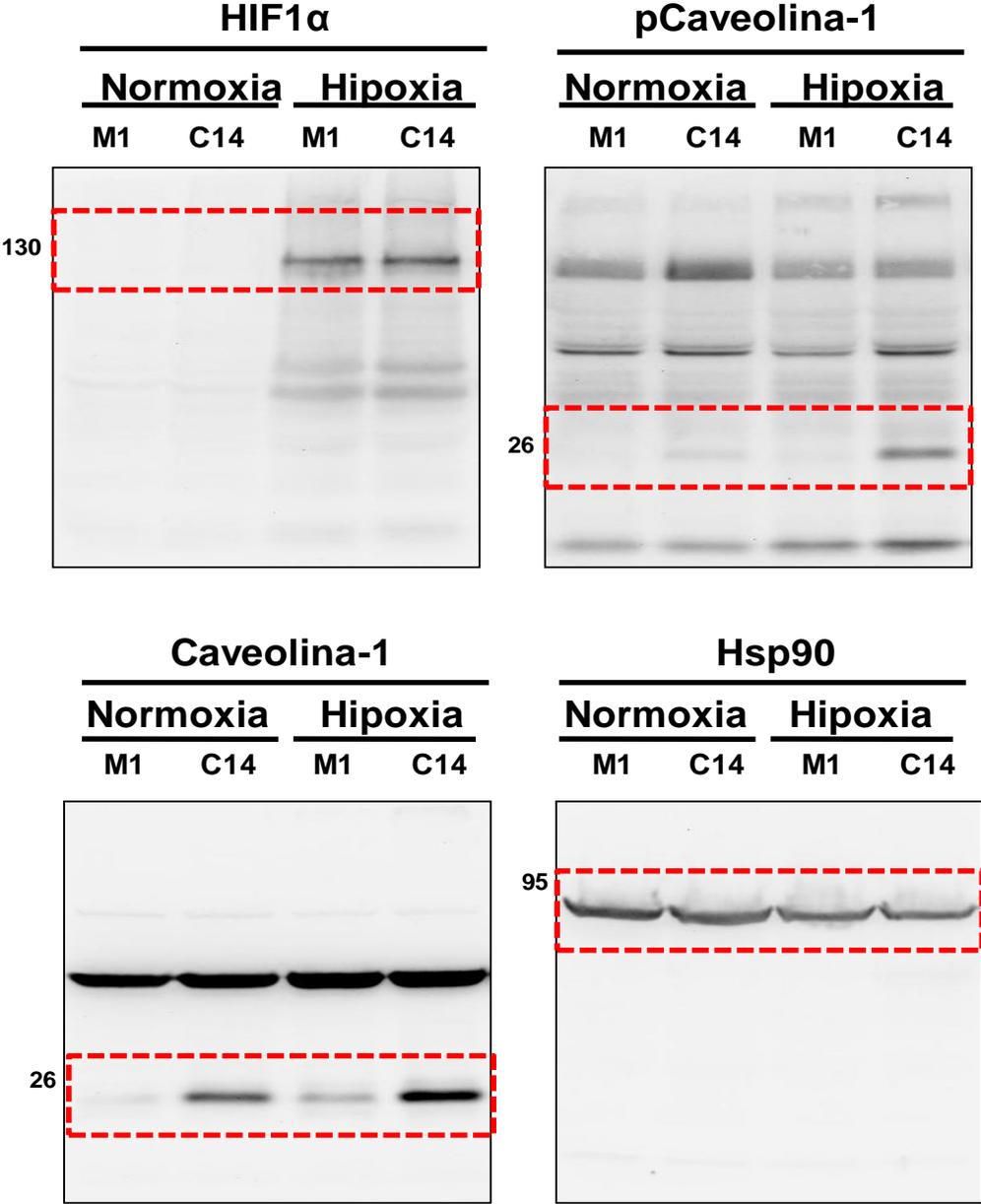


Figura Suplementaria 7: La hipoxia aumenta la fosforilación de Caveolina-1.



