

El factor HIF-1 inducido por la hipoxia y la sensibilidad al oxígeno. Rol del hierro intracelular

HIF-1 factor induced by hypoxia and oxygen sensitivity. Role of intracellular iron

Patrick Wagner Grau

RESUMEN

Los dos factores inducibles por la hipoxia, HIF-1 y HIF-2 son los principales mediadores de la adaptación celular a la hipoxia y se hallan fuertemente expresados, en condiciones de hipoxia tanto regional como sistémica. HIF-2 parece estar más en relación con la secreción de EPO por los fibroblastos maduros intersticiales. Al producirse un estado de hipoxia sistémica, como es el caso de la anemia, se induce la formación de HIF-1 y 2. Las células tubulares renales expresan sólo HIF-1. El HIF2 se encuentra en las células glomerulares, las células endoteliales peritubulares y los fibroblastos intersticiales. HIF-1 y HIF-2 parecen ejercer roles complementarios más que papeles redundantes in vivo. Ambos factores han sido estudiados en diversas patologías renales: en lesiones renales agudas, en patología crónica del riñón, en la poliquistosis renal y en el cáncer de riñón. Diversas sustancias químicas, incluyendo el hierro, son capaces de inhibir a las HIF – prolyl – hidroxilasas (PHD) evitar así la degradación de las moléculas de HIF 1 y 2.

Palabras Clave: Hierro, anoxia, factor 1 inducible por la hipoxia

ABSTRACT

Both hypoxia inducible factors, HIF-1 and HIF-2 are the main mediators of cellular adaptation to hypoxia and are strongly expressed under conditions of regional and systemic hypoxia. HIF-2 seems to be more related to the secretion of mature EPO interstitial fibroblasts. Upon a state of systemic hypoxia, such as anemia, induces the formation of HIF-1 and 2. Renal tubular cells express only HIF-1. The HIF2 found in glomerular cells, peritubular endothelial cells and interstitial fibroblasts. HIF-1 and HIF-2 seem to play complementary roles rather than redundant roles in vivo. Both factors have been studied in various kidney diseases: in acute kidney injury, in chronic kidney disease, in polycystic kidney disease and kidney cancer. Various chemical substances, including iron, can inhibit the HIF - prolyl - hydroxylase (PHD) thus avoiding the degradation of HIF molecules 1 and 2.

Keyword: Iron, anoxia, hypoxia-inducible factor 1

EL FACTOR HIF-1 INDUCIDO POR LA HIPOXIA Y LA SENSIBILIDAD AL OXÍGENO

El factor HIF-1 inducido por la hipoxia (HIF por Hypoxia Inducible Factor) es un complejo proteico que incrementa la expresión de genes específicos en presencia de bajas concentraciones de oxígeno. El HIF ha sido identificado con ocasión de estudios de la regulación del gen que codifica a la eritropoyetina (EPO), pero se observó rápidamente que desempeñaba funciones bastante más importantes en materia de adaptación entre aportes y requerimientos de oxígeno. El HIF es particularmente importante para el riñón, no sólo en razón de su rol en la producción de la EPO sino también porque la activación del HIF ha demostrado ser el evento clave en la mayoría de los cánceres de riñón tanto hereditarios como “adquiridos”.

COMPLEJO HIF Y MECANISMO DE SU REGULACIÓN POR EL OXÍGENO

El HIF se halla presente en todas las células de mamíferos estudiadas y, remontando en la escala evolutiva, se le encuentra hasta en el nemátodo *C.elegans* y la drosófila *D.melanogaster*.

El HIF fue aislado por primera vez en 1993 y sus componentes proteicos, identificados en 1995.

A partir de entonces, se ha progresado considerablemente en la vía de la comprensión del modo de funcionamiento de este sistema y en el rol que cumple tanto en fisiología como en patología. El HIF es activado de modo exponencial

a medida que disminuye la presión de oxígeno en los cultivos celulares.

Activa la transcripción, ligándose a los elementos de respuesta del ADN, presentándose a estos elementos y activando la secuencia nucleotídica consenso 5'-BRCGTVG-3'.

