

FUNCIONES IMPORTANTES DE LA PROTEÍNA VHL EN LAS DIFERENTES ENFERMEDADES CRÓNICAS DEGENERATIVAS

Por JUAN CARLOS; MARIO EUGENIO CANCINO DIAZ; CANCINO DIAZ

FUNCIONES IMPORTANTES DE LA PROTEÍNA VHL EN LAS DIFERENTES ENFERMEDADES CRÓNICAS DEGENERATIVAS



DR. JUAN CARLOS CANCINO DIAZ

DR. MARIO EUGENIO CANCINO DIAZ

FUNCIONES IMPORTANTES DE LA PROTEÍNA VHL EN LAS DIFERENTES ENFERMEDADES CRÓNICAS DEGENERATIVAS

DR. JUAN CARLOS CANCINO DIAZ

Profesor-investigador del ⁵Departamento de Microbiología,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico
Nacional.

DR. MARIO EUGENIO CANCINO DIAZ

Profesor-investigador del Departamento de Inmunología,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico
Nacional.

El libro es parte del proyecto SIP-IPN claves 2025xxx, 2025xxx.

Capítulo I

Sistemas de degradación de proteínas

1. Degradación de proteínas en la célula

Todos los organismos están conformados por células, y éstas se agrupan dependiendo de sus características funcionales para formar tejidos y estos tejidos llegan a formar los órganos. Las células como la unidad funcional del organismo tienen una función interna y una comunicación externa con la finalidad de que el órgano o tejido desarrolle sus actividades normales. Una célula necesita de elementos nutricionales con dos finalidades, una para obtener energía, y la otra para la síntesis de macromoléculas. La síntesis de macromoléculas es un proceso con alta demanda energética y tiene que realizar a la perfección (sin errores) para tener una buena función celular. Una de estas macromoléculas son las proteínas, estas proteínas realizan principalmente dos funciones en la célula, una de tipo estructural y la otra de tipo enzimática.

La síntesis de proteínas se lleva a cabo por el flujo de la información genética (transcripción del gen y traducción), utilizando como base los bloques de monómeros llamados aminoácidos. Los aminoácidos se van agregando conforme a la información del gen codificante de la proteína hasta llegar a la formación final de ésta. La proteína para ser funcional tiene que plegarse mediante las interacciones de los aminoácidos lo cual genera una conformación espacial de estructura y función. Aunque el proceso de síntesis de proteínas es en gran medida exitoso, existen eventos donde las proteínas tienen errores en su plegamiento y por lo tanto pierden su función. Estas proteínas no funcionales o defectuosas tienen que ser desechadas, ya que, si esto no ocurre, las proteínas no funcionales pueden autoagregarse y acumularse dentro de la célula y provocar un efecto tóxico en la célula que puede llegar a perder su función.

Cuando la síntesis y plegamiento proteico llega a ser exitoso, la proteína realice su función normal en la célula. Sin embargo, todas las proteínas tienen una vida media, el cual tienen una caducidad o también están reguladas por un proceso metabólico, en esta situación las proteínas son degradadas para ser reemplazada por nuevas proteínas. La caducidad de las proteínas es un campo de estudio muy complejo de entender, al parecer

este enigma está dentro de su propia secuencia de aminoácidos que determina su tiempo de funcionalidad.

La célula posee mecanismos que conducen a la eliminación específica y precisa de aquellas proteínas alteradas o caducas. Uno de estos mecanismos es el proceso de degradación proteica y que se lleva a cabo mediante señales externas o internas que recibe una célula. Una señal interna es la concentración citoplásmica de aminoácidos en la célula, una baja cantidad de aminoácidos en el citoplasma alerta a la necesidad de obtener estos compuestos y una manera de aumentar la cantidad de ellos es a partir de la degradación de proteínas caducas o no funcionales. Las señales externas pueden ser por cambios ambientales que sufre una célula, por ejemplo, niveles altos de oxígeno, de temperatura, etc. Estas señales internas o externas conducen al encendido de procesos celulares para decidir que proteínas serán degradadas. Estos procesos que traducen las señales conducen a las proteínas a ser marcadas para iniciar su proceso de degradación. En la célula se conocen dos procesos de degradación proteica, una es la ubiquitinación de proteínas y la otra es la autofagia. La ubiquitinación es un proceso donde las proteínas son marcadas mediante la adición de unidades de ubiquitina que posteriormente las proteínas ubiquitinadas son degradadas por el proteasoma, sin embargo, hay reportes que indican que la proteína ubiquitinada también puede ser degradada por la autofagia.

En este capítulo se describirá el mecanismo e importancia de los dos sistemas de degradación proteica de una célula.

1.1. Marcaje de proteínas por ubiquitina

Como ya se mencionó, una célula puede estar expuesta a señales o cambios ambientales que puede perjudicar la biología de ésta, estos cambios no adecuados y en tiempos prolongados pueden ocasionar un estado de estrés celular. Las señales ambientales que producen estrés celular pueden ser la temperatura (frio o calor), la presencia de agentes oxidantes, el bajo nivel de oxígeno (hipoxia) y agentes que dañan a las proteínas y al DNA. En el caso de las proteínas, las condiciones estresantes pueden alterar el plegamiento proteico e inducir la acumulación de estas proteínas desplegadas. La célula en condiciones de estrés activa mecanismos de respuesta hacia las proteínas desplegadas que corresponden al sistema ubiquitina proteasoma o la autofagia (1, 2).

En particular, la ubiquitina, que participa en el sistema ubiquitina proteasoma, es una molécula que se une a las proteínas para marcarlas y llevarlas a su degradación. Las proteínas marcadas por la ubiquitina son aquellas que pierden su plegamiento o aquellas proteínas caducas o proteínas claves en procesos regulados y este marcaje es reconocido

por el complejo proteasoma o el lisosoma para efectuar la degradación de ellas (3). La ubiquitina no solamente juega un papel en la respuesta a las proteínas sin plegamiento, también participa en la activación de la respuesta de estrés celular o en condiciones de inanición y las proteínas ubiquitinadas son dirigidas al proceso de autofagia o al proteasoma. Ambos sistemas ubiquitina proteasoma y autofagia son dos sistemas independientes en el control de la calidad de las proteínas de una célula, sin embargo, estos dos sistemas pueden conectarse en ciertas condiciones.