## BIBLIOGRAFÍA

- Akakura, N., Kobayashi, M., Horiuchi, I., Suzuki, A., Wang, J., Chen, J., Niizeki, H., Kawamura, K., Hosokawa, M., and Asaka, M. (2001). Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res* 61, 6548-6554.
- Allen, C.B., Schneider, B.K., and White, C.W. (2001). Limitations to oxygen diffusion and equilibration in in vitro cell exposure systems in hyperoxia and hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L1021-1027.
- Becker, A., Hansgen, G., Bloching, M., Weigel, C., Lautenschlager, C., and Dunst, J. (1998). Oxygenation of squamous cell carcinoma of the head and neck: comparison of primary tumors, neck node metastases, and normal tissue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42, 35-41.
- Bender, F.C., Reymond, M.A., Bron, C., and Quest, A.F. (2000). Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res* 60, 5870-5878.
- Berchner-Pfannschmidt, U., Yamac, H., Trinidad, B., and Fandrey, J. (2007). Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2. *J Biol Chem* 282, 1788-1796.
- Bernatchez, P., Sharma, A., Bauer, P.M., Marin, E., and Sessa, W.C. (2011). A noninhibitory mutant of the caveolin-1 scaffolding domain enhances eNOS-derived NO synthesis and vasodilation in mice. *J Clin Invest* 121, 3747-3755.
- Bernatchez, P.N., Bauer, P.M., Yu, J., Prendergast, J.S., He, P., and Sessa, W.C. (2005). Dissecting the molecular control of endothelial NO synthase by caveolin-1 using cell-permeable peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 761-766.
- Bosch, M., Mari, M., Herms, A., Fernandez, A., Fajardo, A., Kassan, A., Giralt, A., Colell, A., Balgoma, D., Barbero, E., *et al.* (2011). Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. *Curr Biol* 21, 681-686.
- Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2009). HIF at a glance. *J Cell Sci* 122, 1055-1057.
- Brown, J.M., and Wilson, W.R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 4, 437-447.
- Brown, L.M., Cowen, R.L., Debray, C., Eustace, A., Erler, J.T., Sheppard, F.C., Parker, C.A., Stratford, I.J., and Williams, K.J. (2006). Reversing hypoxic cell chemoresistance in vitro using genetic and small molecule approaches targeting hypoxia inducible factor-1. *Mol Pharmacol* 69, 411-418.
- Bucci, M., Gratton, J.P., Rudic, R.D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G., and Sessa, W.C. (2000). In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 6, 1362-1367.
- Burke, A.J., Sullivan, F.J., Giles, F.J., and Glynn, S.A. (2013). The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis* 34, 503-512.
- Callapina, M., Zhou, J., Schmid, T., Kohl, R., and Brune, B. (2005). NO restores HIF-1 $\alpha$  hydroxylation during hypoxia: role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 39, 925-936.
- Campos, X., Munoz, Y., Selman, A., Yazigi, R., Moyano, L., Weinstein-Oppenheimer, C., Lara, H.E., and Romero, C. (2007). Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 104, 168-175.
- Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C., and Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 15, 1239-1253.

Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.J., Labosky, P.A., Simon, M.C., and Keith, B. (2006). HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 20, 557-570.

Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331, 1559-1564.

Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., and Schumacker, P.T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem* 275, 25130-25138.

Chen, Z., Bakhshi, F.R., Shajahan, A.N., Sharma, T., Mao, M., Trane, A., Bernatchez, P., van Nieuw Amerongen, G.P., Bonini, M.G., Skidgel, R.A., *et al.* (2012). Nitric oxide-dependent Src activation and resultant caveolin-1 phosphorylation promote eNOS/caveolin-1 binding and eNOS inhibition. *Mol Biol Cell* 23, 1388-1398.

Chiu, W.T., Lee, H.T., Huang, F.J., Aldape, K.D., Yao, J., Steeg, P.S., Chou, C.Y., Lu, Z., Xie, K., and Huang, S. (2011). Caveolin-1 upregulation mediates suppression of primary breast tumor growth and brain metastases by stat3 inhibition. *Cancer Res* 71, 4932-4943.

Choi, A.M., Ryter, S.W., and Levine, B. (2013). Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 368, 651-662.

Chowdhury, R., Godoy, L.C., Thiantanawat, A., Trudel, L.J., Deen, W.M., and Wogan, G.N. (2012). Nitric oxide produced endogenously is responsible for hypoxia-induced HIF-1alpha stabilization in colon carcinoma cells. *Chem Res Toxicol* 25, 2194-2202.

Denko, N.C., Fontana, L.A., Hudson, K.M., Sutphin, P.D., Raychaudhuri, S., Altman, R., and Giaccia, A.J. (2003). Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns. *Oncogene* 22, 5907-5914.

Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 271, 18188-18193.

Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 269, 10444-10450.

Dewhirst, M.W., Cao, Y., Li, C.Y., and Moeller, B. (2007). Exploring the role of HIF-1 in early angiogenesis and response to radiotherapy. *Radiother Oncol* 83, 249-255.

Dewhirst, M.W., Cao, Y., and Moeller, B. (2008). Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 8, 425-437.

Diaz, M.I. (2013). Rol de la respuesta a proteínas mal plegadas en la actividad supresora de tumores de Caveolina-1 (Santiago, Universidad de Chile).

Dings, R.P., Loren, M., Heun, H., McNeil, E., Griffioen, A.W., Mayo, K.H., and Griffin, R.J. (2007). Scheduling of radiation with angiogenesis inhibitors anginex and Avastin improves therapeutic outcome via vessel normalization. *Clin Cancer Res* 13, 3395-3402.

Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., *et al.* (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449-2452.

Durante, W., Johnson, F.K., and Johnson, R.A. (2007). Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 906-911.