Puede, asimismo, el HIF ser eficazmente activado por los quelantes del hierro y por ciertos metales de transición como el cobalto. Es muy frecuente que se diga de estos activadores del HIF que simulan la hipoxia lo que es, de hecho, inexacto. En normoxia, la cantidad de HIF detectable en los cultivos celulares es variable. Aún cuando ésta sea generalmente muy inferior a lo que es posible observar en condiciones de hipoxia, ciertas experiencias genéticas han demostrado que el HIF es capital para el desarrollo normal de los mamíferos y posee efectos no despreciables sobre la expresión de los genes en células cultivadas en ambiente con 20 % de oxígeno.

El Complejo HIF

Un complejo HIF contiene una subunidad reguladora alfa y una subunidad constitutiva beta, que pertenecen a la familia de los factores de transcripción bHLH/PAS (proteínas que contienen además del dominio bHLH (por “basic helix-loop helix”), un dominio PAS (por “Per Arnt Sim”). La subunidad beta es constitutiva y está asimismo implicada en la respuesta a los xenobióticos que se acompaña de una heterodimerización con el receptor intracelular AhR (Aryl hydrocarbon Receptor). La subunidad alfa es regulada por el oxígeno. Tres genes distintos, que codifican la subunidad HIF-alfa, han sido identificados en los mamíferos: HIF-1 α , HIF-2 α (también llamado EPAS1) y HIF-3 α (uno de

1. Médico Internista, Nefrólogo. Académico de Número de la Academia Nacional de Medicina, Lima, Perú. Past Decano Del Colegio Médico del Perú, Lima, Perú.

cuyos transcritos ha sido llamado IPAS, por inhibitory PAS protein (proteína inhibidora a dominio PAS). Nuestro conocimiento de HIF-3 α , del cual existen varias variantes de episaje que, en algunos, pueden tener una actividad inhibidora sobre la respuesta de HIF, es limitada. Como regla general, los cultivos celulares expresan ambos genes HIF-1 α e HIF-2 α . Es de hacer notar que la regulación se opera esencialmente por medio de la estabilización de las proteínas HIF α , de suerte que es posible determinar el grado de activación de HIF a partir de la cantidad de HIF-1 α y de HIF-2 α detectada por inmunoblotting o por análisis inmunoquímico. En la rata, se ha constatado que existe en los tejidos in situ, a escala celular, una expresión predominante del gen HIF-1 α o del gen HIF-2 α . Estudios de inactivación génica (“Knockout”) han establecido, en la rata, que la redundancia funcional entre estas subunidades es limitada; la inactivación de una o de otra posee efectos severos sobre el desarrollo embrionario. A nivel de la célula, HIF-1 y HIF-2 modifican de manera diferente la expresión de los genes aún cuando este proceso no esté todavía completamente dilucidado.

Regulación del complejo HIF por el oxígeno

La regulación por el oxígeno de HIF-1 α y de HIF-2 α se opera vía la hidroxilación enzimática. Las enzimas utilizan el oxígeno molecular para modificar residuos – target de aminoácidos muy específicos. Estas modificaciones permiten así la destrucción de los coactivadores transcripcionales y previenen su reclutamiento. Estas enzimas – las HIF hidroxilasas – pertenecen a una familia heterogénea de enzimas que contienen hierro en su sitio activo y utilizan el oxígeno molecular y el 2-oxoglutarato.

La destrucción resulta posible por la hidroxilación de uno o de otro de los dos residuos propil¹⁶ y es realizada por las proli-hidroxilasas PHD₁, PHD₂ o PHD₃. El residuo 4-hidroxiprolina se aloja en una “poche” en la superficie del oncosupresor VHL (por von Hippel-Lindau), que opera como el elemento de reconocimiento de un complejo ubiquitina ligasa E3, de suerte que esta captura lleva a la ubiquitinilación y a la destrucción final de HIF. La transactivación es controlada gracias a la hidroxilación de un residuo asparaginil a proximidad del dominio C-terminal de transactivación de las subunidades HIF- α y es ejecutada por una enzima diferente, el FIH-1 (factor inhibiting HIF-1).

