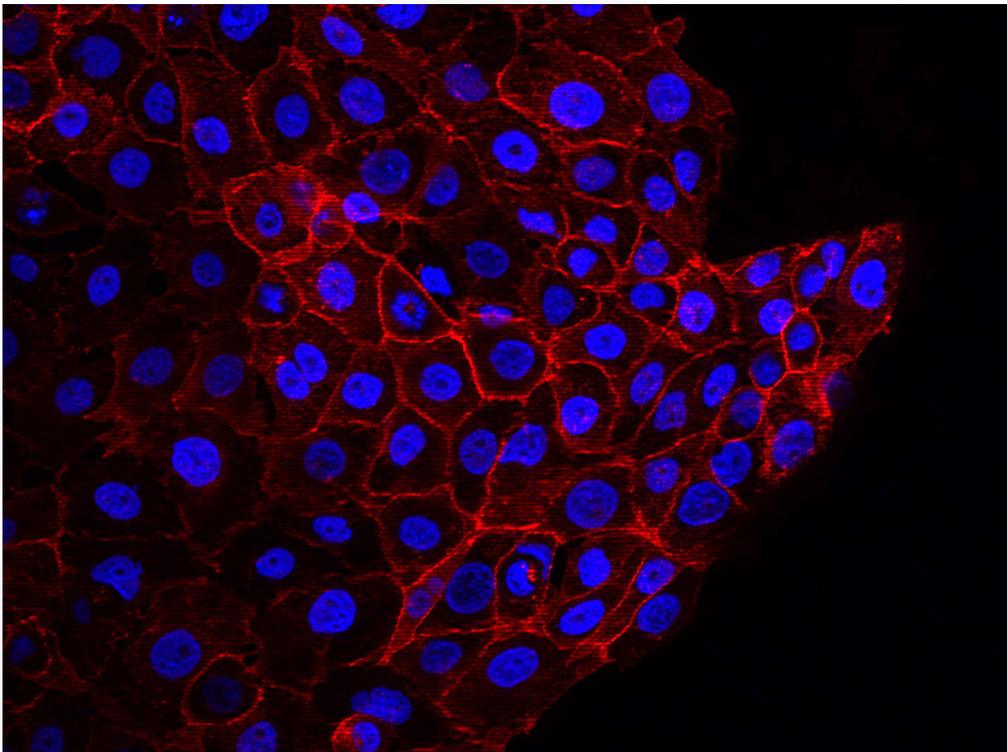


# **TRABAJO FIN DE GRADO**

## **BIOLOGÍA**

### **HIPOXIA PROLONGADA EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES Y ESTUDIO DE HIF $\alpha$ y SDHB**



**Aitana Zapico Alonso**

**Departamento de Cáncer de Cabeza y Cuello (ORL) (ISPA)/  
Departamento de Morfología y Biología Celular**

**Julio de 2022**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



## **RESUMEN**

---

En la enfermedad del cáncer se produce un crecimiento y proliferación descontrolados de masas celulares que agotan los nutrientes y niveles de O<sub>2</sub> necesarios para el metabolismo aerobio de las células. Muchos tumores han desarrollado adaptaciones y respuestas a este microambiente hostil de baja disponibilidad de O<sub>2</sub> mediante la expresión de HIF (Hypoxia Inducible Factor), un heterodímero formado por las subunidades HIF $\alpha$  y HIF $\beta$  encargado de regular a los genes implicados los mecanismos de respuesta a la hipoxia en la tumorigénesis como la angiogénesis y la proliferación, entre otros. Además, el complejo mitocondrial de la SDH y, especialmente, la subunidad SDHB, tiene un papel muy importante en su regulación. Para estudiar la expresión de HIF y su relación con SDHB se analizaron distintas líneas celulares tumorales y se sometieron a normoxia y a distintos tiempos de hipoxia. Los resultados de este trabajo muestran una regulación positiva de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en hipoxia, aunque esta respuesta es variable entre cada tipo de línea celular tumoral. Por su parte, los niveles de SDHB no se modifican en hipoxia en todas las líneas celulares estudiadas salvo en las derivadas de carcinoma adrenal.

## **ABSTRACT**

---

In cancer disease, there is an uncontrolled growth and proliferation of cell masses that deplete the nutrients and O<sub>2</sub> levels necessary for the aerobic metabolism of cells. Many tumors have developed adaptations and responses to this hostile microenvironment of low O<sub>2</sub> availability through the expression of HIF (Hypoxia Inducible Factor), a heterodimer formed by the HIF $\alpha$  and HIF $\beta$  subunits responsible for regulating genes involved in response mechanisms to hypoxia in tumorigenesis such as angiogenesis and proliferation, among others. In addition, the SDH mitochondrial complex, especially the SDHB subunit, plays a very important role in HIF regulation. To study the expression of HIF and its relationship with SDHB, different tumor cell lines were analyzed and subjected to normoxia and different times of hypoxia. The results of this work show a positive regulation of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  in hypoxia, although this response is variable in different tumor cell lines. SDHB protein levels does not exhibit apparent regulation by hypoxia in all but adrenal carcinoma cell lines in which decreases.



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



D./Dña. Aitana Zapico Alonso, con DNI nº 58430560A estudiante del Grado Biología de la Facultad de Biología de la Universidad de Oviedo, **DECLARO:**

Que el Trabajo de Fin de Grado que presento para su exposición y defensa titulado

**Hipoxia prolongada en líneas celulares tumorales y estudio de HIF $\alpha$  y SDHB**

y cuya/s tutora/as son

**Dña. María Dolores Chiara Romero**

**Dña. Eva María del Valle Suárez**

es original y que todas las fuentes utilizadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo.

**Firma:**

Oviedo, a ...3...de .....Junio...de 2022.

---

*Declaración de originalidad del Trabajo Fin de Grado*

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

---

- ADN: Ácido Desoxirribonucleico.
- ATP: Adenosín Trifosfato.
- C.a: Corteza Adrenal.
- EPAS-1: gen que codifica para la proteína HIF2 $\alpha$ .
- FIH-1: Factor Inhibiting HIF1; en español, factor inhibidor de HIF1.
- HIF: Hypoxia Inducible Factor; en español FIH, Factor Inducible por Hipoxia.
- HRE: Hypoxia Response Element; en español, Elemento de Respuesta a Hipoxia.
- Hx: Hipoxia
- Nx: Normoxia
- PHD: Prolil-Hidroxilasas.
- PHEO: Feocromocitoma.
- PPGLs: Paragangliomas.
- pVHL: proteína supresora tumoral de von Hippel Lindau.
- ROS: Reactive Oxygen Species; en español, Especies Reactivas de Oxígeno.
- SDH: Succinato Deshidrogenasa.
- VEGF: Vascular Endotelium Growth Factor; en español, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1	HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR (HIF).....	2
1.2	SUCCINATO DESHIDROGENASA B (SDHB).....	5
<b>2</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>6</b>
2.1	CULTIVOS CELULARES.....	6
2.2	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	7
2.3	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.....	7
2.4	WESTERN BLOT Y TRANSFERENCIA.....	9
2.5	TEÑIDO Y MARCAJE.....	10
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>11</b>
3.1	HIF1 $\alpha$ .....	11
3.2	HIF2 $\alpha$ .....	14
3.3	SDHB.....	16
	.....	17
<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
4.1	HIF1 $\alpha$ .....	19
4.2	HIF2 $\alpha$ .....	20
4.3	SDHB.....	21
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>23</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

---

El cáncer es una enfermedad que se produce por mutaciones en el material genético. Estas mutaciones pueden deberse a la exposición a factores ambientales, agentes patógenos y al envejecimiento. La consecuencia de esto, sumado a variaciones epigenéticas que incluyen la metilación de histonas y de las islas CpG del ADN, es la alteración de procesos celulares, como el crecimiento, la migración y la proliferación celular, imprescindibles para el desarrollo del tumor y las metástasis (Kumar *et al*, 2018).

Por tanto, esta patología implica un crecimiento alterado de masas celulares. De esta manera, en muchas ocasiones, esta proliferación celular supera a la angiogénesis (desarrollo de nuevos vasos sanguíneos) provocando un flujo sanguíneo disminuido y anómalo. El resultado de esto es un agotamiento de los niveles de O<sub>2</sub> molecular y de nutrientes en el tejido tumoral (Keith *et al*, 2011; Lee *et al*, 2020).

La disminución en la concentración de O<sub>2</sub>, denominado hipoxia, supone una situación de estrés para las células, debido a que el O<sub>2</sub> es esencial para el mantenimiento del metabolismo de organismos aerobios. Las células cancerosas pueden progresar en este ambiente hostil gracias a las numerosas adaptaciones que son inducidas por la hipoxia (Lee *et al*, 2020).

Durante la proliferación tumoral se resuelve parcialmente el problema de la vascularización ineficiente gracias a la expresión de factores como VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) que induce la angiogénesis. Sin embargo, los vasos generados y el endotelio que los forma resultan disfuncionales y desorganizados, dando lugar a un flujo sanguíneo no laminar e, incluso, a la aparición de edemas.

Existen numerosas publicaciones que subrayan el hecho de que la hipoxia tumoral se relaciona con un peor pronóstico, así como una mayor agresividad y probabilidad de metástasis. Esto es así debido a una selección clonal de aquellas células más adaptadas a la hipoxia.

En los últimos años se ha estudiado detenidamente las respuestas a hipoxia mediadas por HIF, un factor de transcripción inducido por hipoxia, que se expresa en muchos tumores en zonas con baja concentración de O<sub>2</sub>.

## 1.1 HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR (HIF)

En el año 2019, los científicos William G. Kaelin, Peter Ratcliffe y Gregg L. Semenza (*Figura 1*) recibieron el Premio Nobel de Medicina por sus hallazgos sobre la adaptación de las células a la baja disponibilidad de O<sub>2</sub>. Este descubrimiento abrió las puertas hacia la búsqueda de un nuevo enfoque para el tratamiento de enfermedades como el cáncer.