Egilmez, N.K., Harden, J.L., Virtuoso, L.P., Schwendener, R.A., and Kilinc, M.O. (2011). Nitric oxide short-circuits interleukin-12-mediated tumor regression. *Cancer Immunol Immunother* 60, 839-845.

Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha

regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4273-4278.

Engelman, J.A., Wykoff, C.C., Yasuhara, S., Song, K.S., Okamoto, T., and Lisanti, M.P. (1997). Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem* 272, 16374-16381.

Escribano, M., Molero, L., Lopez-Farre, A., Abarrategui, C., Carrasco, C., Garcia-Mendez, A., Manzarbeitia, F., Martin, M.J., Vazquez, M., Sanchez-Fayos, P., *et al.* (2004). Aspirin inhibits endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and Flk-1 (vascular endothelial growth factor receptor-2) prior to rat colon tumour development. *Clin Sci (Lond)* 106, 83-91.

Fantin, V.R., St-Pierre, J., and Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9, 425-434.

Felley-Bosco, E., Bender, F., and Quest, A.F. (2002). Caveolin-1-mediated post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in human colon carcinoma cells. *Biol Res* 35, 169-176.

Felley-Bosco, E., Bender, F.C., Courjault-Gautier, F., Bron, C., and Quest, A.F. (2000). Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14334-14339.

Forstermann, U., and Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33, 829-837, 837a-837d.

Frank, P.G., Cheung, M.W., Pavlides, S., Llaverias, G., Park, D.S., and Lisanti, M.P. (2006). Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H677-686.

Frerart, F., Lobysheva, I., Gallez, B., Dessy, C., and Feron, O. (2009). Vascular caveolin deficiency supports the angiogenic effects of nitrite, a major end product of nitric oxide metabolism in tumors. *Mol Cancer Res* 7, 1056-1063.

Fukumura, D., Kashiwagi, S., and Jain, R.K. (2006). The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 6, 521-534.

Galbiati, F., Volonte, D., Liu, J., Capozza, F., Frank, P.G., Zhu, L., Pestell, R.G., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12, 2229-2244.

Galluzzo, M., Pennacchietti, S., Rosano, S., Comoglio, P.M., and Michieli, P. (2009). Prevention of hypoxia by myoglobin expression in human tumor cells promotes differentiation and inhibits metastasis. *J Clin Invest* 119, 865-875.

Garcia-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B.S., Skidd, P.M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M.P., and Sessa, W.C. (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 272, 25437-25440.

Garcia-Cardena, G., Oh, P., Liu, J., Schnitzer, J.E., and Sessa, W.C. (1996). Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6448-6453.

Gillies, R.J., and Gatenby, R.A. (2007). Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 26, 311-317.

Goda, N., Ryan, H.E., Khadivi, B., McNulty, W., Rickert, R.C., and Johnson, R.S. (2003). Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 23, 359-369.

Gordan, J.D., Bertout, J.A., Hu, C.J., Diehl, J.A., and Simon, M.C. (2007). HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 11, 335-347.

Gratton, J.P., Lin, M.I., Yu, J., Weiss, E.D., Jiang, Z.L., Fairchild, T.A., Iwakiri, Y., Groszmann, R., Claffey, K.P., Cheng, Y.C., *et al.* (2003). Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. *Cancer Cell* 4, 31-39.

Greer, S.N., Metcalf, J.L., Wang, Y., and Ohh, M. (2012). The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J* 31, 2448-2460.

Gu, D., Li, H., Wang, Z., Chen, Q., Jiang, J., and Zhu, H. (2007). Caveolin-1 inhibits the growth of human laryngeal squamous cell carcinoma and down regulates EGFR-MAPKs signaling pathway. *Laryngoscope* 117, 1782-1789.

Hagen, T., Taylor, C.T., Lam, F., and Moncada, S. (2003). Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science* 302, 1975-1978.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Head, B.P., and Insel, P.A. (2007). Do caveolins regulate cells by actions outside of caveolae? *Trends Cell Biol* 17, 51-57.

Hetz, C.A., Hunn, M., Rojas, P., Torres, V., Leyton, L., and Quest, A.F. (2002). Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J Cell Sci* 115, 4671-4683.

Hopfl, G., Wenger, R.H., Ziegler, U., Stallmach, T., Gardelle, O., Achermann, R., Wergin, M., Kaser-Hotz, B., Saunders, H.M., Williams, K.J., *et al.* (2002). Rescue of hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient tumor growth by wild-type cells is independent of vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 62, 2962-2970.

Hu, Y.L., DeLay, M., Jahangiri, A., Molinaro, A.M., Rose, S.D., Carbonell, W.S., and Aghi, M.K. (2012). Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Res* 72, 1773-1783.

Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H.F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7987-7992.

Hubbi, M.E., Kshitiz, Gilkes, D.M., Rey, S., Wong, C.C., Luo, W., Kim, D.H., Dang, C.V., Levchenko, A., and Semenza, G.L. (2013). A Nontranscriptional Role for HIF-1alpha as a Direct Inhibitor of DNA Replication. *Sci Signal* 6, ra10.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., *et al.* (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350, 2335-2342.