La conversión en β -hidroxiasparagina impide toda interacción con los coactivadores CBP/p300. Las reacciones enzimáticas mediadas por las PHD y el FIH-1 constituyen las base de la función “receptor de oxígeno” que regula el grado de hidroxilación de HIF y, por tanto, su actividad. Este mecanismo es compatible con el hecho que la constante de Michaelis-Menten (Km) para el oxígeno es relativamente elevada. La capacidad de los quelantes del hierro y del cobalto (II) de activar HIF se explica por el hecho que éstos inactivan fácilmente a las HIF hidroxilasas.

Regulación de la producción de Eritropoyetina (EPO) – arquetipo de la respuesta al HIF

La EPO es una hormona glicoproteica circulante, indispensable para la producción de los eritrocitos. Durante la vida postnatal, es producida esencialmente por los fibroblastos intersticiales renales.

Si el aporte de oxígeno al riñón disminuye, la tasa de ARNm de la EPO aumenta llevando así a la elevación de las concentraciones circulantes de EPO. Se trata de una respuesta de fuerte amplitud (hasta 1000 veces) que implica una intensificación de la transcripción de los genes. El hígado es, asimismo, productor de EPO, pero los pacientes con insuficiencia renal en estadio avanzado son generalmente anémicos y tienen una respuesta disminuida a EPO.

No existe un modelo de cultivo celular de fibroblastos renales que produzcan EPO; se constata una secreción de EPO regulada por el oxígeno en ciertas líneas celulares de hepatoma. Este control se opera principalmente por intermedio de un activador sensible a la hipoxia situado justo hacia delante del gen, notablemente conservado de una especie a la otra. El estudio de este elemento de activación ha llevado al aislamiento del complejo HIF. Paralelamente a este descubrimiento, diversas experiencias de transferencia genética han logrado mostrar que este activador era capaz de responder al oxígeno en todos los tipos de células de mamíferos estudiados sugiriendo así que este sistema de transactivación regula a otros genes.

El sistema EPO plantea un cierto número de preguntas muy interesantes a las cuales aún no se ha dado respuesta. Se ignora, por ejemplo, la razón por la cual la expresión de la EPO se halla afectada en la insuficiencia renal. Es de hacer notar que la respuesta de la EPO se halla con frecuencia relativamente preservada en los pacientes con enfermedad poliquística autosómica dominante. Es poco probable que este fenómeno esté directamente ligado a la anomalía genética puesto que, generalmente, los pacientes dializados que desarrollan una enfermedad quística adquirida no requieren tampoco una suplementación de EPO. El rol de elementos específicos del sistema HIF en la regulación normal de la EPO es otra pregunta que permanece sin respuesta. Los estudios llevados a cabo en la rata han revelado que una disminución del aporte de oxígeno al riñón induce en los fibroblastos exclusivamente a la proteína HIF-2 α y no a la proteína HIF-1 α . Esta constatación sugiere fuertemente que la respuesta de EPO está mediada por la activación de HIF-2 α . Así, los ratones Knockout para el gen HIF-2 α presentan un déficit hematopoyético que se restablece por el injerto a ratones irradiados con dosis letales de células de médula ósea en las cuales había sido transferido el gen HIF-2 α . Además, en ratones heterocigotos para un alelo HIF-2 α defectuoso, la respuesta eritropoyética a la hipoxia está alterada. El hecho es que la EPO se ha mostrado particularmente sensible a la inactivación funcional o “Knockdown” del gen HIF-2 α en la regulación de la EPO. Ha sido, asimismo, reportado que ratones heterocigotos para un déficit en HIF-1 α manifiestan una respuesta eritropoyética a la hipoxia disminuida lo

que parece indicar que HIF-1 α se haya implicado en la respuesta normal de la EPO in vivo.

Complejidad de la respuesta del Factor HIF

Es verosímil que células diferentes responden de manera diferente a una modificación de las concentraciones de oxígeno.