1.2. Ubiquitina

La ubiquitina es una molécula de naturaleza proteica conformada de 76 aminoácidos, es altamente conservada en todos los organismos y está presente en todas las células eucariontes. La molécula de ubiquitina es muy estable y resistente, ya que no cambia su estructura cuando la célula está expuesta a un estrés por ácido o por un choque térmico. Estas dos propiedades de la ubiquitina hacen conferirle un papel importante en la defensa celular contra la acumulación anormal de proteínas causadas por estrés. Otra de las propiedades de la ubiquitina es que tiene la capacidad de polimerizarse con varias unidades de ubiquitina, este proceso se lleva a cabo cuando la ubiquitina se une a una proteína diana o blanco. Esta polimerización puede ser de una estructura lineal o de forma ramificada (**Figura 1A**).

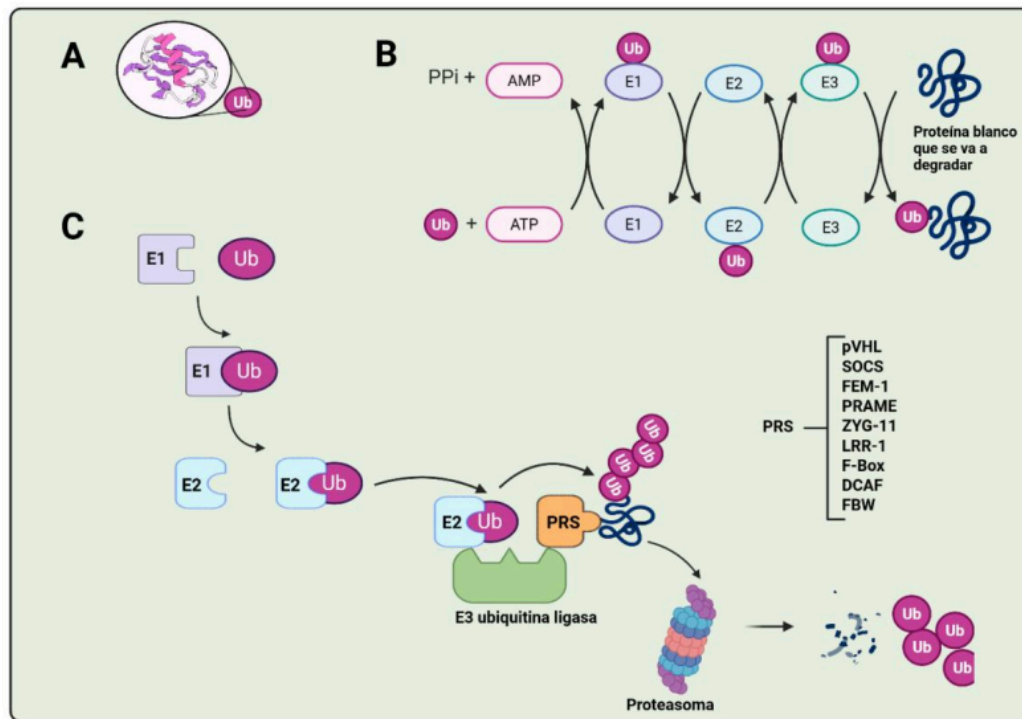


Figura 1. Esquema general de degradación de proteínas por la vía del sistema ubiquitina proteasoma. **A)** La ubiquitina (Ub) es una proteína de 76 aminoácidos que se une a las proteínas que se van a degradar para marcarlas y llevarlas al proteasoma. El proteasoma reconoce las proteínas ubiquitinadas. **B)** Las reacciones bioquímicas del sistema ubiquitina proteasoma. La Ub es activada por el ATP y ésta se une a la enzima E1. Posteriormente, la E1-Ub transfiere la Ub a la enzima E2, el cual transfiere la Ub al complejo E3 ubiquitina ligasa para que finalmente esta enzima marque a las proteínas blanco con Ub. **C)** La cascada de eventos del sistema ubiquitina proteasoma. La Ub activada se une al sitio catalítico de la enzima E1(al residuo de cisteína), la E2 tiene una cisteína como sitio catalítico por el cual recibe la Ub proveniente de la E1. La E2-Ub se une al complejo de E3 ubiquitina ligasa. El complejo E3 ubiquitina ligasa está conformado por una proteína que funciona como plataforma, que en uno de sus extremos se une la E2-Ub y en el otro extremo se une la proteína receptora de sustrato (PRS). La PRS reconoce específicamente a la proteína blanco para incorporarla al complejo E3 ubiquitina ligasa, en este momento la E2-Ub transfiere la Ub a la proteína blanco que está unido a la PRS para ubiquitinarla. La PRS puede ser una gran variedad de proteínas, en la imagen se indican algunas. La proteína blanco marcada con Ub es liberado del complejo E3 ubiquitina ligasa para posteriormente ser reconocida por el proteasoma y ser degradada y liberar las unidades de Ub.

La síntesis de la ubiquitina es mediante la expresión y traducción de los genes codificantes de ubiquitina. Existen cuatro genes codificantes de ubiquitina: *UbC*, *UbB*, *UbA52* y *UbA80*. La síntesis de la ubiquitina por estos cuatro genes es uno de los casos particulares ya que los genes *UbA52* y *UbA80* transcriben y traducen la ubiquitina, pero unida con proteínas ribosomales y en el caso de los genes *UbC* y *UbB* transcriben y traducen una cadena de ubiquitinas unidas entre si denominado poliubiquitina. Para los genes *UbA52* y *UbA80* producen las proteínas Ubitquitina-L52 y ubiquitina-L80 (ubiquitina fusionada a proteínas ribosomales) respectivamente, posteriormente estas proteínas fusionadas son procesadas postraduccionalmente por enzimas ubiquitinastas específicas para liberar la ubiquitina. En el caso de los genes *UbC* y *UbB*, el gen *UbB* codifica una poliproteína que contiene cuatro ubiquitinas unidas (poliubiquitina) y para el caso del gen *UbC* produce una poliproteína con nueve ubiquitinas unidas (poliubiquitina) (2). Estas poliubiquitinas son procesadas por ubiquitinas para liberar unidades de ubiquitinas. Estos genes son transcritos en condiciones normales o en condiciones de estrés, por ejemplo, en condiciones normales los cuatro genes se transcriben y se traducen. En condiciones de estrés celular (como estrés oxidativo, choque térmico, estrés proteo-tóxico), los genes *UbC* y *UbB* son sobre expresados para la producción de poliubiquitinas y el procesamiento proteolítico de ellas para producir altos niveles de ubiquitina en la célula (4). En condiciones de estrés, la expresión de los genes *UbC* y *UbB* están regulados por los factores de transcripción NF-E2 1(NRF1), NRF2, SP1 y el factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF1).