Ikezu, T., Ueda, H., Trapp, B.D., Nishiyama, K., Sha, J.F., Volonte, D., Galbiati, F., Byrd, A.L., Bassell, G., Serizawa, H., *et al.* (1998). Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res* 804, 177-192.

Jensen, K.A., Luu, T.C., and Chan, W.K. (2006). A truncated Ah receptor blocks the hypoxia and estrogen receptor signaling pathways: a viable approach for breast cancer treatment. *Mol Pharm* 3, 695-703.

Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R., and Semenza, G.L. (1997). Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 272, 19253-19260.

John, T.A., Ibe, B.O., and Usha Raj, J. (2006). Oxygen alters caveolin-1 and nitric oxide synthase-3 functions in ovine fetal and neonatal lung microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L1079-1093.

Ju, H., Zou, R., Venema, V.J., and Venema, R.C. (1997). Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 272, 18522-18525.

Kaidi, A., Qualtrough, D., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2006). Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. *Cancer Res* 66, 6683-6691.

Kaidi, A., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2007). Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol* 9, 210-217.

Kaluz, S., Kaluzova, M., and Stanbridge, E.J. (2006). Proteasomal inhibition attenuates transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) via specific effect on the HIF-1alpha C-terminal activation domain. *Mol Cell Biol* 26, 5895-5907.

Keith, B., Johnson, R.S., and Simon, M.C. (2011). HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*.

Khong, S.M., Andrews, K.L., Huynh, N.N., Venardos, K., Aprico, A., Michell, D.L., Zarei, M., Moe, K.T., Dusting, G.J., Kaye, D.M., *et al.* (2012). Arginase II inhibition prevents nitrate tolerance. *Br J Pharmacol* 166, 2015-2023.

Kieda, C., El Hafny-Rahbi, B., Collet, G., Lamerant-Fayel, N., Grillon, C., Guichard, A., Dulak, J., Jozkowicz, A., Kotlinowski, J., Fylaktakidou, K.C., *et al.* (2013). Stable tumor vessel normalization with pO increase and endothelial PTEN activation by inositol trispyrophosphate brings novel tumor treatment. *J Mol Med (Berl)*.

Kim, N.N., Cox, J.D., Baggio, R.F., Emig, F.A., Mistry, S.K., Harper, S.L., Speicher, D.W., Morris, S.M., Jr., Ash, D.E., Traish, A., *et al.* (2001). Probing erectile function: S-(2-boronoethyl)-L-cysteine binds to arginase as a transition state analogue and enhances smooth muscle relaxation in human penile corpus cavernosum. *Biochemistry* 40, 2678-2688.

Klimova, T., and Chandel, N.S. (2008). Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ* 15, 660-666.

Koh, M.Y., Lemos, R., Jr., Liu, X., and Powis, G. (2011). The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1alpha- to HIF-2alpha-dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res* 71, 4015-4027.

Koh, M.Y., and Powis, G. (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci* 37, 364-372.

Koleske, A.J., Baltimore, D., and Lisanti, M.P. (1995). Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1381-1385.

Koong, A.C., Mehta, V.K., Le, Q.T., Fisher, G.A., Terris, D.J., Brown, J.M., Bastidas, A.J., and Vierra, M. (2000). Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48, 919-922.

Koumenis, C., and Wouters, B.G. (2006). "Translating" tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways. *Mol Cancer Res* 4, 423-436.

Krotova, K., Patel, J.M., Block, E.R., and Zharikov, S. (2010). Hypoxic upregulation of arginase II in human lung endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 299, C1541-1548.

Lampson, B.L., Kendall, S.D., Ancrile, B.B., Morrison, M.M., Shealy, M.J., Barrientos, K.S., Crowe, M.S., Kashatus, D.F., White, R.R., Gurley, S.B., *et al.* (2012). Targeting eNOS in pancreatic cancer. *Cancer Res* 72, 4472-4482.

Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., and Bruick, R.K. (2002a). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16, 1466-1471.

Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J., and Whitelaw, M.L. (2002b). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295, 858-861.

Lawrentschuk, N., Poon, A.M., Foo, S.S., Putra, L.G., Murone, C., Davis, I.D., Bolton, D.M., and Scott, A.M. (2005). Assessing regional hypoxia in human renal tumours using 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography. *BJU Int* 96, 540-546.

Lee, K., Qian, D.Z., Rey, S., Wei, H., Liu, J.O., and Semenza, G.L. (2009). Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2353-2358.

Lee, S.W., Reimer, C.L., Oh, P., Campbell, D.B., and Schnitzer, J.E. (1998). Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 16, 1391-1397.

Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z.N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M.W., and Li, C.Y. (2007a). Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell* 26, 63-74.

Li, W.P., Liu, P., Pilcher, B.K., and Anderson, R.G. (2001). Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J Cell Sci* 114, 1397-1408.