*Figura 1.- Galardonados del Premio Nobel de Medicina en 2019 por el descubrimiento de las respuestas moleculares de las células a la carencia de O<sub>2</sub>. De izquierda a derecha: WL. Kaelin, P. Ratcliffe y G. Semenza.*

Imagen obtenida de [www.nationalgeographic.com](http://www.nationalgeographic.com)

En mamíferos, las respuestas celulares a hipoxia están conservadas evolutivamente. Una de las más estudiadas es la mediada por el *Hypoxia Inducible Factor* (HIF). HIF es capaz de controlar y regular la expresión de numerosos genes, muchos de ellos relacionados con el cáncer (Majmundar *et al*, 2010; Lee *et al*, 2020). Se trata de un heterodímero compuesto por una subunidad HIF $\alpha$  (expresada solo en hipoxia) y la subunidad HIF $\beta$  (expresada de manera constitutiva). HIF $\alpha$  se regula por la acción de la proteína supresora de tumores de von Hippel Lindau (pVHL) y las prolin-hidroxilasas (PHD), siendo estos últimos miembros de la superfamilia de las  $\alpha$ -cetoglutarato dioxigenasas. En normoxia (niveles fisiológicos de O<sub>2</sub>), la subunidad HIF $\alpha$  se encuentra marcada con ubiquitinas por la ubiquitin ligasa E3, mecanismo regulado por el complejo VHL, por lo que es degradada en el proteasoma. Para que esto ocurra, la prolin-hidroxilasa, PHD2, cataliza la reacción de hidroxilación de dos prolinas conservadas presentes en HIF $\alpha$ . Esta modificación de HIF $\alpha$  es necesaria para que se produzca la interacción HIF $\alpha$ -VHL y la subsiguiente ubiquitinización de HIF $\alpha$ . Además, el factor inhibidor de HIF1 (FIH-1) es capaz de hidroxilar a HIF $\alpha$  en presencia de O<sub>2</sub>, inhibiéndolo. En condiciones de hipoxia, la actividad de PHD2 se encuentra inhibida por lo que HIF $\alpha$  no se hidroxila, no interacciona con VHL, no se ubiquitiniza y no se degrada en el proteasoma. HIF $\alpha$  forma, entonces, un dímero con la subunidad HIF $\beta$  dando lugar a un complejo que es activo transcripcionalmente tras su interacción con secuencias HRE (*Hypoxia Response Elements*) presentes en las regiones promotoras de los genes diana. En esta situación de baja disponibilidad de O<sub>2</sub>, el complejo mitocondrial III es capaz de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) que inactivan a PHD y estabilizan a HIF $\alpha$  (*Figura 2*). Este mecanismo no está bien definido, pero una posible explicación podría ser la oxidación de los residuos de cisteína de PHD2 por parte de ROS, su consiguiente homodimerización e inactivación, y la estabilización de HIF $\alpha$ .

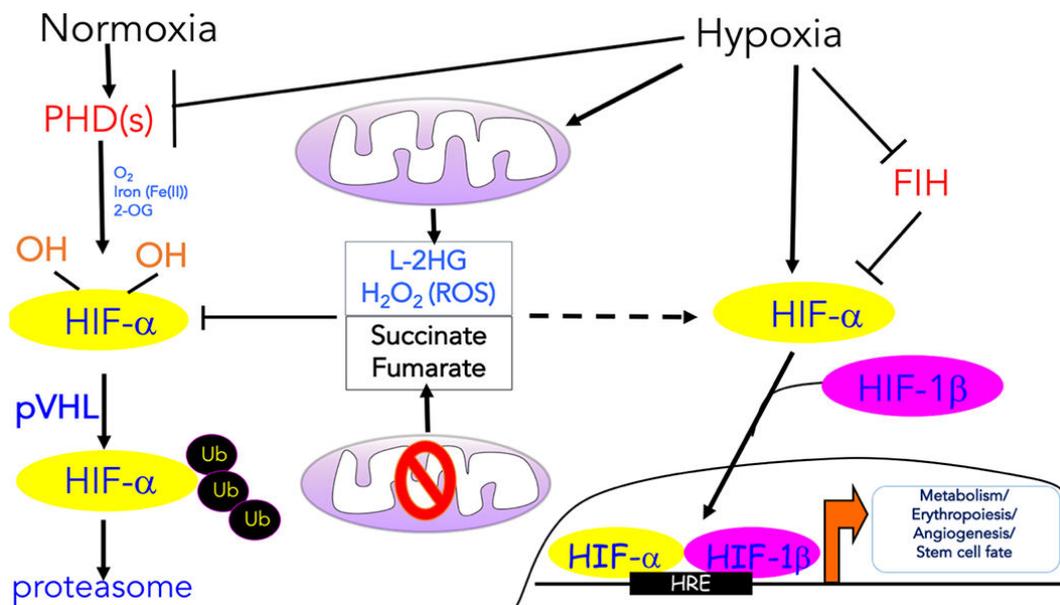


Figura 2.- Regulación de la expresión de HIF en condiciones de normoxia e hipoxia. Imagen obtenida de Lee et al, 2020.

Existen tres isoformas de HIF $\alpha$ : HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  (también denominado EPAS-1) y HIF3 $\alpha$ . HIF1 $\alpha$  fue descrito por Semenza *et al* en 1995 y se observó que su expresión se extendía ampliamente a la mayoría de las células eucariotas, siendo crítico en respuestas transcripcionales dependientes de O<sub>2</sub> (Keith *et al*, 2011). En el caso de las otras dos isoformas, se distribuyen de manera más restringida en tejidos concretos como el endotelio vascular, células intersticiales renales, en el parénquima hepático, etc. (Majmundar *et al*, 2010) y han sido menos estudiadas.

Varios estudios han demostrado que los tumores sólidos suelen mostrar elevados niveles de HIF $\alpha$ . Como se ha mencionado previamente, las tres isoformas de la proteína HIF $\alpha$  contribuyen de forma diferente en las respuestas a la hipoxia. De hecho, HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  funcionan de manera muy dispar en algunos tipos de tumores: la expresión de la primera de ellas puede relacionarse con una disminución en la mortalidad de pacientes en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, mientras que HIF2 $\alpha$  resulta un factor de malignidad en el mismo tipo de cáncer (Majmundar *et al*, 2010).

La proteína HIF $\alpha$  se pueden acumular también en ausencia de hipoxia. Algunas alteraciones genéticas, como las mutaciones inactivantes del gen *VHL* en el carcinoma de células renales, estabilizan HIF $\alpha$  en ausencia de hipoxia. HIF1 $\alpha$  induce sobre-expresión de algunos microARN como miR-210, en ausencia de actividad de VHL (Merlo *et al*, 2013). La proteína ISCU (*Iron Sulfur Cluster Assembly Enzyme*) es una diana conocida de miR-210 que facilita el correcto ensamblaje

de los centros de Fe-S en proteínas mitocondriales tales como la succinato deshidrogenasa B (SDHB). La activación de la ruta HIF-miR-210-ISCU-SDHB funciona como un mecanismo de retroalimentación positivo ya que la disfunción de SDHB favorece la acumulación de HIF1 $\alpha$ , como se describen en el siguiente apartado.

Existen otros mecanismos de regulación de HIF $\alpha$  en ausencia de hipoxia, entre los que destacan las alteraciones de enzimas del metabolismo energético, como la succinato deshidrogenasa o la fumarato hidratasa. La Succinato Deshidrogenasa (SDH) participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos catalizando la transformación de succinato a fumarato. Las mutaciones inactivantes en genes que catalizan las diferentes subunidades del complejo SDH bloquean esta reacción, provocando la acumulación de succinato que actúa como inhibidor de las PHD lo que favorece la acumulación de HIF $\alpha$ . (Figura 3). Las mutaciones en el gen que codifica la fumarato hidratasa también inducen acumulación de HIF1 en normoxia.

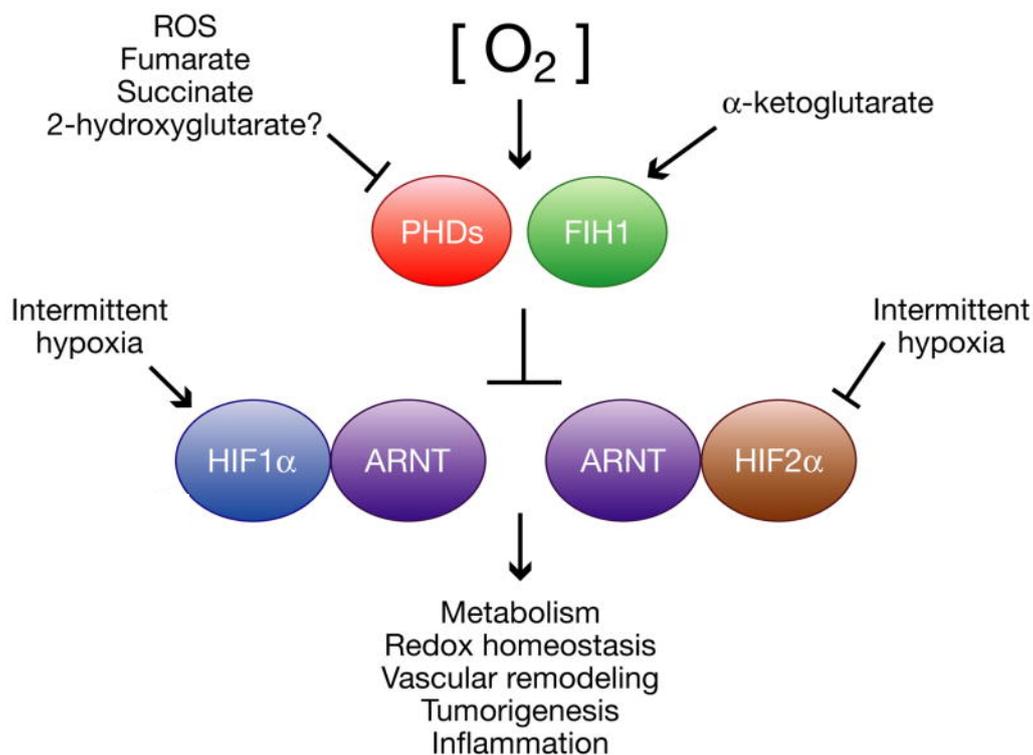


Figura 3.- Regulación de las subunidades HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  y procesos finales llevados a cabo por la inducción de HIF $\alpha$ . Imagen modificada de Majmundar et al, 2010.