Células diferentes expresan los genes HIF-1 α y HIF-2 α en proporciones variables, siendo el grado de expresión de estos genes, según toda apariencia, regulado a escala de la transcripción. In vitro, prácticamente todas las células en condición de hipoxia expresan la proteína HIF-1 α mientras que la presencia de HIF-2 α se muestra mucho más variable de un tipo de células a otro.

Un reciente estudio ha implicado a la oxidasa NOX4 como elemento indispensable para la expresión normal de HIF-2 α , produciendo la inactivación funcional de NOX4 (“Knockdown”) por ARN silenciosos (pequeños ARN de interferencia), una disminución de hasta el 80 % de la concentración de HIF-2 α .

Existen tres tipos distintos de HIF prolin-hidroxilasas (PHD). Su grado de expresión varía en función del órgano y del tipo de estímulo tal como una exposición hormonal (PHD1) o una hipoxia prolongada (PHD₂ o PHD₃). La reacción de HIF-prolin-hidroxilación no está en equilibrio y un aumento de la concentración de la enzima provoca una aceleración de la velocidad de reacción, disminuyendo por esta vía, el grado de activación de HIF para un nivel de oxigenación dado. Los efectos son más complejos y no se limitan al simple ajuste de la cantidad total de enzimas, no exhibiendo estas tres enzimas las mismas preferencias por los dos sitios de hidroxilación en los sustratos HIF- α y las diferentes localizaciones en el seno de la célula³⁶. Además, la aspariginil-hidroxilación se superpone a la señal de prolin-hidroxilación. No se conoce aún el impacto de este fenómeno sobre la señal global. En los cultivos celulares, el aumento o la reducción de la actividad FIH (“*factor inhibiting HIF*”) modula efectivamente la activación de HIF.

La disminución de las concentraciones de Fe⁺⁺ y también de ascorbato o la elevación de las concentraciones de ciertos intermediarios cíclicos del ácido tricarbóxico son capaces de modular la activación de HIF.

Además de estos parámetros, cuyo efecto sobre la activación de HIF está bien establecido, existen numerosas otras posibles vías de modulación de la señal oxígeno – dependiente; específicamente variantes de episaje, modificaciones post-transcripcionales de las subunidades HIF- α y, probablemente, de las hidroxilasas.

Además de la flexibilidad propia a la vía HIF, las interacciones entre el HIF y otros sistemas de control son manifiestamente importantes y susceptibles de aparecer bajo diversas formas. El caso en que el HIF tiene un impacto directo sobre la expresión de los factores de transcripción constituye la forma de interacción más sencilla de aprehender. Existen formas de interacciones

más complejas: reacciones cruzadas debidas a la competición con coactivadores o sitios que cabalgan sobre varios elementos activadores.

Ha sido demostrado últimamente que la hipoxia potencializa la señalización de la proteína Notch de manera dependiente del gen HIF-1 α . En este caso, parece existir interacción entre el HIF y el dominio intracelular clivado de la proteína Notch que acentúa la señal de transactivación e impide así la diferenciación.

Campo de acción del sistema HIF

Las razones por las cuales las células pueden tener que responder a concentraciones variables de oxígeno ameritan un somero examen. En primer lugar, numerosas reacciones intracelulares requieren la presencia de oxígeno molecular siendo el principal ejemplo su rol como aceptor terminal de electrones en la respiración mitocondrial.

El oxígeno molecular desempeña asimismo un importante rol en numerosos otros procesos metabólicos. Es, por ejemplo, requerido para la producción de óxido nítrico por las NO-sintasas, para la hidroxilación del colágeno por las prolin-hidroxilasas y para la síntesis del colesterol. De hecho, la constante Km del oxígeno de estas reacciones es generalmente netamente superior a la de la citocromo-C oxidasa por lo que uno espera a que estos procesos sean más sensibles a una reducción del oxígeno disponible que lo que pudiera ser el transporte de electrones en la mitocondria. Así, las células explotan las informaciones referentes a las variaciones de oxigenación para ajustar en detalle su propio sistema metabólico y desencadenar cambios adaptativos tendientes a restablecer el aporte normal de oxígeno (actuando, por ejemplo, sobre la angiogénesis). Una segunda razón potencial de responder a las variaciones de concentración de oxígeno es que las formas reactivas de oxígeno (RRO) son producidas a partir del oxígeno y son altamente reactivas. Persisten aún numerosas incertidumbres, pero está emergiendo una idea nueva: si bien está establecido que concentraciones elevadas de oxígeno inducen estrés oxidativo, es posible que concentraciones bajas tengan el mismo efecto, al perturbar el fenómeno de acoplamiento en la cadena de transporte mitocondrial de electrones.