Li, X.F., Carlin, S., Urano, M., Russell, J., Ling, C.C., and O'Donoghue, J.A. (2007b). Visualization of hypoxia in microscopic tumors by immunofluorescent microscopy. *Cancer Res* 67, 7646-7653.

Lim, K.H., Ancrile, B.B., Kashatus, D.F., and Counter, C.M. (2008). Tumour maintenance is mediated by eNOS. *Nature* 452, 646-649.

Lisy, K., and Peet, D.J. (2008). Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ* 15, 642-649.

Liu, J., Gao, Y., Negash, S., Longo, L.D., and Raj, J.U. (2009). Long-term effects of prenatal hypoxia on endothelium-dependent relaxation responses in pulmonary arteries of adult sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296, L547-554.

Liu, P., Rudick, M., and Anderson, R.G. (2002). Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem* 277, 41295-41298.

Liu, Y.V., Baek, J.H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R.N., and Semenza, G.L. (2007). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell* 25, 207-217.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Lobos-Gonzalez L., A.L., Diaz J., Diaz N., Urra H., Torres V., Silva V., Fitzpatrick C., Lladser A., Hoek K.S., Leyton L., Quest AFG (2013). E-cadherin determines Caveolin-1 tumor suppression or metastasis enhancing function in melanoma cells. *Pigment Cell & Melanoma Research Accepted manuscript*.

Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W.J., Tanaka, H., and Poellinger, L. (2002). Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *J Biol Chem* 277, 32405-32408.

Maragos, C.M., Wang, J.M., Hrabie, J.A., Oppenheim, J.J., and Keefer, L.K. (1993). Nitric oxide/nucleophile complexes inhibit the in vitro proliferation of A375 melanoma cells via nitric oxide release. *Cancer Res* 53, 564-568.

Martin, J.H., Begum, S., Alalami, O., Harrison, A., and Scott, K.W. (2000). Endothelial nitric oxide synthase: correlation with histologic grade, lymph node status and estrogen receptor expression in human breast cancer. *Tumour Biol* 21, 90-97.

Martinez-Outschoorn, U.E., Trimmer, C., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Chiavarina, B., Zhou, J., Wang, C., Pavlides, S., Martinez-Cantarin, M.P., Capozza, F., *et al.* (2010). Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NFkappaB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle* 9, 3515-3533.

Mateo, J., Garcia-Lecea, M., Cadenas, S., Hernandez, C., and Moncada, S. (2003). Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem J* 376, 537-544.

Matsumoto, S., Yasui, H., Mitchell, J.B., and Krishna, M.C. (2010). Imaging cycling tumor hypoxia. *Cancer Res* 70, 10019-10023.

Mazumdar, J., Dondeti, V., and Simon, M.C. (2009). Hypoxia-inducible factors in stem cells and cancer. *J Cell Mol Med* 13, 4319-4328.

Mazure, N.M., and Pouyssegur, J. (2009). Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol* 22, 177-180.

Minsal (2010). Defunciones según grupo de edad, por Región, gran grupo de causas de muertes y sexo. Chile, 2010, Ministerio de Salud.

Mizokami, K., Kakeji, Y., Oda, S., and Maehara, Y. (2006). Relationship of hypoxia-inducible factor 1alpha and p21WAF1/CIP1 expression to cell apoptosis and clinical outcome in patients with gastric cancer. *World J Surg Oncol* 4, 94.

Monti, E., and Gariboldi, M.B. (2011). HIF-1 as a target for cancer chemotherapy, chemosensitization and chemoprevention. *Curr Mol Pharmacol* 4, 62-77.

Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790.

Movsas, B., Chapman, J.D., Hanlon, A.L., Horwitz, E.M., Pinover, W.H., Greenberg, R.E., Stobbe, C., and Hanks, G.E. (2001). Hypoxia in human prostate carcinoma: an Eppendorf PO2 study. *Am J Clin Oncol* 24, 458-461.

Mukhopadhyay, S., Xu, F., and Sehgal, P.B. (2007). Aberrant cytoplasmic sequestration of eNOS in endothelial cells after monocrotaline, hypoxia, and senescence: live-cell caveolar and cytoplasmic NO imaging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1373-1389.

Nicolson, G.L., Brunson, K.W., and Fidler, I.J. (1978). Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Res* 38, 4105-4111.

Nuñez, S. (2013). Caveolina-1 sensibiliza a las células Min6 a la muerte inducida por ácidos grasos libres (Santiago, Universidad de Chile), pp. 152.

Ohtsu, N., Takaoka, K., Segawa, E., Hashitani, S., Noguchi, K., Kishimoto, H., and Urade, M. (2010). Antitumor effects of inhibitors of nitric oxide synthase or cyclooxygenase-2 on human KB carcinoma cells overexpressing COX-2. *Oncol Rep* 24, 31-36.

Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273, 5419-5422.