Algunos estudios han mostrado que ratones “konck-out” (eliminación del gen en el cromosoma) en el gene *UbC* mueren a los 12.5-14.5 días durante el periodo de vida embrionaria, además de presentar algunos defectos en el hígado. Los fibroblastos de origen embrionario de ratón “knock-out” en el gen *UbC* muestran un crecimiento muy lento, senescencia prematura, incremento de apoptosis, progresión del ciclo celular retardada y niveles bajos de la homeostasis de la ubiquitina. Esto demuestra que la homeostasis de la poza de ubiquitina en una célula es importante para la sobrevivencia, especialmente bajo condiciones severas de estrés (5).

2. El sistema ubiquitina proteasoma

La célula no permite mantener a las proteínas sin plegamiento ya que pueden acumularse y generar efectos tóxicos, por tal motivo deben ser eliminadas de forma específica y eficiente. Las células eucariontes han desarrollado un mecanismo de control de calidad proteica para reconocer y procesar estas proteínas; uno de ellos es el sistema de ubiquitina proteasoma. Este sistema consiste en la degradación de proteínas

independientes del lisosoma y dependiente de ATP donde participa el complejo 26s proteasoma. La degradación de proteínas vía sistema ubiquitina proteasoma es un proceso de varios pasos donde tres enzimas ubiquitininasas y el 26s proteasoma son los elementos importantes. Existen tres tipos de enzimas ubiquitininasas, que incluyen la enzima activante de ubiquitina E1, la enzima conjugante de ubiquitina E2, y la E3 ubiquitina ligasa (**Figura 1B**). La E3 ubiquitina ligasa es un complejo proteico que determina la especificidad del sustrato o proteína blanco que se va a degradar. La E3 ubiquitina ligasa es diversa y existe alrededor de 600 tipos de esta enzima y por características bioquímicas y diferencias estructurales, la E3 ubiquitina ligasa se ha dividido en el tipo HECT, el tipo "RING-finger", el tipo "U-box" (por sus siglas en inglés) y el tipo RING-IBR-RING.

El proceso del sistema ubiquitina proteasoma inicia cuando la unidad de ubiquitina libre se une covalentemente a una proteína diana o blanco a través de las enzimas ubiquitininas; por lo regular la ubiquitina unida a la proteína blanco se polimeriza uniéndose más unidades de ubiquitina formando una cadena y la formación de esta cadena típicamente específica a la proteína blanco para su degradación rápida vía el 26s proteasoma. El proceso de transferencia de ubiquitina a la proteína blanco no es directo se requiere tres pasos para este evento. El primer paso es la activación de la ubiquitina y esto es llevado a cabo por la enzima activante E1. Posteriormente, la ubiquitina activada, por la E1, es transferida a la enzima conjugante-ubiquitina E2, que estará lista para adicionar esta ubiquitina a la proteína blanco (**Figura 1C**). La especificidad de este proceso lo lleva a cabo el complejo proteico de E3 ubiquitina ligasa, que de forma general está constituido por una proteína que sirve de plataforma que une en uno de sus extremos a la enzima conjugante-ubiquitina E2 con la ubiquitina activada y en el otro extremo une a la proteína receptora del sustrato. La proteína receptora del sustrato es la que reconoce a la proteína blanco y lo recluta al complejo E3 ubiquitina ligasa para adicionar la ubiquitina desde la enzima E2.

La primera ubiquitina que se agregar a la proteína blanco es eventualmente por la vía de unión isopéptido entre el aminoácido glicina C-terminal de la ubiquitina y el aminoácido lisina de la proteína blanco. Posteriormente, existen una transferencia repetida de moléculas de ubiquitina adicionales hacia la previamente ubiquitina conjugada generando de esta manera una cadena de poliubiquitinas. Una cadena conformada de al menos cuatro monómeros de ubiquitina es la señal adecuada para ser reconocida por el 26s proteasoma donde la proteína blanco es rápidamente degradado a péptidos cortos. La especificidad de la proteólisis es dependiente del complejo E3 ubiquitina ligasa, este complejo reconoce la proteína blanco a través de un dominio de interacción entre estos dos componentes (proteína blanco y el complejo). Este dominio de interacción es llamado

“degron” y consiste en una secuencia primaria corta de la proteína blanco, en el cual este “degron” puede sufrir modificaciones que dependen del estado de la célula (6).

Otro mecanismo del cuidado del plegamiento de las proteínas y acumulación de ellas es la chaperona. La chaperona promueve el plegamiento de nuevos péptidos sintetizados y también puede realizar el re-plegamiento de las proteínas que han perdido su conformación, esto con la finalidad de inhibir la auto-agregación de proteínas (7). Sin embargo, cuando las proteínas sin plegamiento no pueden llegar a estabilizar su plegamiento por medio de las chaperonas, estas proteínas deben ser identificadas y degradadas a través del sistema ubiquitina proteasoma. Primeramente, la proteína sin plegamiento es reconocida por la chaperona, tales como Hsp70 y Hsp90, y si la chaperona no logra restablecer la conformación adecuada, entonces esta proteína en conjunto con la chaperona son reconocidas como un intento fallido de la estabilidad proteica y por lo tanto son ubiquitinadas por la acción del complejo E3 ubiquitina ligasa; estas E3 ubiquitina ligasas que llevan a cabo esta función particular de degradación son: STIP1, “U-Box containing protein” 1 (CHIP) y “BAG cochaperone” 1 (BAG1).

3. Autofagia

La autofagia puede también remover los agregados de proteínas sin plegamiento para proteger la célula de los efectos tóxicos de esta acumulación proteica, por otro lado, la autofagia tiene la función de eliminar organelos dañados o caducos para su posterior renovación. La autofagia inicialmente se pensaba que degradaba tanto proteínas como organelos de forma no selectiva, se creía que este proceso tenía la función del reciclamiento de nutrientes y producción de energía cuando una célula está en condiciones desfavorables. Estudios más recientes han mostrado que la autofagia puede ser selectiva para eliminar los agregados proteicos. El proceso de autofagia es complejo y participan una gran cantidad de proteínas autofágicas que forman complejos proteicos, es por lo tanto que el estudio de la autofagia se divide, usualmente, en cuatro estados: la inducción, la nucleación, el alargamiento y por último la fusión con los lisosomas (**Figura 2**).