## 1.2 SUCCINATO DESHIDROGENASA B (SDHB)

Además de la participación de SDH en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, este complejo, localizado en la membrana mitocondrial interna tiene una actividad crucial para la producción de energía en forma de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa (Dona *et al*, 2021).

Este hetero-oligómero está conformado por las subunidades SDHA-D y forma el complejo-II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial junto a los cuatro factores SDHDF1-4. En la conversión metabólica de succinato en fumarato, y el transporte de electrones resultan esenciales las subunidades SDHA y SDHB (Figura 4). Esto justifica la enorme importancia de dicha proteína en tumorigénesis.

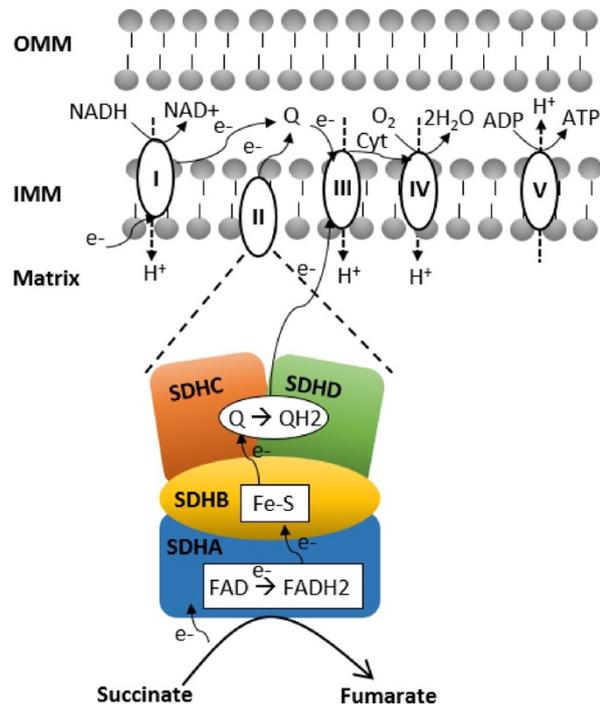


Figura 4.- Esquema de las subunidades de la SDHB y su papel en la formación de fumarato a partir de succinato. Imagen obtenida de Dona *et al*, 2021.

El fallo enzimático de la subunidad SDHB genera una acumulación del oncometabolito succinato, debido a la baja eficiencia en la oxidación de este a fumarato. Las mutaciones inactivantes en uno de los alelos del gen *SDHB* se asocia a un alto riesgo de desarrollar patologías, tales como paragangliomas (PPGL), tumores neuroendocrinos, y carcinoma renal, entre otros. Concretamente, la mutación de *SDHB* en los PPGL resulta de suma importancia clínica por su relación con la malignidad del tumor y la mayor probabilidad de originar metástasis.

El aumento de la concentración del succinato en la mitocondria conlleva también el paso de este al citosol. Es en este compartimento donde se encarga de inhibir a las enzimas PHD lo que, en última instancia, da lugar a la estabilización de HIF y la activación de genes implicados en procesos claves en tumorigénesis como la angiogénesis, proliferación, migración e invasión celular. (Lee *et al*, 2020 ; Dona *et al*, 2021).

El proyecto llevado a cabo tiene como objetivo analizar el efecto de la hipoxia sobre HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , y SDHB a lo largo del tiempo en distintas líneas celulares tumorales.

## 2 MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 2.1 Cultivos celulares

En el presente trabajo, se usaron líneas celulares tumorales derivadas de carcinoma de células escamosas humano (SCC-38), adenocarcinoma de mama humano (MCF7), adenocarcinoma adrenal humano (SW-13), paraganglioma yugular (PGL-184) y feocromocitoma (PCC-64). Además, la línea celular derivada de feocromocitoma de rata (PC-12) se usó como control experimental dada su conocida y bien caracterizada respuesta a hipoxia.

Las líneas celulares fueron cultivadas en condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) o hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 24 horas, 2 semanas o 1 mes. En el caso de las células PCC-64 solo se realizaron análisis usando tiempos de hipoxia de 12 horas, 24 horas y 48 horas, incluyendo las 6 horas de hipoxia para HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en esta misma línea.

Las células se incubaron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) al que se le añaden los siguientes compuestos:

- 100 unidades/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina: antibióticos que restringen la proliferación bacteriana.
- L-Glutamina 2mM.
- MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Gibco™). Mezcla de aminoácidos no esenciales.
- Suero FBS (Fetal Bovine Serum, Suero Fetal Bovino) al 10%.
- Inhibidor de micoplasma Plasmocin (InvivoGen) en una concentración profiláctica de 2,5 $\mu$ g/ml.

Las células se cultivaron en placas T25 manteniendo algunas de ellas en el incubador de normoxia y otras en el incubador de hipoxia (1% O<sub>2</sub>) para extraer proteína en el momento requerido. Además, fue necesario realizar un control continuado de los cultivos para revisar el estado de las células y cambiar el medio o realizar pases en el caso de que las placas estuviesen muy confluentes.

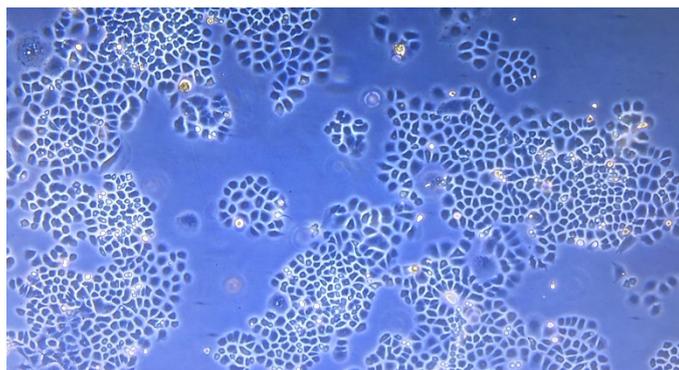


Figura 5.- Cultivo celular de la línea SW-13.

En la *Figura 5*, se muestra una imagen representativa del cultivo de células SW-13.

## 2.2 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas se lisaron las células con una mezcla de tampón RIPA (Thermo), inhibidor de proteasas (Roche) y dos cócteles de inhibidores de fosfatasa (Sigma). A las placas de cultivo correspondientes se les quitó el medio de cultivo, se lavaron con PBS (*Phosphate Buffer Saline*, Tampón fosfato salino) y se les añadió la mezcla previamente indicada. Las células se desprendieron de la placa raspando durante minutos con un *scraper*. El extracto de células lisadas se transfirió a un tubo eppendorf que se dejó en hielo durante 30 minutos. Finalmente, se centrifugó a 4°C y 13000 rpm durante 10 minutos. El extracto proteico (sobrenadante), se pasó a otro tubo eppendorf y se conservó a -20°C hasta su fraccionamiento en gel. Se cuidó que todo el proceso fuera realizado en hielo para prevenir la degradación de las proteínas.

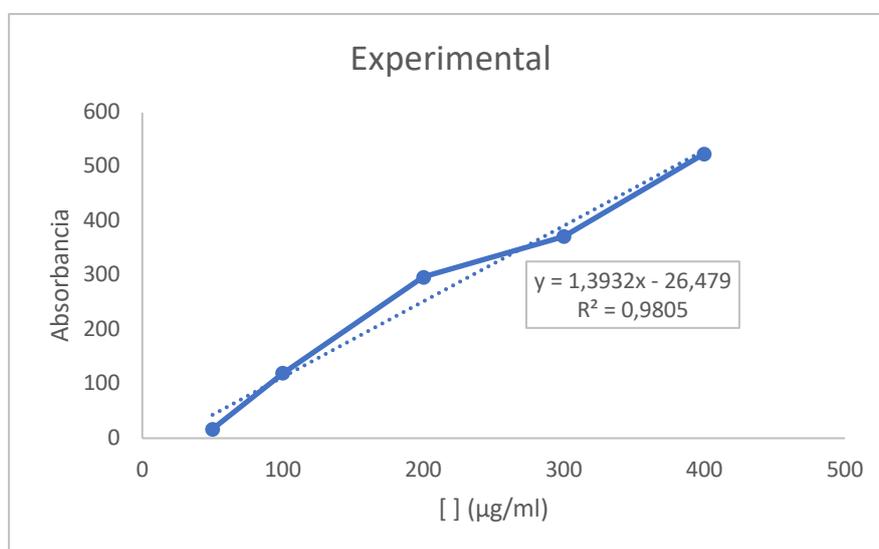
## 2.3 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método de Bradford. Este procedimiento requiere de la preparación de muestras de proteína de concentración conocida. Se prepararon patrones de BSA (*Bovine Serum Albumine*, Seroalbúmina bovina) a distintas concentraciones: 50, 100, 200, 300 y 400 µg/ml (además de un blanco formado solo por agua destilada). Estas muestras nos servirán para elaborar una curva patrón (*Gráfica 1*) para, una vez obtenidas las

absorbancias de las muestras problema, poder extrapolar y conocer la concentración de proteínas.

Tras realizar los stocks de la curva patrón, se preparan las muestras de proteína que se transfieren a una placa de 96 *wells* (pocillos) a los que se añade el reactivo de Bradford (se realiza mezclando 2ml de reactivo de Bradford y 3 ml de agua destilada). En último lugar, se mide la absorbancia a 595nm, se construye la recta patrón (*Tabla 1*) y se extrapolan los valores de absorbancia para, finalmente, obtener la concentración de proteína de las muestras problema.

Para realizar correctamente el procedimiento se trabaja siempre en hielo y, tanto las muestras de proteínas como las muestras de la curva patrón de BSA, se hacen por duplicado.



Gráfica 1.- Recta patrón con las medidas de absorbancia y concentración (µg/ml)

Muestras	Abs 1	Abs 2	Media	Media - Blanco	[ ] interpolando	Diluciones	µL para 40µg	Loading 4X
nx	902	859	880,5	555	417,3693655	10434,2341	10	3,33333333
hpx 24h	495	468	481,5	156	130,9783233	3274,45808	12,21576181	4,0719206
hpx 2 semanas	432	453	442,5	117	102,9852139	2574,63035	15,53621087	5,17873696
hpx 1 mes	825	402	613,5	288	225,724232	5643,1058	7,088295244	2,36276508
RIPA (Blanco)	325	326	325,5	0				

Tabla 1.- Resultados obtenidos de la absorbancia en las distintas muestras para conocer el volumen de muestra y de tampón de carga Loading4X necesarios para realizar el Western Blot. nx: normoxia; hpx:hipoxia.