Una tercera razón mayor de la sensibilidad de las células a la concentración de oxígeno consiste en la utilización de esta función como señal más que como respuesta a un estrés ambiental, necesitándose un cambio adaptativo. Por ejemplo, las células del riñón utilizan la oxigenación local como señal para determinar los cambios apropiados en la masa eritrocitaria. De modo similar, las células del glomus carotídeo utilizan la oxigenación local para producir una señal que sirve para regular la frecuencia respiratoria. La idea según la cual una débil concentración de oxígeno pudiera producir señales destinadas al “homing” de las células troncales y al mantenimiento de un estado no diferenciado multipotente resulta ser particularmente interesante. Existe manifiestamente un cierto grado de cabalgamiento en la utilización del oxígeno como regulador fisiológico y como señal de inducción

de mecanismos de adaptación individual. Este es, por ejemplo, el caso de la utilización de la oxigenación celular local en el determinismo de la arquitectura capilar.

La diversidad de los roles biológicos del sistema HIF sugiere que numerosos genes, con elementos de respuesta funcionales al HIF en configuración cis, son blancos directos del HIF. La ausencia de respuesta de los fibroblastos embrionarios de ratón, en los que falta el gen HIF-1 α , demuestra que otros genes son regulados por el oxígeno de modo dependiente del HIF. Aparece claramente que algunos de entre ellos entran en juego en los efectos indirectos del HIF. Es de todos modos evidente que la activación del HIF ha de modificar probablemente la expresión de un centenar de genes como mínimo y tendrá impacto sobre numerosos procesos de desarrollo, fisiológicos y patológicos mayores. La inactivación de uno de los elementos HIF-1 α , HIF-1 β , PHD2 ó VHL provoca letalidad embrionaria. En ciertas experiencias, la inactivación de HIF-2 α tiene efectos ligeramente menos espectaculares, probablemente en razón de un rol más especializado. Las respuestas celulares donde el rol del HIF resulta mejor comprendido son la eritropoyesis, la absorción de glucosa y la glicólisis, así como la angiogénesis. HIF tiene asimismo impacto sobre numerosos otros procesos celulares, incluyendo la producción del factor de crecimiento y las decisiones de proliferación/muerte. En términos de procesos patológicos, el acento ha sido puesto en el rol del HIF en la evolución del cáncer, esencialmente en razón de la apreciación del rol del onco-supresor de VHL en la vía HIF.

Se ha comprobado que, en relación a los tejidos normales, HIF está activado en los tumores sólidos. Este comportamiento resulta generalmente de una combinación de la hipoxia local y de un nivel de activación incrementado del HIF de las células cancerosas para una presión de oxígeno dada. En la mayor parte de estudios, aunque no en todos, los tumores para los cuales la activación de HIF es más marcada, se asocian a una mayor severidad clínica. En algunos estudios experimentales en los que un grupo de células se implantan en ratones inmunodeficientes, la inactivación del HIF posee efectos potentes que llevan generalmente a una reducción de la angiogénesis y del crecimiento tumoral. Sin embargo, varios estudios han revelado que el crecimiento de tumores deficientes en HIF es de hecho más rápido, lo cual no resulta totalmente sorprendente dada la pleiotropía de los efectos anexos del HIF.

Vías farmacológicas para la manipulación del sistema HIF.

La manipulación del sistema HIF presenta un gran interés. El conocer los mecanismos moleculares ha permitido identificar diversos blancos de la vía. Estos “targets” incluyen PHD, FIH, la interfase VHL/HIF y la interfase P300 – HIF. Además, han emergido pequeñas moléculas que actúan como activadores e inhibidores del HIF.