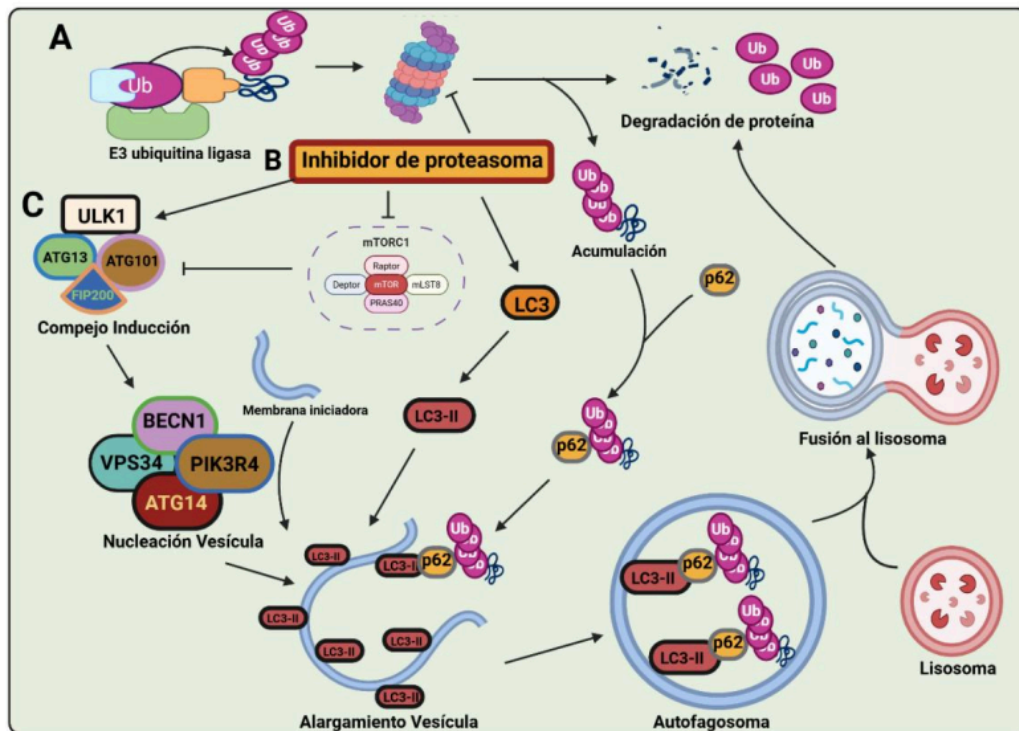


Figura 2. El proceso de autofagia vinculado con el sistema ubiquitina proteasoma. (A) La proteína blanco ubiquitinada (Ub) por el sistema de ubiquitina proteasoma puede ser degradada por el proteasoma. Cuando el proteasoma no funciona debido a la presencia de un inhibidor de proteasoma en la célula, la proteína blanco-Ub se acumula en la célula y puede producir efectos tóxicos (B). En estas circunstancias, el inhibidor de proteasoma induce la activación de la autofagia para la degradación de la proteína blanco-Ub (C). El inhibidor del proteasoma inactiva al complejo mTORC1 para encender el complejo de inducción y proceder con los pasos siguientes de la autofagia. El inhibidor de proteasoma activa la proteína LC3 que participa en el alargamiento de la vesícula. La proteína de carga p62 es la responsable de reconocer la proteína blanco-Ub acumulada y llevarlo a la vesícula para la degradación por el lisosoma.

La inducción de la autofagia se inicia por una señal autofágica que usualmente proviene desde una variedad de condiciones de estrés celular, tales como inanición, hipoxia, estrés oxidativo y agregación proteica. Estas señales de estrés celular provocan que exista el reclutamiento de las proteínas autofágicas de iniciación ULK1, ATG13, ATG101 y FIP200 para formar el complejo ULK1 (8). En realidad, la señal de estrés celular no es directa sobre el complejo ULK1, esta señal de estrés recae sobre otro complejo proteico llamado mTORC1 (formado por las proteínas mTOR, Raptor, Deptor, PRAS40, mLST8); este complejo es un regulador clave de la autofagia, ya que actúa como un receptor del nivel de

energía y nutrición de la célula. En condiciones de inanición (baja energía y nutrientes), la actividad del complejo mTORC1 es inhibida (8) y esto provoca la fosforilación de la proteína autofágica ATG13 (un componente del complejo ULK1) y esta fosforilación activa el complejo ULK1. Por lo tanto, se puede decir que la autofagia es inducida por la inactivación del complejo mTORC1, el cual éste controla negativamente al complejo ULK1.

La actividad de ULK1 es también regulado por la proteína “5-AMP-activated protein kinase” (AMPK) (9). El AMPK puede fosforilar a la proteína ULK1 y el ULK1 fosforilado puede fosforilar a la proteína Raptor, resultando en un decremento en la unión de Raptor al complejo mTORC1 y una disminución en la actividad de mTORC1. Además, AMPK puede también fosforilar directamente a Raptor (10).

Subsecuentemente, el complejo ULK1 puede fosforilar a la proteína autofágica BECN1, esta proteína fosforilada promueve el reclutamiento de las proteínas PIK3R4, ATG14 y VPS34 para formar el complejo PI3K. El complejo PI3K sintetiza la formación de vesículas autofágicas pequeñas en el retículo endoplásmico celular, generando el estado de nucleación de la autofagia. Esta vesícula autofágica se incrementa su tamaño o alargamiento de ella, este proceso es llevado a cabo por dos tipos de sistemas que se conectan y son de tipo ubiquitina. El primer sistema es un tipo E3 ubiquitina ligasa y para la formación de ésta, la proteína ATG16L1 se une con las proteínas ATG12-ATG5 para llegar a formar el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 activo tipo E3 ubiquitina ligasa. En el segundo sistema la proteína LC3 es activada por un proceso tipo parecido a la ubiquitinación, la activación de LC3 consiste en unir un fosfolípido de una manera muy similar al proceso de ubiquitinación proteica en donde participan enzimas tipo E1, E2 y E3 pero que en vez de ubiquitinar lo que hacen estas enzimas es adicionar un fosfolípido a la proteína blanco LC3. Este sistema inicia primeramente por la hidrólisis de la proteína inactiva pro-LC3 para formar la proteína LC3-I, esta hidrólisis es llevado a cabo por la proteína ATG4B con la finalidad de exponer la glicina C-terminal de LC3. La LC3-I se combina con el fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE) para formar LC3-PE (LC3-II), esta unión del fosfolípido está bajo la catálisis de las proteínas ATG7 tipo E1, la ATG3 tipo E2 y el complejo ATG16L1-ATG5-ATG12 tipo E3 (11). La LC3-II se ancla a la vesícula pequeña autofágica inicial y promueve la extensión o alargamiento de esta vesícula mediante el reclutamiento de estructuras membranales (fosfolípidos y proteínas), esta extensión de la vesícula autofágica envuelve o introduce substratos selectivos (agregados proteicos u organelos dañados) que llegan a formar el autofagosoma. En el estado maduro de la autofagia, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma bajo la acción de las proteínas GTPase Rab7 y “Synaptosomal-Associated Protein (SNAP) receptor Syntaxin 17” para formar el autofagolisosoma. Finalmente, los agregados proteicos y organelos dañados son degradados por las proteasas lisosomales y enviadas al citoplasma para el reuso celular (12).