Park, Y.K., Ahn, D.R., Oh, M., Lee, T., Yang, E.G., Son, M., and Park, H. (2008). Nitric oxide donor, (+/-)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine, stabilizes transactive hypoxia-inducible factor-1alpha by inhibiting von Hippel-Lindau recruitment and asparagine hydroxylation. *Mol Pharmacol* 74, 236-245.

Parks, S.K., Mazure, N.M., Counillon, L., and Pouyssegur, J. (2013). Hypoxia promotes tumor cell survival in acidic conditions by preserving ATP levels. *J Cell Physiol*.

Paul, S.A., Simons, J.W., and Mabeesh, N.J. (2004). HIF at the crossroads between ischemia and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 200, 20-30.

Paule, B., Bastien, L., Deslandes, E., Cussenot, O., Podgorniak, M.P., Allory, Y., Naimi, B., Porcher, R., de La Taille, A., Menashi, S., *et al.* (2010). Soluble isoforms of vascular endothelial growth factor are predictors of response to sunitinib in metastatic renal cell carcinomas. *PLoS One* 5, e10715.

Pavrides, S., Tsirigos, A., Vera, I., Flomenberg, N., Frank, P.G., Casimiro, M.C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., Pestell, R.G., *et al.* (2010). Loss of stromal caveolin-1 leads to oxidative stress, mimics hypoxia and drives inflammation in the tumor microenvironment,

conferring the "reverse Warburg effect": A transcriptional informatics analysis with validation. *Cell Cycle* 9.

Pavrides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Frank, P.G., Casimiro, M.C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., *et al.* (2009). The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 8, 3984-4001.

Pfeiffer, S., Gorren, A.C., Schmidt, K., Werner, E.R., Hansert, B., Bohle, D.S., and Mayer, B. (1997). Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J Biol Chem* 272, 3465-3470.

Pongjit, K., and Chanvorachote, P. (2011). Caveolin-1 sensitizes cisplatin-induced lung cancer cell apoptosis via superoxide anion-dependent mechanism. *Mol Cell Biochem* 358, 365-373.

Pries, A.R., Hopfner, M., le Noble, F., Dewhirst, M.W., and Secomb, T.W. (2010). The shunt problem: control of functional shunting in normal and tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* 10, 587-593.

Qian, D.Z., Kachhap, S.K., Collis, S.J., Verheul, H.M., Carducci, M.A., Atadja, P., and Pili, R. (2006). Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Cancer Res* 66, 8814-8821.

Quest, A.F., Gutierrez-Pajares, J.L., and Torres, V.A. (2008). Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol Med* 12, 1130-1150.

Quest, A.F., Leyton, L., and Parraga, M. (2004). Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem Cell Biol* 82, 129-144.

Quest, A.F., Lobos-Gonzalez, L., Nunez, S., Sanhueza, C., Fernandez, J.G., Aguirre, A., Rodriguez, D., Leyton, L., and Torres, V. (2013). The caveolin-1 connection to cell death and survival. *Curr Mol Med* 13, 266-281.

Quintero, M., Brennan, P.A., Thomas, G.J., and Moncada, S. (2006). Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha in cancer: role of free radical formation. *Cancer Res* 66, 770-774.

Rankin, E.B., and Giaccia, A.J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 15, 678-685.

Ratcliffe, P.J. (2007). HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest* 117, 862-865.

Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z.M., Sutter, C.H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L.E., Madan, A., Semenza, G.L., and Bedi, A. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 14, 34-44.

Robinson, C.J., and Stringer, S.E. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114, 853-865.

Rodrigues, N.R., Rowan, A., Smith, M.E., Kerr, I.B., Bodmer, W.F., Gannon, J.V., and Lane, D.P. (1990). p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7555-7559.

Rodriguez, D. (2009). Caveolina-1 inhibe la proliferación y promueve la muerte celular mediante la regulación negativa de la enzima ciclooxigenasa 2 y survivina (Santiago, Universidad de Chile).

Rodriguez, D.A., Tapia, J.C., Fernandez, J.G., Torres, V.A., Munoz, N., Galleguillos, D., Leyton, L., and Quest, A.F. (2009). Caveolin-1-mediated suppression of cyclooxygenase-2 via a beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcriptional mechanism reduced prostaglandin E2 production and survivin expression. *Mol Biol Cell* 20, 2297-2310.

Rouschop, K.M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., *et al.* (2010). The unfolded protein

response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* 120, 127-141.

Roy, S., Reddy, B.S., Sudhakar, G., Kumar, J.M., and Banerjee, R. (2011). 17beta-estradiol-linked nitro-L-arginine as simultaneous inducer of apoptosis in melanoma and tumor-angiogenic vascular endothelial cells. *Mol Pharm* 8, 350-359.

Rzymiski, T., Milani, M., Pike, L., Buffa, F., Mellor, H.R., Winchester, L., Pires, I., Hammond, E., Ragoussis, I., and Harris, A.L. (2010). Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene* 29, 4424-4435.