Un desafío farmacológico consiste en obtener la actividad terapéutica y la especificidad por el “target” deseado.

Algunos de estos últimos efectos son probablemente previsibles; los inhibidores de PHD son capaces, por ejemplo de inhibir a otros miembros de la superfamilia de las dioxigenasas dependientes del 2-oxoglutarato, específicamente las prolil-4-hidroxilasas del colágeno. El carácter universal del sistema HIF-PHD-VHL en las células de los mamíferos así como la diversidad de sus efectos, implica que las acciones no orientadas al “target” resultan importantes para comprender los efectos de las pequeñas moléculas inhibitoras y comprender su posible utilidad terapéutica. La complejidad del sistema HIF y su comprensión podría, probablemente, ofrecer medios para orientar hacia aspectos particulares de la respuesta al HIF. Resulta, por ejemplo, interesante especular sobre el hecho de que la inhibición selectiva de PHD específicos pudiera evitar ciertos efectos indeseables, al actuar sobre un sitio particular, selectivamente sobre un tipo específico de respuesta al HIF.

La vía del HIF resulta posible de ser manipulada en puntos tan numerosos como variados. Existe, además, un muy amplio abanico de parámetros clínicos para los que pudiera ser de interés perturbar la respuesta de HIF. Actualmente, el interés se dirige principalmente a:

- a) La inactivación del HIF en el cáncer en cuanto estrategia dirigida a inhibir la angiogénesis y reducir la viabilidad de las células cancerosas en las regiones hipóxicas tumorales;
- b) La activación del HIF en la anemia y la isquemia.

Un aspecto interesante de la manipulación del HIF estriba en que ésta pudiera tener impacto sobre numerosas vías distintas: en un tejido isquémico, podría, por ejemplo, aumentar la sobrevida celular incrementando la glicólisis y favoreciendo la angiogénesis.

Los experimentos realizados para reducir la activación del HIF incluyen la acción dirigida a nivel de la interfase HIF α /P300. El empleo de un “screening” de alto débito ha permitido aislar un potente inhibidor de esta interacción: la ketomina.

Esta molécula reduce la expresión de los “targets” del HIF. Sin embargo, diversas experiencias genéticas elaboradas han revelado que los dominios DH1 de P300 y CBP, que son “targets” de la Ketomina, no son esenciales para la inducción de gran número de genes “targets” del HIF. Ello prueba la existencia de otros mecanismos de coactivación en que la sensibilidad a la tricostatina A, un inhibidor de la histona deacetilasa, ha sido demostrada. Ello sobreentiende que un simple bloqueo del dominio CH1 puede resultar ineficaz para bloquear las respuestas de HIF in vivo. Otra posibilidad para reducir la activación del HIF consiste en aumentar la actividad de las PHD, administrando por ejemplo ascorbato o utilizando una metodología fundada en la terapia génica. Ha sido mostrado que un cierto número de compuestos distintos, desarrollados para otros “targets”, son capaces de reducir la actividad del HIF. Estos compuestos incluyen al agente anti-microtúbulo 2ME2, a los inhibidores de la topoisomerasa, a los inhibidores

de la PI3-quinasa y a los inhibidores de mTOR y de PX-478. A pesar de estas interesantes pistas, la posibilidad de llevar a cabo una inhibición potente y selectiva de la activación del HIF no aparece aún con claridad. En ciertos estudios experimentales se ha podido observar, preocupantemente, que la inhibición de la respuesta de HIF acentúa el crecimiento o la agresividad tumorales. En el caso del carcinoma renal a células claras (CRCC), sería probablemente interesante inhibir de manera selectiva al HIF-2 α que parece relativamente protumorigénico y no reducir al HIF-1 α que puede de hecho favorecer la apoptosis.