3.1. Receptores de carga del autofagosoma

El autofagosoma integra compuestos que van a ser degradados por la vía del lisosoma, por lo regular estos compuestos son organelos dañados o restos celulares, sin embargo, el autofagosoma puede ingresar a proteínas agregadas. Se ha demostrado que el proceso de ingresar proteínas al autofagosoma es selectivo y la manera de selección es por las proteínas agregadas marcadas con ubiquitina (Figura 2). La ruta por la cual las proteínas agregadas ubiquitinadas son ingresadas al autofagosoma es por la presencia de proteínas que funcionan como receptores de carga del autofagosoma. Estos receptores de carga reconocen de forma específica a las proteínas agregadas ubiquitinadas. Los receptores de carga que se conocen actualmente son el p62, NBR1, optineurina (OPTN), "Toll Interacting Protein" (TOLLIP) y TAXBP1 (13).

El mecanismo es el siguiente, los receptores de carga están en el citoplasma celular y reconocen las proteínas agregadas ubiquitinadas y se unen a ellas, posteriormente la proteína agregada ubiquitinada unida al receptor de carga es transportada al autofagosoma y el receptor de carga transfiere a la proteína ubiquitinada a la proteína LC3 que está presente en el autofagosoma. La p62 es la más estudiada y esta proteína puede reconocer la ubiquitina o cadenas de poli-ubiquitinas unida a la proteína blanco a través de su "ubiquitin-associated domain" (UBA) y transfiere la proteína blanco hacia el autofagosoma a través de su dominio "LC3-interacting region" (LIR) y el dominio PB1, por lo tanto, p62 se queda en el autofagosoma y es degradado en el lisosoma junto con la proteína blanco. El nivel intracelular de p62 depende sobre la regulación transcripcional y la degradación de autofagia. La transcripción de p62 está regulada por NRF2, vía ras/MAPK, vía JNK/c-Jun.

3.2. Autofagia mediada por chaperona.

La autofagia mediada por chaperona es otro tipo de autofagia que degrada proteínas citoplásmicas en el lisosoma. La chaperona Hsp70 forma complejos con Hsp40, Hip, Hop y Hsp90 con la finalidad de reconocer y unirse a la proteína blanco y este reconocimiento del complejo chaperona es por una secuencia tipo KFERQ presente en la proteína blanco (14). De esta manera las proteínas sin plegamiento interactúan con el complejo chaperón y son transferidos hacia la cavidad del lisosoma por unión con la proteína "Lysosome-Associated Membrane Protein type-2A" (LAMP-2A). Así, LAMP-2A es un factor limitante para la autofagia mediada por chaperona. Después de entrar al lisosoma, la proteína blanco es

rápida­mente degradada por las proteasas lisosomales y el complejo chaperona es liberado desde la membrana lisosomal.

4. Intercomunicación entre Sistema ubiquitina proteasoma y autofagia

El sistema ubiquitina proteasoma y autofagia son los dos caminos más utilizados por la célula para la degradación de proteínas. Estudios han mostrado una relación coordinada y complementaria entre estos dos sistemas. Por ejemplo, se ha observado que, durante el estrés en el retículo endoplásmico, el sistema ubiquitina proteasoma regula la autofagia en rutas diferentes. Una de ellas, la señal del sistema ubiquitina proteasoma puede regular la autofagia por la regulación de la actividad de AKT, mTORC1 y AMPK (inhibidores y activadores de la autofagia) (15). Además, el sistema ubiquitina proteasoma puede también regular la transcripción de proteínas claves en la autofagia, por ejemplo, el estrés en el retículo endoplásmico inducido por hipoxia puede inducir la sobre regulación de LC3 y ARG5 (16), o la degradación de Raptor por la vía de la proteína von Hippel-Lindau (VHL).

Existen eventos celulares donde el proteasoma se inhibe y esto puede causar que las proteínas sin plegamiento lleguen a un estado de agregación entre ellas, el cual puede conducir a citotoxicidad. En estas ocasiones la vía de autofagia es el mecanismo compensatorio para la degradación de los agregados proteicos ubiquitinados (**Figura 2**). El proteasoma inhibido también puede activar la autofagia y este proceso es a través del eje IRE/JNK/Bcl2/BECN1 (17). El IRE1 activado puede también reclutar TRAF2, resultando en la fosforilación de JNK y expresión de genes que participan en la autofagia. El proteasoma inhibido también puede incrementar la expresión de genes relacionados a la autofagia, tales como LC3, ATG5 y ATG7 (que participan en el paso de alargamiento de la vesícula; 18). El proteasoma inhibido destruye la interacción proteína-proteína entre Raptor, uno de los componentes estructurales de mTORC1, de esta manera se inhibe la actividad de este complejo por lo tanto se inicia la autofagia (19).

Por otro lado, p62 es otro importante puente entre el sistema ubiquitina proteasoma y autofagia (**Figura 2**). Existen evidencias que muestran que los inhibidores del proteasoma y el estado de inanición celular pueden promover la síntesis de p62 y reducir el estrés tóxico causado por la agregación proteica. Cuando el sistema del proteasoma es inhibido, la E3 ubiquitina ligasa TRIM50 co-localiza con p62, HDAC6 y con los agregados de proteínas ubiquitinadas, esto indica que la maquinaria autofágica reconoce a los agregados y los elimina (20). Bajo condiciones de estrés celular, el complejo ULK1 puede fosforilar a p62 para incrementar la afinidad de p62 a las proteínas ubiquitinadas y conducir la degradación efectiva de las proteínas agregadas. Con respecto a HDAC6, esta proteína

interactúa con las proteínas poli-ubiquitinadas y las transporta hacia los autofagosomas (21); ya que HDAC6 está involucrada en la fusión del autofagosoma con el lisosoma.