## 2.4 Western Blot y transferencia

En primer lugar, han de prepararse los geles de acrilamida con una concentración de poliacrilamida que viene determinada por el peso molecular de la proteína de interés (para HIF 8% y para SDHB 12%).

Luego, se preparan las muestras de proteínas (40  $\mu$ g totales) a las que se añade *Loading buffer* 4x (8% SDS, 20%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,008% bromophenol blue, 0,25 M Tris-HCl, pH 6.8) donde el  $\beta$ -mercaptoetanol actúa como agente desnaturizante. Se calientan a 100°C durante 5 minutos y se centrifugan unos segundos.

Mientras, se prepara el *Running buffer* (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.2% SDS). Se montan los cristales en los soportes y añade *Running buffer*. Las muestras se añaden en los pocillos del gel, dejando la primera calle para el marcador de peso molecular (BioRad) y se conecta la cubeta a 80V durante unos minutos hasta que las muestras estén empaquetadas. A partir de este momento se sube el voltaje a 120V y se deja correr el gel una hora aproximadamente.

Una vez haya terminado la electroforesis, se lleva a cabo la transferencia mediante el uso del sistema Transfer-Blot y el material requerido de la casa comercial Bio-Rad®. Para ello, en dos cubetas se añade metanol al 100% y buffer de transferencia (25 mM Tris, 190 mM glicina, 20% metanol) respectivamente, para estabilizar la membrana. Esta se sumerge en metanol durante unos minutos hasta que quede translúcida y luego en el buffer durante 3 minutos. También, los *transfer stacks* se sumergen en el buffer de transferencia. Se ensambla, posteriormente, el sandwich (*Figura 6*) y se realiza la transferencia con el voltaje, el amperaje y el tiempo determinado según el tipo de gel y el peso molecular de la proteína de interés. En este caso se realizó la transferencia con un voltaje de 25 voltios, 1.3 amperios y 7 minutos de tiempo

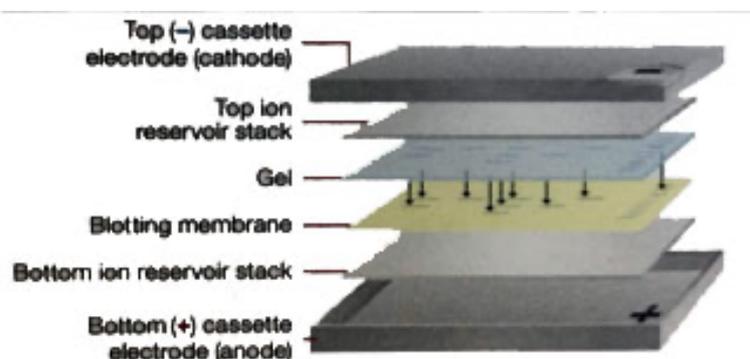


Figura 6.- Esquema del orden de membranas para la transferencia.

## 2.5 Teñido y marcaje

Una vez finalizada la transferencia, se bloquea la membrana con T-TBS (20 mM Tris pH7,4, 150 mM NaCl y 0.001% Tween-20) +BSA al 5% durante una hora en agitación y, tras ello, se añaden los anticuerpos primarios que se dejan en agitación toda la noche a 4°C:

- HIF1 $\alpha$  → rabbit (Becton Dickinson). Dilución 1:250 en BSA al 3%.
- HIF2 $\alpha$  → rabbit (Abcam). Dilución 1:200 en BSA al 3%.
- SDHB → rabbit (Sigma). Dilución 1:10000 en BSA al 3%.
- $\beta$ -actina → mouse (Sigma). Dilución 1:10000 en BSA al 3%.

Los tres primeros corresponden a las proteínas de interés de estudio. La  $\beta$ -actina se expresa de forma constitutiva, por lo que sirve de control de la medida de expresión de los factores analizados.

Al día siguiente, se retira el anticuerpo y se hacen 3 lavados de 10 minutos con T-TBS en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se incuban los anticuerpos secundarios según los primarios sean *rabbit* o *mouse*. Estos son fluorescentes, por lo que es necesario trabajar con ellos en oscuridad dejándolos en agitación durante una hora tapados con papel de aluminio. Finalmente, se vuelven a hacer 3 lavados de 10 minutos con T-TBS y se visualiza la membrana en el sistema Odyssey (LiCor).

Hay que tener en cuenta que la  $\beta$ -actina emitirá luz con una longitud de onda de 800nm, mientras que el resto, emitirán luz a 700nm.

- Anticuerpo 700nm → rabbit.
- Anticuerpo 800nm → mouse.

Los pesos moleculares de las proteínas son:

HIF1 $\alpha$ : 93 kDa.

HIF2 $\alpha$ : 96,5 kDa.

SDHB: 32 kDa.

$\beta$ -actina: 42 kDa.

Una vez realizados todos los experimentos se llevó a cabo la representación gráfica de la cantidad de proteína obtenida en el curso temporal de hipoxia en relación con la obtenida en normoxia. Para ello, se toma de referencia la medida de las proteínas de interés en normoxia y, una vez calculada la concentración de las proteínas en hipoxia, se hace la relación hipoxia/normoxia para analizar y comparar la expresión entre condiciones fisiológicas de O<sub>2</sub> frente a hipoxia (1% de O<sub>2</sub>).

### 3 RESULTADOS

---

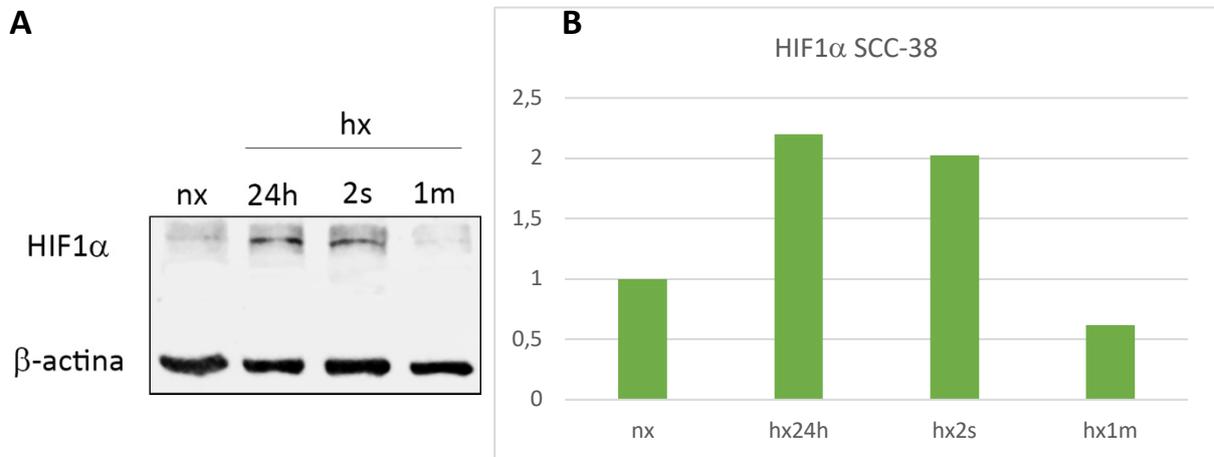
En este trabajo, se usaron 5 líneas celulares tumorales que se expusieron a hipoxia durante diferentes períodos de tiempo para analizar la expresión de HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y SDHB a lo largo del tiempo. En el caso de las PCC-64 se estudiaron en tiempos cortos de hipoxia debido a su lento crecimiento por lo que no se pudieron conseguir células suficientes para tiempos largos. Además, se utilizó la línea PC-12 en condiciones de 6 horas de hipoxia como control de HIF2 $\alpha$  Y SDHB debido a su conocida y previamente estudiada respuesta a la hipoxia. Gracias a esto podemos asegurarnos del buen estado y funcionamiento de los anticuerpos utilizados, además de la expresión/no expresión de HIF2 $\alpha$  y SDHB en las líneas utilizadas. En este caso, hubo un enfoque en el uso de PC-12 como control con las SW-13 Y MCF-7 debido a la dificultad para obtener datos significativos. Se obtuvieron los siguientes resultados:

#### 3.1 HIF1 $\alpha$

Los resultados del gel muestran las bandas de la proteína de interés HIF1 $\alpha$  obtenidas tras la realización del Western Blot usando la  $\beta$ -actina como control de expresión constitutiva (Figuras **7A**, **8A**, **9A** y **10A**). A partir de estas bandas se realiza la cuantificación de los niveles de expresión de las proteínas y se realiza la representación gráfica de los datos obtenidos donde se comparan los niveles de la proteína en los distintos tiempos del curso temporal de hipoxia frente a los cuantificados en normoxia. Tomando como control la relación normoxia/normoxia (=1), se calcula la expresión relativa (tiempo X de hipoxia/normoxia) para conocer cuánto aumenta o disminuye el valor de HIF1 $\alpha$  en las diferentes situaciones. Las gráficas revelan resultados distintos en los niveles de HIF1 $\alpha$  entre las distintas líneas celulares tumorales estudiadas.

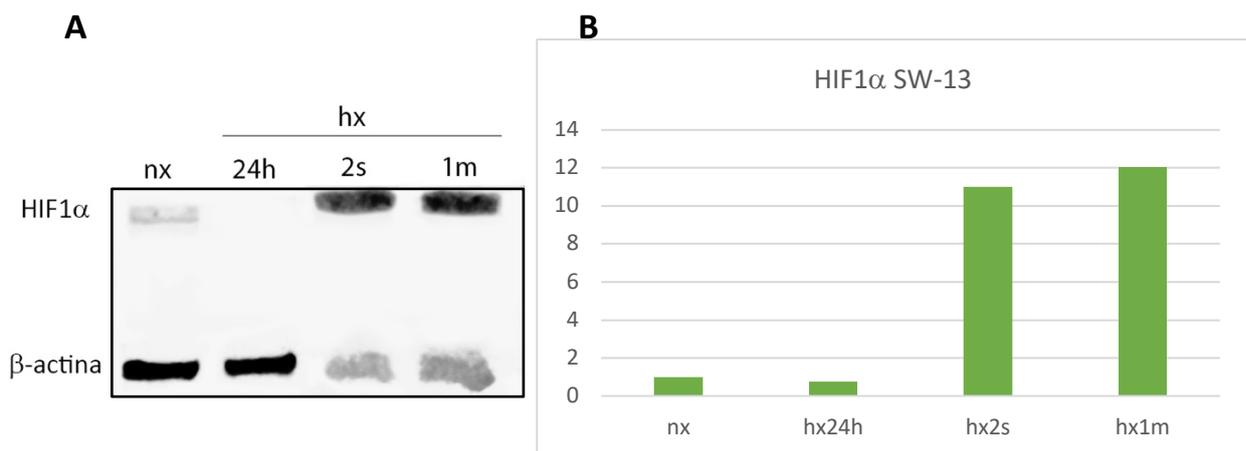
En SCC-38 (Figura **7B**) se observa cómo en las primeras 24 horas sometidas a hipoxia en las células hay una fuerte expresión de la proteína (más del doble que la normoxia) que casi se

mantiene intacta tras 2 semanas. Finalmente, HIF1 $\alpha$  presenta una caída muy brusca en su expresión en el curso temporal de 1 mes de hipoxia, incluso por debajo de los niveles de normoxia (control).