La activación de HIF por pequeñas moléculas es manifiestamente posible a pesar de la inhibición de las PHD y/o de FIH. Es de esta manera que los agentes quelantes del hierro y los iones cobalto (Co⁺⁺) inducen la producción de EPO. Se ha mostrado que los análogos del 2-oxoglutarato, así como otros intermediarios cíclicos del ácido tricarbóxico y los agentes quelantes del hierro, son eficaces desde este punto de vista. En relación a las enzimas asociadas del tipo prolil-4-hidroxilasa del colágeno, las moléculas actualmente disponibles tienen escasa tendencia a ser selectivas frente a estas enzimas. Constituyen sin embargo, una herramienta útil para estudiar el potencial terapéutico de los activadores de HIF en los modelos animales de enfermedades humanas y podrían tener, asimismo, utilidad clínica. Han sido publicados y algunos estudios clínicos destinados a validar este concepto. Este campo de investigación evoluciona a un ritmo sostenido y ha sido recientemente demostrado que un inhibidor de pequeñas moléculas de una PHD aumenta la EPO y el hematocrito en los pacientes portadores de una enfermedad renal crónica. La aplicación clínica aparece bastante promisoría. El contenido de hierro intracelular parece ser determinante tanto para la producción del HIF como, por ende, para la secreción de EPO por los fibroblastos maduros túbulo intersticiales del riñón.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang GL, Semeza GL. Characterization of hypoxia inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*, 1993; 268: 21513-8.
2. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Inducible operation of the erythropoietin 3' enhances in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 2423-7.
3. Wang GL, Jiang B-H, Rue EA et al. Hypoxia inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92: 5510-4.
4. Jiang B-H, Semenza GL, Bauer C et al. Hypoxia inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *American J Physiol*, 1996; 271: C 1172-80.
5. Makino Y, Cao R, Svensson K et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia inducible gene expression. *Nature* 2001; 414:550-4.
6. Maynard MA, Qih Chung J et al. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the VHLE3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*, 2003; 278: 11032-40.

7. Wiesener MS, Turkley H, Allen WE et al. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood* 1998; 92: 2260-8.
8. Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C et al. Widespread, hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol*, 54, 2002; 13: 1721-32.
9. Rosenberger C, Mandriota S, Jurgensen JS et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and 2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 271-3.
10. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor *HIF(-1 α and HIF-2 α (*EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in HEP 3B and kelly cells. *Faseb J*, 2004; 18:1462-4.
11. Raval RR, Lau KW, Tran MG et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol*, 2005; 25:5675-86.
12. Jakkola P, Mole DR, Tian Y-M et al. Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl-hydroxylation. *Science*, 2001; 292:468-72.
13. Ivan M, Kowdo K, Yang et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 2001; 292:464-8.
14. Lando D, Peet DJ, Whelan DA et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science*, 2002; 295:858-61.
15. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004; 5:343-54.
16. Masson N, Willian C, Maxwell PH et al. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO Journal*, 2001; 20:5197-206.
17. Epstein AC, Gleadle JM, Mcneill LA et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologues defines a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 2001; 107: 43-54.
18. Bruick RK, Mcnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, 2001; 294: 1337-40.
19. Min JH, Yang H, Ivan M et al. Structure of an HIF 1 α - pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*, 2002; 296:1886-9.
20. Hon WC, Wilson MI, Harlos K et al. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL. *Nature*, 2002; 417:975-8.
21. Hewitson KS, Mcneill LA, Riordan MV et al. HIF asparagine hydroxylase is identical to FIH and is related to cuprin structural family. *J Biol Chem*, 2002; 277:26351-55.
22. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ et al. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of HIF. *Genes Dev*, 2002; 16: 1466-71.
23. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF- α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001; 15:2675-86.
24. Hirsila M, Koivunen P, Gunzler V et al. Characterization of the human prolyl 4 - hydroxylases that modify the HIF. *J Biol Chem*, 2003; 278:30772-80.
25. Koivunen P, Hirila M, Gunzler V et al. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem*, 2004;279:9899-04.