Por último, los dos sistemas de degradación de proteínas descritos en este capítulo muestran la importancia para el mantenimiento adecuado de las proteínas y su función, ya que la falta de eliminación de las proteínas en una célula puede provocar efectos de acumulación de ellas y pérdida de la función celular.

Referencias

1. Song S, Tan J, Miao Y, et al. Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery. *J Cell Physiol.* 2018; 233:3867–3874.
2. Qu J, Zou T, Lin Z. The Roles of the Ubiquitin–Proteasome System in the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *Int J Mol Sci.* 2021; 22:1526.
3. Reiss Y, Gur E, Ravid T. Releasing the Lockdown: An Emerging Role for the Ubiquitin-Proteasome System in the Breakdown of Transient Protein Inclusions. *Biomolecules* 2020; 10:1168.
4. Kubota H. Quality Control against Misfolded Proteins in the Cytosol: A Network for Cell Survival. *J Biochem.* 2009; 146:609–616.
5. Ryu KY, Maehr R, Gilchrist CA, et al. The mouse polyubiquitin gene UbC is essential for fetal liver development, cell-cycle progression and stress tolerance. *EMBO J.* 2007; 26:2693–2706.
6. Orlowski RZ. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999; 6:303-13.
7. Höhfeld J, Cyr DM, Patterson C. From the cradle to the grave: Molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep.* 2001; 2:885–890.
8. Puissant A, Fenouille N, Auberger P. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res.* 2012; 2:397–413.
9. Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011; 13:132–141.
10. Shang L, Chen S, Du F, et al. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108:4788–4793.
11. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer.* 2020; 19:1–16.

12. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018; 19:349–364.
13. Puissant A, Fenouille N, Auberger P. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res.* 2012; 2:397–413.
14. Nie T, Tao K, Zhu L, et al. Chaperone-mediated autophagy controls the turnover of E3 ubiquitin ligase MARCF5 and regulates mitochondrial dynamics. *Autophagy.* 2021; 17:2923–2938.
15. Song S, Tan J, Miao Y, et al. Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery. *J Cell Physiol.* 2018; 233:3867–3874.
16. Rouschop KM, Beucken TVD, Dubois L, et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest.* 2010; 120:120–127.
17. Ding WX, Ni HM, Gao W, et al. Linking of Autophagy to Ubiquitin-Proteasome System Is Important for the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Viability. *Am J Pathol.* 2007; 171:513–524.
18. Milani M, Rzymiski T, Mellor HR, et al. The Role of ATF4 Stabilization and Autophagy in Resistance of Breast Cancer Cells Treated with Bortezomib. *Cancer Res.* 2009; 69:4415–4423.
19. Wu WKK, Wu YC, Yu L, et al. Induction of autophagy by proteasome inhibitor is associated with proliferative arrest in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 2:258–263.
20. Fusco C, Micale L, Egorov M, et al. The E3-ubiquitin ligase TRIM50 interacts with HDAC6 and p62, and promotes the sequestration and clearance of ubiquitinated proteins into the aggresome. *PLoS ONE.* 2012; 7: e40440.
21. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, et al. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell.* 2003; 115:727–738.

Capítulo II

La E3 ubiquitina ligasa Culina-2-elonginaBC-VHL

1. Sistema de ubiquitinación

La modificación de las proteínas por ubiquitinación es un proceso muy análogo a la fosforilación de proteínas, donde la proteína se fosforila y se desfosforila, en este caso las

proteínas se ubiquitinan de forma específica y este evento es reversible por las enzimas desubiquitininas. Sin embargo, una de las diferencias de la ubiquitinación es que puede generar patrones diferentes de ubiquitinación (diferentes cadenas de ubiquitinación) y estos patrones pueden reconocer a una proteína específica para su degradación o activación. La ligazón covalente de las moléculas de ubiquitina hacia las proteínas blanco no solamente causa su eliminación por el proteasoma, esta ubiquitinación también puede provocar un cambio en la actividad de la proteína, o puede ayudar en la localización proteica, o en la afinidad a la unión con otras proteínas, o la ubiquitinación también puede servir para otros eventos no proteolíticos. La diversidad de funciones que tiene la ubiquitinación proteica enfatiza la importancia del sistema de ubiquitina en las células.

El proceso de ubiquitinación es llevado a cabo por tres enzimas: E1, activa la ubiquitina; la E2 es la enzima que conjuga la ubiquitina con la proteína blanco; y la E3 es un complejo proteico que tiene la acción de ubiquitina ligasa. Actualmente se conoce una diversidad en las tres enzimas y se ha reportado que el genoma humano tiene genes que codifica a dos enzimas E1, aproximadamente 38 genes para las enzimas E2s, y más de 600 genes para las enzimas/complejos E3s. La gran cantidad de enzimas/complejos E3s indica que éstas son claves para las diversas funciones de la ubiquitinación. La E3 es la responsable de diversos patrones de ubiquitinación en una célula. En este capítulo abordaremos el sistema de ubiquitinación y el sistema E3 ubiquitina ligasa de la proteína von Hippel Lindau (pVHL), debido al enfoque de este libro.

2. Cadenas de ubiquitinación

La molécula de ubiquitina en su secuencia aminoacídica tiene ocho residuos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 y K76), y en estos residuos de lisina se puede adicionar otras unidades de ubiquitinas para conformar una cadena que puede ser lineal o ramificada; otro sitio de ubiquitinación en esta proteína es el grupo amino N-terminal de la primera metionina (enlace M1). Estos sitios de ubiquitinación pueden generar incontables posibilidades para ensamblar un polímero de ubiquitina. Con respecto a las proteínas blanco, éstas pueden ser ubiquitinadas en uno o múltiples residuos de lisina (K) con una sola molécula de ubiquitina (monoubiquitinación) o con una sola molécula de ubiquitina pero en varios sitios de lisina de la proteína blanco (multi-monoubiquitinación), o también puede formar una cadena de ubiquitinas como un polímero (poliubiquitinación)(1) (**Figura 1**).