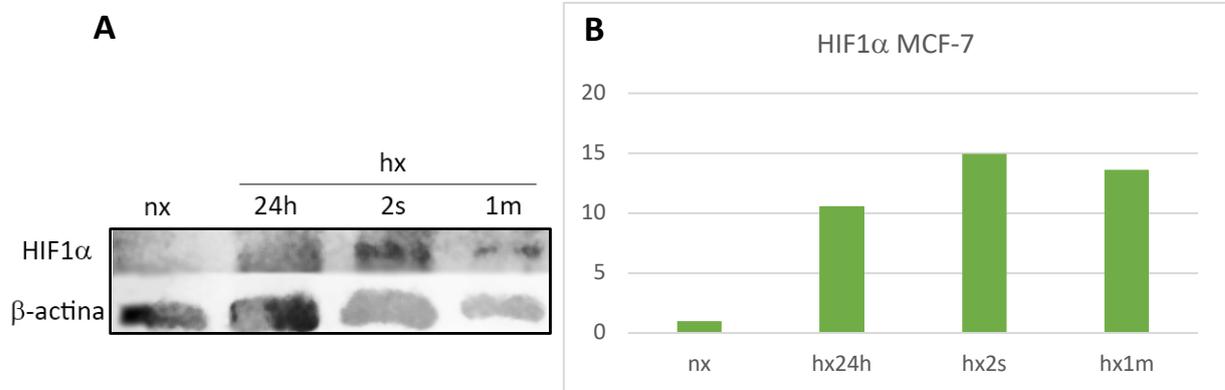
**Figura 7.-** Análisis de HIF1 $\alpha$  en SCC-38. A la izquierda (A) resultados del Western Blot para HIF1 $\alpha$  y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de HIF1 $\alpha$  en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21% O<sub>2</sub> (nx) o 1% de O<sub>2</sub> (hx) durante 24 horas (24h), 2 semanas (2s) o un mes (1m).

En SW-13 (Figura 8B) la gráfica muestra una mínima presencia de HIF1 $\alpha$  a las 24 horas de exposición a hipoxia, pero en los siguientes tiempos de 2 semanas y un mes, HIF1 $\alpha$  hay un cambio muy aparente, incrementándose los niveles de HIF1 $\alpha$  10 y 12 veces más respecto a la normoxia (el pico de expresión es después de 1 mes de exposición a hipoxia).



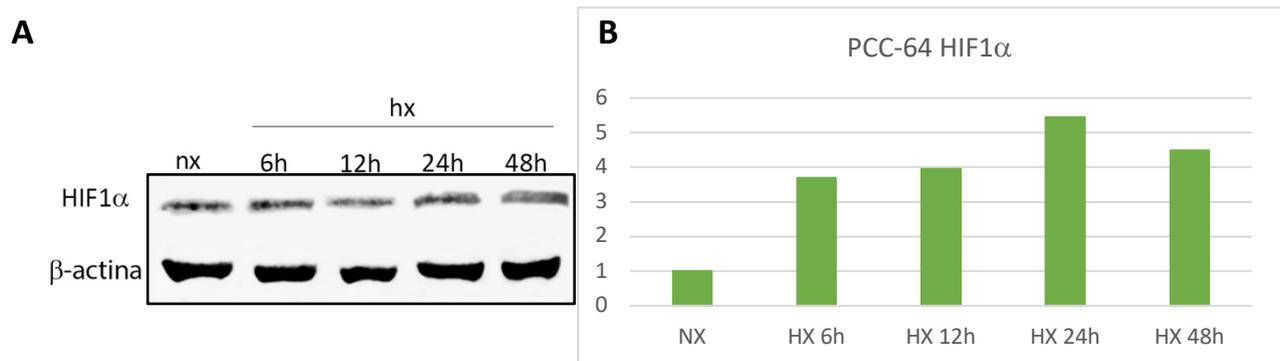
**Figura 8.-** Análisis de HIF1 $\alpha$  en SW-13. A la izquierda (A) resultados del Western Blot para HIF1 $\alpha$  y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de HIF1 $\alpha$  en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21% O<sub>2</sub> (nx) o 1% de O<sub>2</sub> (hx) durante 24 horas (24h), 2 semanas (2w) o un mes (1m).

Luego, los resultados de MCF-7 (Figura 9B) revelan una expresión mínima de HIF1 $\alpha$  en normoxia, mientras que en el curso temporal es muy evidente el pico de expresión a las 2 semanas de hipoxia (14 veces más que en la normoxia). Tras un mes de exposición a la hipoxia, los niveles siguen siendo altos, pero disminuyen levemente.



**Figura 9.-** Análisis de HIF1 $\alpha$  en MCF-7. A la izquierda (A) resultados del Western Blot para HIF1 $\alpha$  y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de HIF1 $\alpha$  en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21% O<sub>2</sub> (nx) o 1% de O<sub>2</sub> (hx) durante 24 horas (24h), 2 semanas (2w) o un mes (1m).

Finalmente, en las PCC-64 HIF1 $\alpha$  aumenta en condiciones de baja disponibilidad de O<sub>2</sub> frente a concentraciones fisiológicas de este. Se observa un pico de expresión a las 24 horas de exposición a la hipoxia que es 5 veces mayor que en normoxia (Figura 10B).



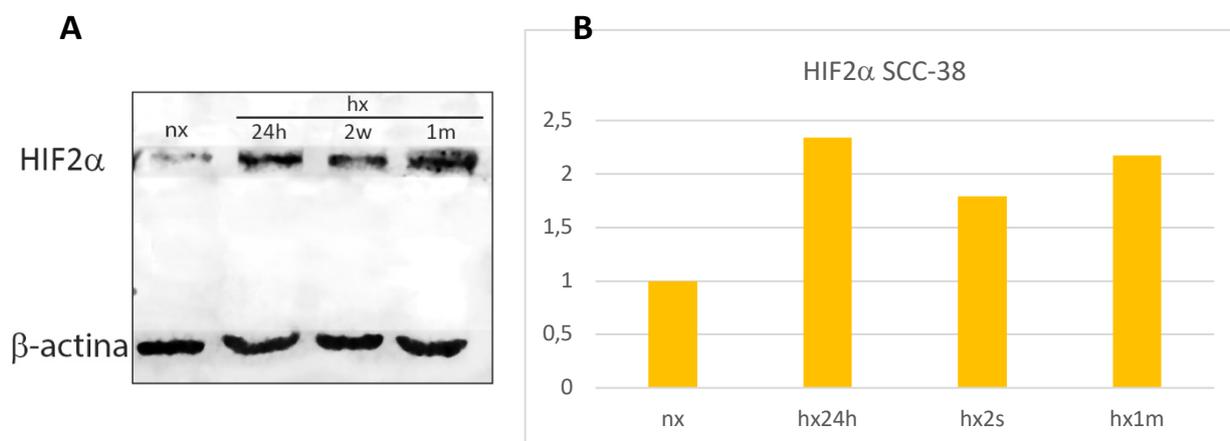
**Figura 10.-** Análisis de HIF1 $\alpha$  en PCC-64. A la izquierda (A) resultados del Western Blot para HIF1 $\alpha$  y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de HIF1 $\alpha$  en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21% O<sub>2</sub> (nx) o 1% de O<sub>2</sub> (hx) durante 6 horas (6h), 12 horas (12h), 24 horas (24h) o 48 horas (48h).

### 3.2 HIF2 $\alpha$

Los geles obtenidos del Western Blot muestran las bandas correspondientes a HIF2 $\alpha$  y la  $\beta$ -actina como control de expresión (Figuras 11A, 12A, 13A y 14A). Se realiza la cuantificación de las bandas según lo explicado en el apartado anterior y se representan gráficamente los valores obtenidos.

Se observan resultados dispares en la expresión de HIF2 $\alpha$  en las distintas líneas celulares tumorales.

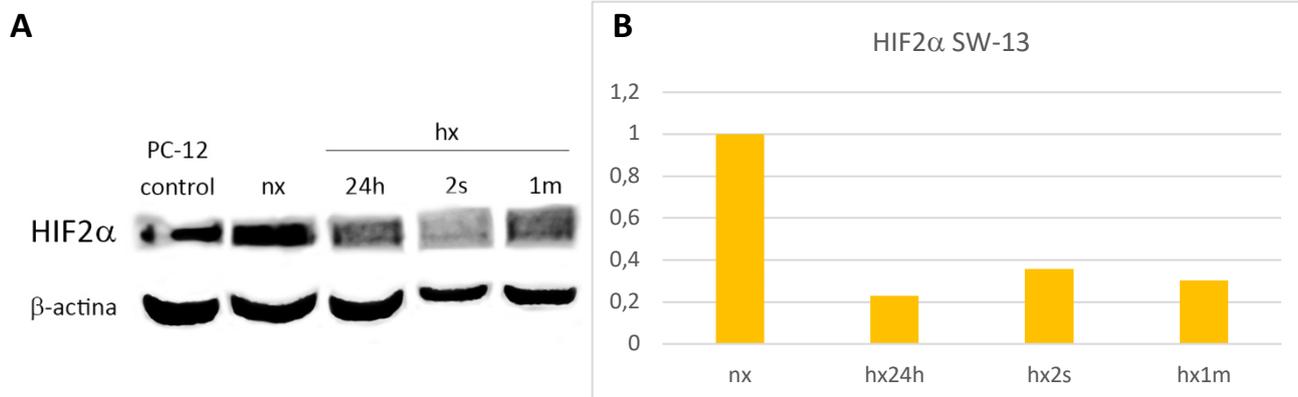
En los datos de SCC-38 (Figura 11B) el valor de HIF2 $\alpha$  es muy elevado en todo el curso temporal de hipoxia frente a la normoxia. Sin embargo, tras 24 horas de exposición a condiciones hipóxicas el pico de expresión es muy evidente, que posteriormente disminuye, hasta que al mes termina por aumentar levemente.