26. Maxwell Ph, Osmond Ph, Pugh Cw et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* 1993;44:1149-62.
27. Goldberg Ma, Glass GA, Cunningham Jm et al. The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 7972-6.
28. Semenza Gl, Neufeldt Mk, Chi Sm et al. Hif nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 5680-4.
29. Pugh Cw, Tan Cc, Jones RW et al. Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 10553-7.
30. Edmunds Me, Devoy M, Tomson Crv et al. Plasma erythropoietin levels and acquired cystic disease of the kidney in patients receiving regular haemodialysis treatment. *Br J Haematol*, 1991; 78: 275-7.
31. Scorte Gagna M, Ding K, Zhanc Q et al. HIF-2 α regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood*, 2005; 105: 3133-40.
32. Brusselmans K, Compernelle T, Tjwa M et al. Heterozygous deficiency of HIF-2 α protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *J Clin Invest*, 2003; 111: 1519-27.
33. Yu Ay, Shimoda La, Iyer Nv et al. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for HIF-1 α . *J Clin Invest*, 1999; 103: 691-6.
34. Maranchie Jk, Zhany. Nox-4 is critical for hypoxia-inducible factor 2-alpha transcriptional activity in von Hippel-Lindau deficient renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 2005; 65:9190-3.
35. William C, Nicholls Lg, Ratcliffe Pj et al. The prolyl hydroxylase enzymes that acts as oxygen sensors regulating destruction of HIF- α . *Adv Enzyme Regul*, 2004; 44: 75-92.
36. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt O, Stengl P et al. Intracellular localization of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci*, 2003; 116: 1319-26.
37. Stolze Ip, Tian Ym, Appelhoff Rj et al. Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF in regulating HIF transcriptional target genes. *J Biol Chem*, 2004; 279: 42719-25.
38. Selak Ma, Armour Sm, Mackenzie Ed et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 2005; 7: 77-85.
39. Pollard Pj, Briere Jj, Alam Na et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF-1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet*. 2005; 14: 2231-9.
40. Isaacs Js, Jung Yj, Mole Dr et al. HIF over expression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer : novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell*, 2005; 8: 143-53.
41. Gustafsson Mv, Zheng X, Pereira T et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*, 2005; 9: 617-28.
42. Vanderkool Jm, Ereciuska M, Silver Ia. Oxygen in mammalian tissue: methods of measurements and affinities of various reactions. *Am J Physiol*, 1991, 260:C1131-50.
43. Ceradini Dj, Kulkarni Ar, Callaghan MJ et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 2004; 10: 858-64.
44. Pugh Cw, Ratcliffe Pj. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*, 2003; 9:677-84.
45. Maxwell Ph, Pugh Cw, Ratcliffe Pj. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 2001;11:293-9.
46. Semenza Gl. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2003; 3: 721-32.
47. Kung Al, Zabudoff Sd, France Ds et al. Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the HIF pathway. *Cancer Cell*, 2004; 6: 33-43.
48. Kasper Lh, Boussouar F, Boyd K et al. Two transactivation mechanisms cooperate for the bulk of HIF-1 responsive gene expression. *Embo J*, 2005; 24: 3846-58.
49. Knowles Hj, Raval Rr, Harris Al et al. Effect of ascorbate on the activity of HIF in cancer cells. *Cancer Res*, 2003;63: 1764-8.
50. Majumder Pk, Febbo Pg, Bikoff R et al. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia thorough regulation of apoptotic and HIF-1 dependent pathways. *Nat Med*, 2004; 10: 594-601.
51. Blouw B, Song H, Tihan T et al. The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell*, 2003; 4: 133-46.
52. Carmeliet P, Dor Y, Herbert J-M et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 1998; 394: 485-90.
53. Nwogu Ji, Geenen D, Bean M et al. Inhibition of collagen synthesis with prolyl 4-hydroxylase inhibitor improves left ventricular function and alters the pattern of left ventricular dilatation after myocardial infarction. *Circulation*, 2001; 104: 2216-21.
54. Günzler W, Muthukrishnan E, Neumayer E et al. FG-2216 increases hemoglobin concentration in anemic patients with chronic kidney disease (CKD). *J Am Soc Nephrol*, 2005; 66: 396-401.

CORRESPONDENCIA

Patrick Wagner Grau
 pwagner2310@yahoo.es