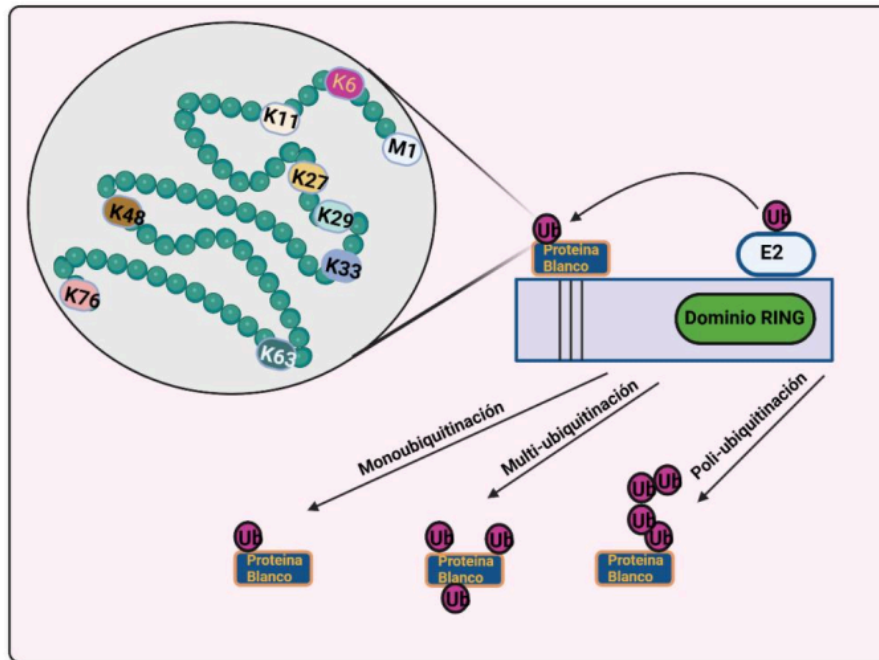


Figura 1. Diferentes sitios y formas de ubiquitinación. La ubiquitina (Ub) tiene 9 sitios posibles de ubiquitinación, ocho corresponden a los residuos de lisina (K) que están en diferentes posiciones de la secuencia de aminoácidos de la Ub y uno corresponde al aminoácido metionina en la posición 1 (M1). En el complejo de la E3 ubiquitina ligasa, la proteína blanco es ubiquitinada por la transferencia de la Ub desde la E2-Ub. Este proceso de ubiquitinación en el complejo E3 ubiquitina ligasa puede ser de un solo evento para generar una mono-ubiquitinación o de varios eventos que puede producir una multi-ubiquitinación donde la Ub se une en diferentes posiciones de la proteína blanco o en un solo sitio de la proteína blanco pero formando una cadena de poli-ubiquitinación.

Con respecto a la poli-ubiquitinación, las cadenas de ubiquitina que comparten solamente un tipo de unión o enlace entre las unidades de ubiquitina (por ejemplo unión tipo K48) son llamadas homotípicas. En contraste, las cadenas heterotípicas contienen mezclas de uniones de enlace dentro del mismo polímero (por ejemplo, unión tipo K48 y K27). Las cadenas heterotípicas pueden también ser ramificadas, es decir una molécula de ubiquitina es ubiquitinada en dos o mas sitios de lisina (2). Como se dijo arriba, la ubiquitinación es una modificación reversible, y una unión entre moléculas de ubiquitina o ubiquitina y proteína blanco son hidrolizadas por enzimas desubiquitinantes (3). Además se sabe que, las moléculas de ubiquitina pueden sufrir modificaciones post-traduccionales como la acetilación, la fosforilación y la sumoilación (4).

Un análisis de proteómica logró identificar que los siete tipos de enlace (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) entre las ubiquitinas están presente en la célula y éstas realizan funciones diferentes. Por ejemplo, la cadena de ubiquitina homotípica con K48 es la más predominante en la célula y tiene la función de llevar la proteína blanco hacia el proteasoma. La segunda cadena de ubiquitina abundante en la célula es aquella con enlaces homotípicos K63, y ésta tiene varias funciones no degradativas, participa en la vía endocítica, en la regulación de la activación de cinasas, en la vía de señalización del NF- κ B, en la inmunidad inata y en el tráfico de proteínas (6). Las cadenas de ubiquitina con enlace K6 están relacionadas con la respuesta de daño del DNA, así como también en la mitofagia media por la proteína Parkina. La cadena con enlace K11 esta relacionada con el control del ciclo celular de células humanas. La cadena con enlace K27 en la translocación nuclear de proteínas y respuesta de daño al DNA. El enlace K29 está asociada en la degradación por fusión con ubiquitina y en el señalamiento de la ruta Wnt/beta-catenina. El K33 en la señalización del receptor TCR de linfocitos, en el tráfico del post-Golgi y la señalización de la cinasa relacionada al AMPK. Por último, el enlace M1 en la inmunidad innata, en la señalización del NF- κ B, en la angiogénesis y en la autofagia selectiva (1).

3. La enzima E1

La E1 es la enzima que inicia la ubiquitinación. E1 activa la ubiquitina libre en el citoplasma de la célula y esta activación se lleva acabo en dos pasos. En el primer paso, la enzima E1 adiciona una molécula de adenina en el sito carboxilo-terminal (C-terminal) de la ubiquitina. El segundo paso es la formación de un enlace tioester entre el C-terminal de la ubiquitina y la cisteina catalítica de la enzima E1. Después de esto, el intermediario E1-ubiquitina recluta la enzima E2 y transfiere el tioester de la ubiquitina desde el E1 hacia la cisteina catalítica de la enzima E2.

Por otro lado, existen otras moléculas parecidas a la ubiquitina (Ubls) pero con funciones diferentes, que no hableremos en este libro; se menciona alrededor de 16 Ubls y éstas también pueden ser activadas por las enzimas E1s. Por lo tanto, las enzimas E1 son consideradas como el primer guardián de la cascada de ubiquitinación.

4. La enzima E2

La familia de enzimas E2 comprende 40 genes en el humano. Las E2s de humano son clasificadas dentro de 17 subfamilias con base a un análisis filogenético. Las E2s tienen un dominio de conjugación de ubiquitina central que aborda el residuo catalítico de la cisteina. Este dominio consiste de cuatro helices y una hoja antiparalela que abarca cuatro

cadena. E2s son altamente homologas en su secuencia y tienen una estructura muy conservada en el cual el residuo catalítico de cisteína está localizado sobre el surco que se forma entre un corto “loop” de las hélices 2 y 3. La enzima E1 interactúa con la hélice 1 de la enzima E2, y la enzima E3 interactúa con el “loop” 1 y “loop” 2 de la enzima E2s.