**Figura 11.-** Análisis de HIF2 $\alpha$  en SCC-38. A la izquierda (A) resultados del Western Blot para HIF2 $\alpha$  y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de HIF2 $\alpha$  en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21% O<sub>2</sub> (nx) o 1% de O<sub>2</sub> (hx) durante 24 horas (24h), 2 semanas (2w) o un mes (1m).

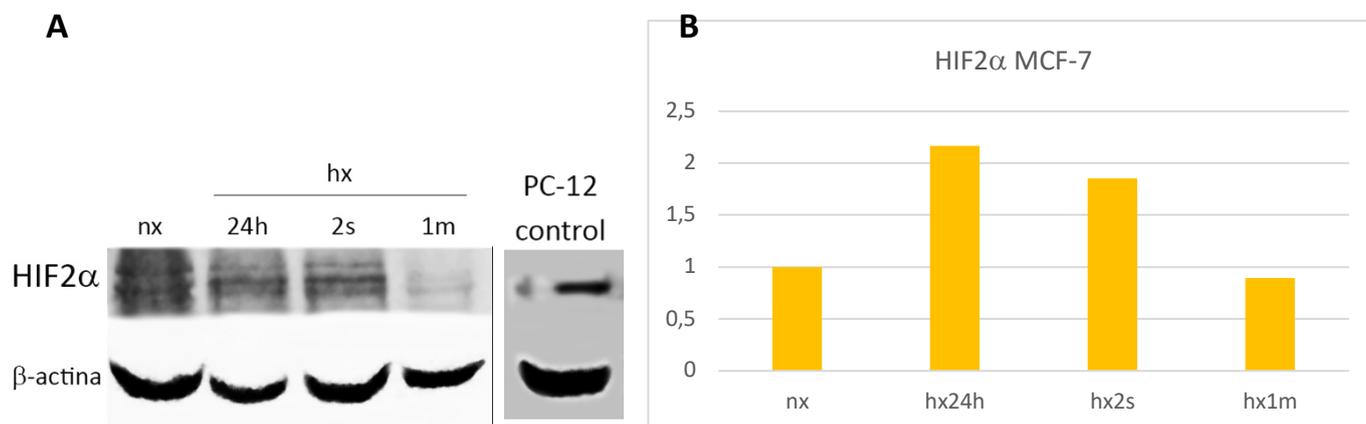
En el caso de SW-13 (Figura 12B) en hipoxia el valor de HIF2 $\alpha$  revela unos niveles menores que los presentes en normoxia. Aun así, centrándonos en los tiempos de hipoxia, hay una expresión baja en las 24 horas, que luego aumenta tras 2 semanas (casi el doble respecto a las 24 horas) y

vuelve a disminuir ligeramente al mes. La línea PC-12 actúa como control de la expresión de HIF2 $\alpha$ .



**Figura 12.-** Análisis de HIF2 $\alpha$  en SW-13. A la izquierda (A) resultados del Western Blot para HIF2 $\alpha$  y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de HIF2 $\alpha$  en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21% O<sub>2</sub> (nx) o 1% de O<sub>2</sub> (hx) durante 24 horas (24h), 2 semanas (2w) o un mes (1m). La línea PC-12 se utilizó como control de expresión de HIF2 $\alpha$ .

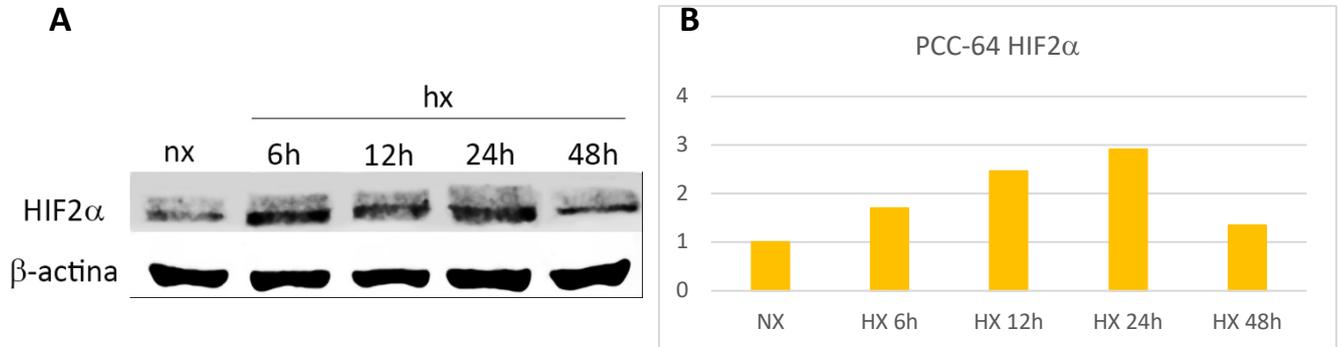
Las MCF-7 (Figura 13B) presentan en todo el curso temporal de hipoxia un valor de HIF2 $\alpha$  elevado frente a la normoxia (excepto tras 1 mes que disminuye ligeramente). Sin embargo, tras 24 horas de exposición a condiciones hipóxicas hay un pico de expresión muy evidente, que posteriormente disminuye de forma gradual hasta 1 mes de hipoxia. PC-12 actúa como control de expresión de HIF2 $\alpha$ .



**Figura 13.-** Análisis de HIF2 $\alpha$  en MCF-7. A la izquierda (A) resultados del Western Blot para HIF2 $\alpha$  y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de HIF2 $\alpha$  en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21% O<sub>2</sub> (nx) o 1% de O<sub>2</sub> (hx) durante 24 horas (24h), 2 semanas (2w) o un mes (1m). La línea PC-12 se utilizó como control de expresión de HIF2 $\alpha$ .

Por último, la línea PCC-64 (Figura 14B) presenta una expresión mayor de HIF2 $\alpha$  muy notable en condiciones de hipoxia frente a la normoxia. De hecho, desde las 6 horas hasta las 24 horas

se produce un aumento progresivo y, en este último, hay un pico de expresión que triplica al valor de la normoxia. A las 48 horas de exposición a hipoxia HIF2 $\alpha$  disminuye considerablemente alcanzando, incluso, los niveles de normoxia.

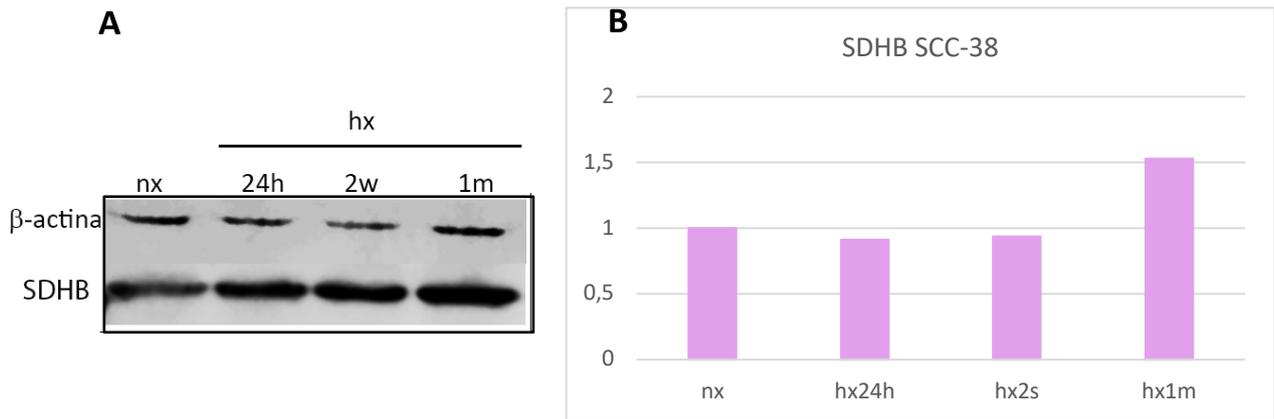


**Figura 14.-** Análisis de HIF2 $\alpha$  en PCC-64 A la izquierda (A) resultados del Western Blot para HIF2 $\alpha$  y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de HIF2 $\alpha$  en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21% O<sub>2</sub> (nx) o 1% de O<sub>2</sub> (hx) durante 6 horas (6h), 12 horas (12h), 24 horas (24h) o 48 horas (48h).

### 3.3 SDHB

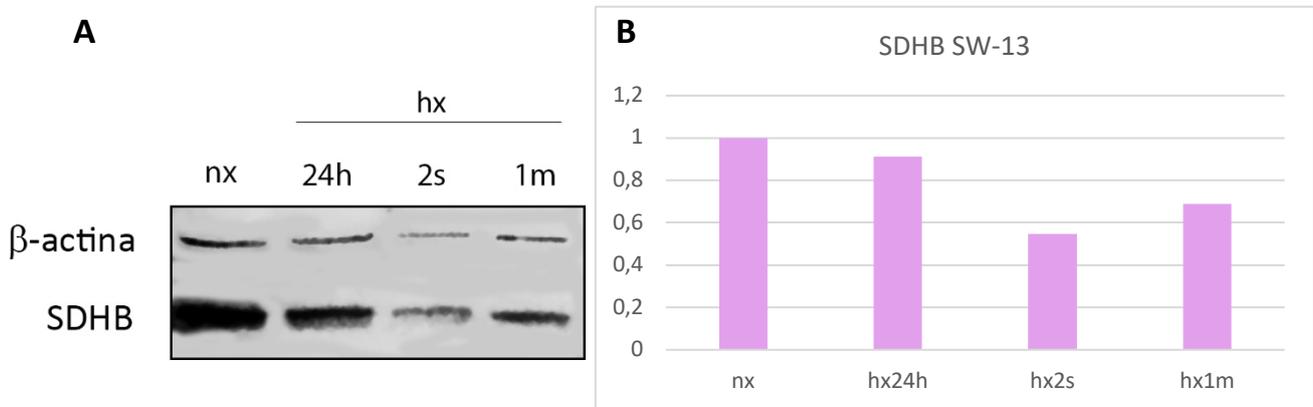
Tras la realización del Western Blot se pueden visualizar las bandas correspondientes a SDHB y la  $\beta$ -actina como control de expresión (Figuras 15A, 16A, 17A, 18A y 19A) y conocer la expresión de la proteína de interés en las distintas condiciones de disponibilidad de O<sub>2</sub>. Se cuantifican bandas como se indica en el apartado 3.1 y se representan gráficamente los datos obtenidos.