Rzymiski, T., Petry, A., Kracun, D., Riess, F., Pike, L., Harris, A.L., and Gorlach, A. (2012). The unfolded protein response controls induction and activation of ADAM17/TACE by severe hypoxia and ER stress. *Oncogene* 31, 3621-3634.

Salem, A.F., Bonuccelli, G., Bevilacqua, G., Arafat, H., Pestell, R.G., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2011). Caveolin-1 promotes pancreatic cancer cell differentiation and restores membranous E-cadherin via suppression of the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 10, 3692-3700.

Sanna, E., Miotti, S., Mazzi, M., De Santis, G., Canevari, S., and Tomassetti, A. (2007). Binding of nuclear caveolin-1 to promoter elements of growth-associated genes in ovarian carcinoma cells. *Exp Cell Res* 313, 1307-1317.

Sato, Y., Sagami, I., and Shimizu, T. (2004). Identification of caveolin-1-interacting sites in neuronal nitric-oxide synthase. Molecular mechanism for inhibition of NO formation. *J Biol Chem* 279, 8827-8836.

Schindl, M., Schoppmann, S.F., Samonigg, H., Hausmaninger, H., Kwasny, W., Gnant, M., Jakesz, R., Kubista, E., Birner, P., and Oberhuber, G. (2002). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 8, 1831-1837.

Schroedel, C., McClintock, D.S., Budinger, G.R., and Chandel, N.S. (2002). Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L922-931.

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

Semenza, G.L. (2011). Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 365, 537-547.

Semenza, G.L. (2012). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 33, 207-214.

Shah, M., Patel, K., Fried, V.A., and Sehgal, P.B. (2002). Interactions of STAT3 with caveolin-1 and heat shock protein 90 in plasma membrane raft and cytosolic complexes. Preservation of cytokine signaling during fever. *J Biol Chem* 277, 45662-45669.

Shajahan, A.N., Dobbin, Z.C., Hickman, F.E., Dakshanamurthy, S., and Clarke, R. (2012). Tyrosine-phosphorylated caveolin-1 (Tyr-14) increases sensitivity to paclitaxel by inhibiting BCL2 and BCLxL proteins via c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J Biol Chem* 287, 17682-17692.

Shen, J., Lee, W., Li, Y., Lau, C.F., Ng, K.M., Fung, M.L., and Liu, K.J. (2008). Interaction of caveolin-1, nitric oxide, and nitric oxide synthases in hypoxic human SK-N-MC neuroblastoma cells. *J Neurochem* 107, 478-487.

Shibaji, T., Nagao, M., Ikeda, N., Kanehiro, H., Hisanaga, M., Ko, S., Fukumoto, A., and Nakajima, Y. (2003). Prognostic significance of HIF-1 alpha overexpression in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 23, 4721-4727.

Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Watson, P., Greenberg, A.H., and Harris, A.L. (2001). HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 61, 6669-6673.

Sutter, C.H., Laughner, E., and Semenza, G.L. (2000). Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4748-4753.

Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Harris, A.L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157, 411-421.

Tanaka, A., Jin, Y., Lee, S.J., Zhang, M., Kim, H.P., Stolz, D.B., Ryter, S.W., and Choi, A.M. (2011). Hyperoxia-induced LC3B interacts with the Fas apoptotic pathway in epithelial cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46, 507-514.

Tanaka, T., Wiesener, M., Bernhardt, W., Eckardt, K.U., and Warnecke, C. (2009). The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3 $\alpha$  gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *Biochem J* 424, 143-151.

Tao, K., Fang, M., Alroy, J., and Sahagian, G.G. (2008). Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer* 8, 228.

Torres, V.A., Tapia, J.C., Rodriguez, D.A., Lladser, A., Arredondo, C., Leyton, L., and Quest, A.F. (2007). E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 27, 7703-7717.

Torres, V.A., Tapia, J.C., Rodriguez, D.A., Parraga, M., Lisboa, P., Montoya, M., Leyton, L., and Quest, A.F. (2006). Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. *J Cell Sci* 119, 1812-1823.

Tu, Y.T., Tao, J., Liu, Y.Q., Li, Y., Huang, C.Z., Zhang, X.B., and Lin, Y. (2006). Expression of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in human malignant melanoma and their relation to angiogenesis. *Clin Exp Dermatol* 31, 413-418.

Urra, H., Torres, V.A., Ortiz, R.J., Lobos, L., Diaz, M.I., Diaz, N., Hartel, S., Leyton, L., and Quest, A.F. (2012). Caveolin-1-enhanced motility and focal adhesion turnover require tyrosine-14 but not accumulation to the rear in metastatic cancer cells. *PLoS One* 7, e33085.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.

Vaupel, P. (2008). Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist* 13 Suppl 3, 21-26.

Vaupel, P., and Harrison, L. (2004). Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 9 Suppl 5, 4-9.