Los resultados de SCC-38 (Figura 15B) revelan valores similares entre las 24 horas y 2 semanas de hipoxia, frente a la normoxia (ligeramente inferiores en los dos primeros respecto a la normoxia). Aun así, hay una evidente relación progresiva en el curso temporal de hipoxia, terminando con un pico de expresión al mes de hipoxia (1,5 veces mayor que en normoxia).



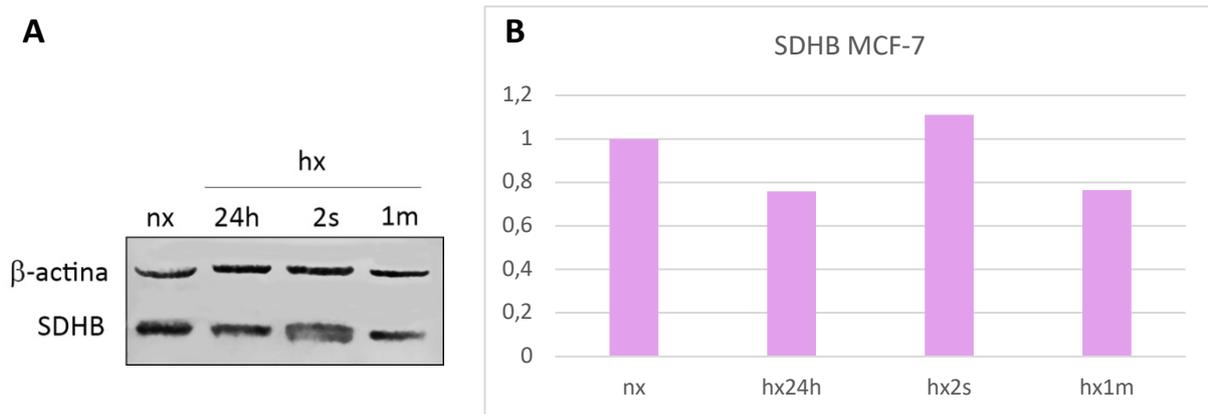
**Figura 15.-** Análisis de SDHB en SCC-38. A la izquierda (A) resultados del Western Blot para SDHB y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de SDHB en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21%  $O_2$  (nx) o 1% de  $O_2$  (hx) durante 24 horas (24h), 2 semanas (2w) o un mes (1m).

En las SW-13 (Figura 16B) SDHB tiene una fuerte expresión en normoxia que casi se mantiene a las 24 horas de hipoxia. Sin embargo, a las 2 semanas disminuye casi a la mitad (frente a la normoxia) y termina por aumentar ligeramente tras un mes sometidas las células a la hipoxia.



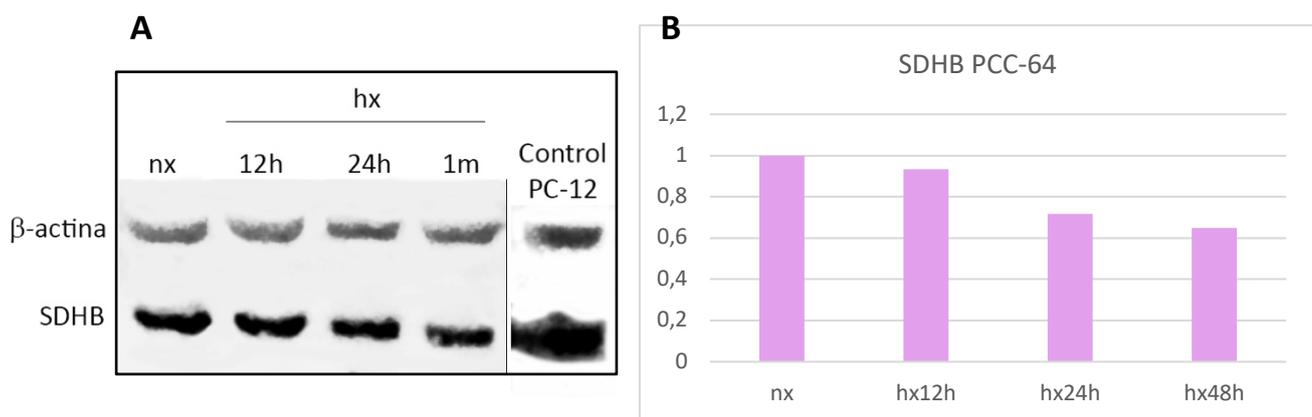
**Figura 16.-** Análisis de SDHB en SW-13. A la izquierda (A) resultados del Western Blot para SDHB y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de SDHB en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21%  $O_2$  (nx) o 1% de  $O_2$  (hx) durante 24 horas (24h), 2 semanas (2s) o un mes (1m).

Por otro lado, SDHB muestra un pico de expresión tras 2 semanas de exposición a hipoxia en las MCF-7. Sin embargo, los niveles a las 24 horas y 1 mes de hipoxia disminuyen y resultan, incluso, más bajos que los niveles de normoxia (Figura 17B).



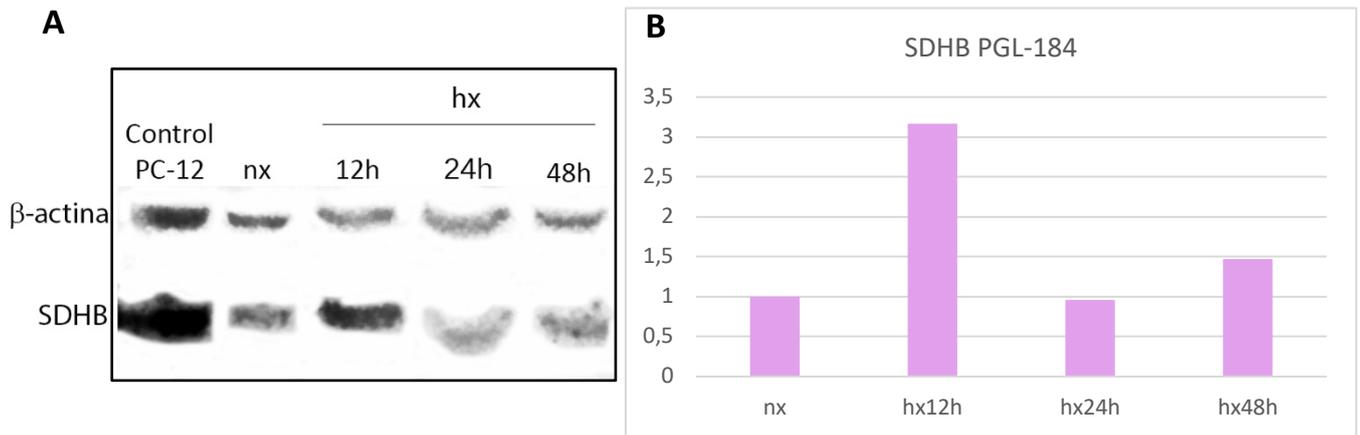
**Figura 17.-** Análisis de SDHB en MCF-7. A la izquierda (A) resultados del Western Blot para SDHB y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de SDHB en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21%  $O_2$  (nx) o 1% de  $O_2$  (hx) durante 24 horas (24h), 2 semanas (2s) o un mes (1m).

Luego, la gráfica de PCC-64 explica una disminución gradual de SDHB en el curso temporal de hipoxia desde las 12 horas hasta las 48 horas de hipoxia. Además, los niveles de SDHB se muestran menores en todas las hipoxias que en normoxia (Figura 18B).



**Figura 18.-** Análisis de SDHB en PCC-64 A la izquierda (A) resultados del Western Blot para SDHB y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de SDHB en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21%  $O_2$  (nx) o 1% de  $O_2$  (hx) durante 6 horas (6h), 12 horas (12h), 24 horas (24h) o 48 horas (48h). La línea PC-12 se utilizó como control de expresión de SDHB.

Finalmente, en PGL-184 los niveles de SDHB en esta línea celular son muy parecidos y regulares entre la normoxia y la hipoxia en tiempos de 24 horas y 48 horas. Sin embargo, en las primeras 12 horas de exposición a hipoxia se produce un pico de expresión que triplica los niveles de normoxia (Figura 19B).

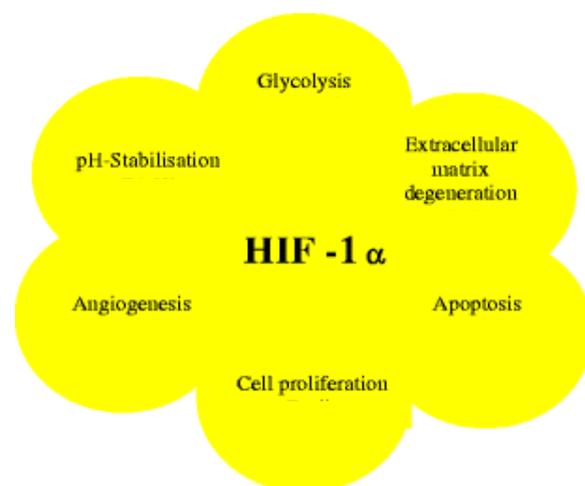


**Figura 19.-** Análisis de SDHB en PGL-184 A la izquierda (A) resultados del Western Blot para SDHB y control de  $\beta$ -actina. A la derecha (B) gráfica en la que se muestran los valores relativos de SDHB en el curso temporal de hipoxia respecto al valor de normoxia expresados en unidades arbitrarias. Las células se incubaron con 21%  $O_2$  (nx) o 1% de  $O_2$  (hx) durante 12 horas (12h), 24 horas (24h) o 48 horas (48h). La línea PC-12 se utilizó como control de expresión de SDHB.

## 4 DISCUSIÓN

### 4.1 HIF1 $\alpha$

Las distintas líneas celulares revelan comportamientos diferentes con respecto a la expresión del factor HIF1 $\alpha$  a lo largo del tiempo de exposición de las células a hipoxia. Mientras que en células MCF-7 y SCC-38 la hipoxia induce incremento de HIF1 $\alpha$  en tiempos cortos para luego disminuir al mes de hipoxia, en las células SW-13, la respuesta es más lenta en el tiempo, pero se mantiene a largo plazo.



**Figura 20.-** Resumen de las adaptaciones metabólicas mediadas por HIF1 $\alpha$  en las células tumorales. Figura modificada de Eckert et al, 2012.

Además, salvo en células MCF-7, hay una ligera estabilización de HIF1 $\alpha$  en normoxia en todas las líneas celulares. Esto fue más evidente en las células derivadas de paragangliomas lo que era esperable dado el importante papel que los factores HIF desempeñan en este tipo de tumores.

Los resultados en células SCC-38 y MCF-7 concuerdan con datos publicados previamente (Eckert *et al*, 2012) (Zhang *et al*, 2017). El factor HIF1 $\alpha$  es capaz de influir en la adaptación al microambiente tumoral participando en la regulación de genes relacionados en funciones como la angiogénesis, estabilización del pH, glicolisis... siendo todas ellas clave para el mantenimiento de la homeostasis del O<sub>2</sub> (Figura 20) (Eckert *et al*, 2012). De hecho, muchos autores han concluido que la sobre-expresión de este factor se puede llegar a correlacionar con la agresividad, progresión tumoral, y supervivencia de pacientes con carcinoma de células escamosas.

Los resultados en células PCC-64 resaltan el importante papel que HIF tiene en la patogénesis de estos tumores de modo que se acumula ya en condiciones de normoxia. Tanto los feocromocitomas como los paragangliomas son muy conocidos por su respuesta a la hipoxia y por la expresión de HIF en condiciones de normoxia y de baja disponibilidad de O<sub>2</sub>. Esta inducción de HIF por parte de estos tipos tumorales resultan en la activación de genes implicados en la respuesta a hipoxia, lo que finalmente favorece la tumorigénesis (Jochmanová *et al*, 2013).

#### 4.2 HIF2 $\alpha$

Varios estudios han mostrado que la acumulación de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  siguen un curso temporal diferente de modo que HIF1 $\alpha$  presenta un pico de expresión en las primeras horas de exposición a hipoxia, pero luego disminuye, mientras que la expresión de HIF2 $\alpha$  se mantiene a lo largo del tiempo.

Corteza adrenal HIF2 $\alpha$

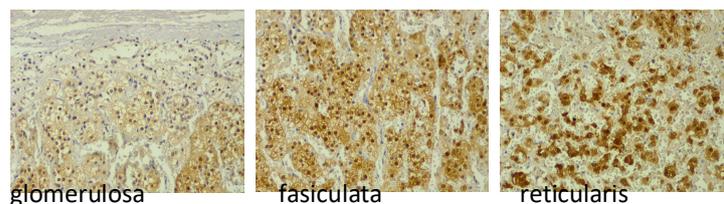
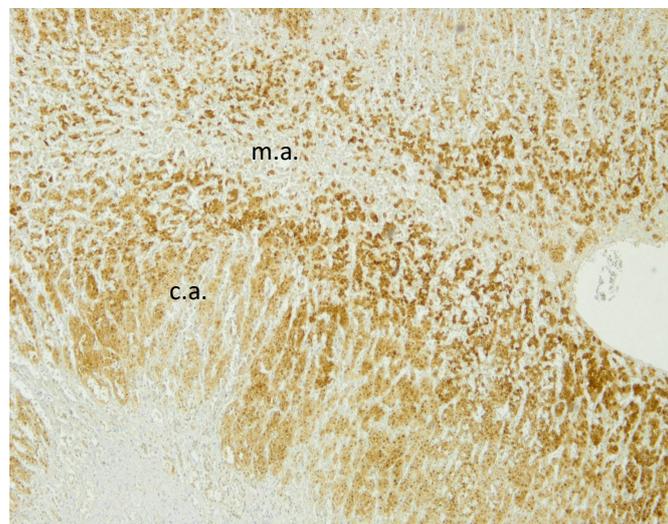


Figura 21.- Inmunohistoquímica para HIF2 $\alpha$  realizada en la corteza adrenal sana. Esto explica una expresión fisiológica de dicho factor.

Este comportamiento típico es el que se observa en las células SCC-38. En MCF-7 y PCC-64 se observa reducción de los niveles de proteína en hipoxia prolongada lo que indica que en este tipo de células puede tener un mecanismo de regulación similar al de HIF1 $\alpha$ .

En cuanto a la línea SW-13, HIF2 $\alpha$  se expresa en niveles muy elevados en condiciones normóxicas (*Figura 12*). Esto concuerda con datos publicados por este grupo de investigación en el que se ha realizado este Trabajo Fin de Grado, que describe acumulación de HIF2 $\alpha$  en condiciones de normoxia en células de la corteza adrenal. Tal y como se visualiza en la inmunohistoquímica realizada para HIF2 $\alpha$  en la corteza adrenal (c.a) sana (*Figura 21*), y en sus capas (glomerulosa, fasciculata y reticularis), la expresión fisiológica de este factor es muy evidente. Este resultado se puede explicar con un cambio de isoforma del complejo, ya que en hipoxia hay una prevalencia de la expresión de HIF1 $\alpha$  y en condiciones fisiológicas predomina HIF2 $\alpha$ . Esto concuerda con los resultados obtenidos.

#### 4.3 SDHB

Es conocido que el incremento de HIF en hipoxia induce sobreexpresión del microARN miR-210 y que éste tiene como diana el gen ISCU cuya actividad se requiere para el correcto ensamblaje de SDHB. Por tanto, si la vía de activación HIF-miR-210-SDHB se encuentra activada en hipoxia, deberíamos esperar disminución de los niveles de SDHB en los experimentos realizados en este trabajo. Analizando los resultados de la SDHB en todas las líneas celulares se puede concluir que, en SCC-38, MCF-7 y PCC-64 no hay apenas cambios y, por tanto, la hipoxia no regula los niveles de esta proteína. No obstante, es posible que un ensamblaje anómalo de los centros de Fe-S en SDHB no se traduzca en la degradación de la proteína. Por tanto, en un futuro se debería llevar a cabo un estudio de la actividad enzimática de SDHB para concluir si la hipoxia regula la actividad del enzima.

En el caso las células SW-13, los resultados muestran una disminución de SDHB en condiciones de hipoxia frente a las de normoxia. Por tanto, sería interesante determinar si la hipoxia induce miR-210 y reprime los niveles de ISCU en esta línea celular.

## 5 CONCLUSIONES

---

Tras la realización de este trabajo experimental se exponen a continuación las siguientes conclusiones:

1. Los resultados muestran una evidente regulación positiva de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, pero estas respuestas pueden variar dependiendo del tipo de línea celular.
2. En tiempos de hipoxia prolongada, HIF1 $\alpha$  se regula negativamente en células SCC-38 pero no en MCF-7, SW-13 o PCC-64
3. Salvo en células MCF-7, hay una ligera estabilización de HIF1 $\alpha$  en normoxia en todas las líneas celulares sobre todo en las células derivadas de paragangliomas lo que es esperable dado el importante papel que los factores HIF desempeñan en este tipo de tumores.
4. En tiempos de hipoxia prolongada, HIF2 $\alpha$  se regula negativamente en células SW-13 y PCC-64.
5. Las células SW-13 expresan niveles elevados de HIF2 $\alpha$  en normoxia lo que concuerda con estudios de inmunohistoquímica de HIF2 $\alpha$  realizados en glándula adrenal sana.
6. La hipoxia no modifica los niveles de SDHB en ninguno de los tipos celulares estudiados salvo en células SW-13 en las que disminuye.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

---

- Dona, M., Neijman, K., & Timmers, H. (2021). MITOCHONDRIA: Succinate dehydrogenase subunit B-associated pheochromocytoma and paraganglioma. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *134*, 105949. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.105949>
- Eckert, A. W., Kappler, M., Schubert, J., & Taubert, H. (2012). Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral and Maxillofacial Surgery*, *16*(2), 189-196. <https://doi.org/10.1007/s10006-012-0335-8>
- Jochmanová, I., Yang, C., Zhuang, Z., & Pacak, K. (2013). Hypoxia-inducible factor signaling in pheochromocytoma: turning the rudder in the right direction. *Journal of the National Cancer Institute*, *105*(17), 1270-1283.
- Keith, B., Johnson, R. S., & Simon, M. C. (2011). HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews. Cancer*, *12*(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc3183>
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2018). Patología humana. (10ª ed). Elsevier España. ISBN: 978-84-9113-180-9.
- Lee, P., Chandel, N. S., & Simon, M. C. (2020). Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *21*(5), 268–283. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0227-y>
- Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell*, *40*(2), 294–309. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.022>



Merlo, A., de Quirós, S. B., de Santa-María, I. S., Pitiot, A. S., Balbín, M., Astudillo, A., Scola, B., Arístegui, M., Quer, M., Suarez, C., & Chiara, M.-D. (2013). Identification of Somatic *VHL* Gene Mutations in Sporadic Head and Neck Paragangliomas in Association With Activation of the HIF-1 $\alpha$ /miR-210 Signaling Pathway. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(10), E1661-E1666. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1636>

National Geographic (10 de octubre de 2019). *Premio Nobel de Medicina 2019 para el estudio de la adaptación de las células al oxígeno disponible*. [https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/premio-nobel-medicina-para-estudio-adaptacion-celulas-oxigeno-disponible\\_14785](https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/premio-nobel-medicina-para-estudio-adaptacion-celulas-oxigeno-disponible_14785)

Zhang, Y., Yan, J., Wang, L., Dai, H., Li, N., Hu, W., & Cai, H. (2017). HIF-1 $\alpha$  promotes breast cancer cell MCF-7 proliferation and invasion through regulating miR-210. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 32(8), 297-301.