Vaupel, P., Hockel, M., and Mayer, A. (2007). Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. *Antioxid Redox Signal* 9, 1221-1235.

Vaupel, P., Schlenger, K., Knoop, C., and Hockel, M. (1991). Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O<sub>2</sub> tension measurements. *Cancer Res* 51, 3316-3322.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-5514.

Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1993). Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82, 3610-3615.

Wiesener, M.S., Jurgensen, J.S., Rosenberger, C., Scholze, C.K., Horstrup, J.H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U.A., Pugh, C.W., *et al.* (2003).

Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 17, 271-273.

Wilson, W.R., and Hay, M.P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 11, 393-410.

Williams, T.M., and Lisanti, M.P. (2005). Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C494-506.

Witkiewicz, A.K., Kline, J., Queenan, M., Brody, J.R., Tsirigos, A., Bilal, E., Pavlides, S., Ertel, A., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2011). Molecular profiling of a lethal tumor microenvironment, as defined by stromal caveolin-1 status in breast cancers. *Cell Cycle* 10, 1794-1809.

Wouters, B.G., and Koritzinsky, M. (2008). Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 851-864.

Wu, G., and Morris, S.M., Jr. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 ( Pt 1), 1-17.

Wu, P., Wang, X., Li, F., Qi, B., Zhu, H., Liu, S., Cui, Y., and Chen, J. (2008). Growth suppression of MCF-7 cancer cell-derived xenografts in nude mice by caveolin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 376, 215-220.

Xi, Y., Wei, Y., Sennino, B., Ulsamer, A., Kwan, I., Brumwell, A.N., Tan, K., Aghi, M.K., McDonald, D.M., Jablons, D.M., *et al.* (2012). Identification of pY654-beta-catenin as a critical co-factor in hypoxia-inducible factor-1alpha signaling and tumor responses to hypoxia. *Oncogene*.

Xue, X., and Shah, Y.M. (2013). Hypoxia-inducible factor-2alpha is essential in activating the COX2/mPGES-1/PGE2 signaling axis in colon cancer. *Carcinogenesis* 34, 163-169.

Yagihashi, N., Kasajima, H., Sugai, S., Matsumoto, K., Ebina, Y., Morita, T., Murakami, T., and Yagihashi, S. (2000). Increased in situ expression of nitric oxide synthase in human colorectal cancer. *Virchows Arch* 436, 109-114.

Yasuda, H. (2008). Solid tumor physiology and hypoxia-induced chemo/radio-resistance: novel strategy for cancer therapy: nitric oxide donor as a therapeutic enhancer. *Nitric Oxide* 19, 205-216.

Yasui, H., Matsumoto, S., Devasahayam, N., Munasinghe, J.P., Choudhuri, R., Saito, K., Subramanian, S., Mitchell, J.B., and Krishna, M.C. (2010). Low-field magnetic resonance imaging to visualize chronic and cycling hypoxia in tumor-bearing mice. *Cancer Res* 70, 6427-6436.

Yee Koh, M., Spivak-Kroizman, T.R., and Powis, G. (2008). HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci* 33, 526-534.

Yoshimura, H., Dhar, D.K., Kohno, H., Kubota, H., Fujii, T., Ueda, S., Kinugasa, S., Tachibana, M., and Nagasue, N. (2004). Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin Cancer Res* 10, 8554-8560.

Young, C.D., Lewis, A.S., Rudolph, M.C., Ruehle, M.D., Jackman, M.R., Yun, U.J., Ilkun, O., Pereira, R., Abel, E.D., and Anderson, S.M. (2011). Modulation of glucose transporter 1 (GLUT1) expression levels alters mouse mammary tumor cell growth in vitro and in vivo. *PLoS One* 6, e23205.

Zhang, H., Qian, D.Z., Tan, Y.S., Lee, K., Gao, P., Ren, Y.R., Rey, S., Hammers, H., Chang, D., Pili, R., *et al.* (2008a). Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19579-19586.

Zhang, H., Su, L., Muller, S., Tighiouart, M., Xu, Z., Zhang, X., Shin, H.J., Hunt, J., Sun, S.Y., Shin, D.M., *et al.* (2008b). Restoration of caveolin-1 expression suppresses growth and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 99, 1684-1694.

Zhang, M., Lee, S.J., An, C., Xu, J.F., Joshi, B., Nabi, I.R., Choi, A.M., and Jin, Y. (2011). Caveolin-1 mediates Fas-BID signaling in hyperoxia-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med*.

Zhou, J., Zhang, S., Xue, J., Avery, J., Wu, J., Lind, S.E., and Ding, W.Q. (2012). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) signaling in cancer cells. *J Biol Chem* 287, 35161-35169.

Zygalaki, E., Tsaroucha, E.G., Kaklamanis, L., and Lianidou, E.S. (2007). Quantitative real-time reverse transcription PCR study of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants and VEGF receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) in non small cell lung cancer. *Clin Chem* 53, 1433-1439.