Las enzimas E2 tienen la función de transferir la ubiquitina activada al sustrato o a la proteína seleccionada, sin embargo, la E2 no tiene la capacidad de seleccionar específicamente el sustrato o proteína blanco, por ello requiere del complejo de E3 ubiquitina ligasa; por lo tanto, la E2-ubiquitina activada se une a este complejo y el complejo recluta el sustrato específico para llevarse a cabo la transferencia de la ubiquitina desde la E2 al sustrato.

5. La familia de E3 ubiquitina ligasa

La familia de proteínas de E3 induce diversas funciones celulares. Por lo tanto, la selección de la proteína blanco por la E3 asegura de una manera precisa la adición de la ubiquitina de forma adecuada. E3 es la responsable para seleccionar específicamente la proteína blanco que se va a degradar. El número de genes codificantes de E3 es diverso y más que 600 genes en el genoma humano son reportados y esto indica que existe una gran variedad de sustratos que son blanco para las E3s. Para su estudio, estas E3s son clasificadas dentro de cuatro familias de proteínas: la familia RING (por sus siglas en inglés, “interesting new gene”), la familia “U-box”, la familia HECT (“homologous to E6APC-terminus”) y la familia RBR (“RING-between RING”).

Basado sobre estudios estructurales y bioquímicos, las cuatro familias tienen dos tipos principales de mecanismos de transferencia de la ubiquitina. Las E3s pertenecientes a las familias RING y “U-box” catalizan una transferencia directa de la ubiquitina desde la E2-ubiquitina hacia el sustrato o proteína blanco. En contraste, las familias de E3s HECT y RBR tienen una cisteína catalítica la cual puede recibir ubiquitina desde E2-ubiquitina, y después transferir esta ubiquitina hacia el sustrato o proteína blanco (**Figura 2**). Mediante análisis de estructura cristalina, una nueva familia E3 ha sido documentado nombrado como PCAF-N (6), sin embargo, no hablaremos de esta familia.

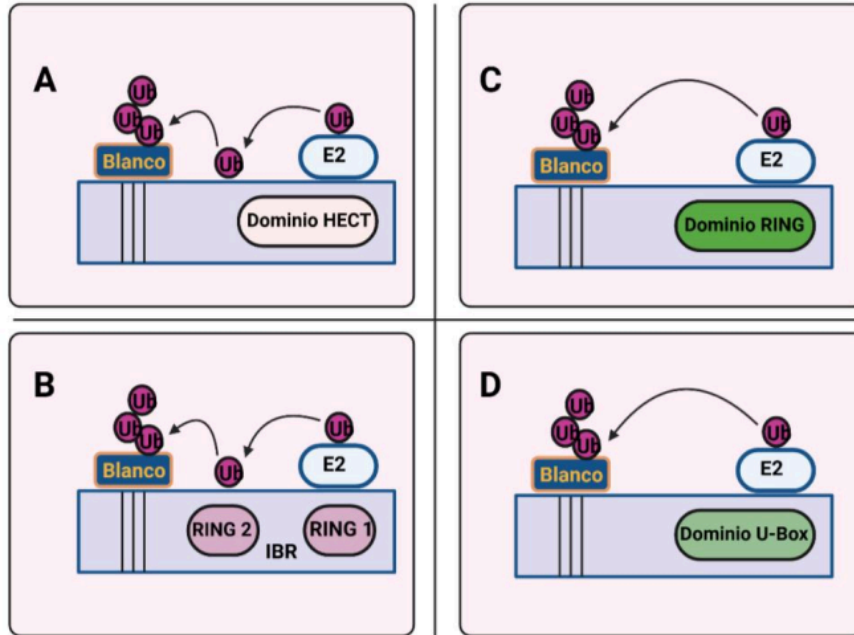


Figura 2. Diferentes tipos de E3 ubiquitina ligasas. Cuatro tipos de E3 ubiquitina ligasa son conocidos actualmente y son clasificados con base a los dominios de la proteína que funciona como plataforma del complejo. Las E3 ubiquitina ligasa con dominio HECT (A) y dominio RING-IBR-RING (B) tienen la característica de que la ubiquitina (Ub) es transferida primero a la proteína plataforma y después a la proteína blanco, en cambio las E3 ubiquitina ligasas con dominio RING (C) y U-box (D) transfieren la Ub de forma directa a la proteína blanco.

5.1. La familia RING E3 ubiquitina ligasa

Esta familia tiene como característica tener una proteína que posee el dominio RING y esta familia de E3 por lo regular forma un complejo de proteínas para llevar a cabo la transferencia directa de la ubiquitina hacia el sustrato a través de la enzima E2-ubiquitina activada. Algunas E3s RING trabajan como parte de un gran complejo de multi-subunidades. Por ejemplo, los complejos de E3 ubiquitina ligasas Culina-RING son grandes complejos de multi-subunidades que pueden ubiquitinizar a 300 diferentes sustratos o proteínas en las células humanas. La composición bioquímica general de la E3 ubiquitina ligasa Culina-RING es de una proteína RING E3 que puede ser la proteína RBX1 o la proteína RBX2, una proteína culina que puede ser CUL1, CUL2, CUL3, CUL4A/4B, CUL5, CUL7 o CUL9 y una proteína que funciona como receptor del sustrato, que puede ser la pVHL (7).

Las proteínas de la familia culina son la base de las E3s ubiquitina ligasa culina-RING y funcionan como el esqueleto o plataforma para formar el complejo, y tienen la función de reclutar la E2-ubiquitina y el receptor del sustrato, sin embargo esta unión de estas proteína a la culina no es de forma directa, se requiere de una proteína RING y de un adaptador (**Figura 3**). En el sitio carboxilo terminal (C-terminal) de la culina se une la proteína “RING finger” y ésta se une a la enzima E2-ubiquitina activada. En el sitio amino terminal (N-terminal) de la culina es donde se recluta varios receptores del sustrato, y esto usualmente ocurre a través de una proteína adaptadora. Cada uno de los componentes de la familia de las culinas (CUL1, CUL2, CUL3, CUL4A/4B, CUL5, CUL7 y CUL9) forma un tipo diferente de culina-RING ubiquitina ligasa (CRL). En la actualidad se conoce la mayoría de estos complejos, excepto para CUL9.

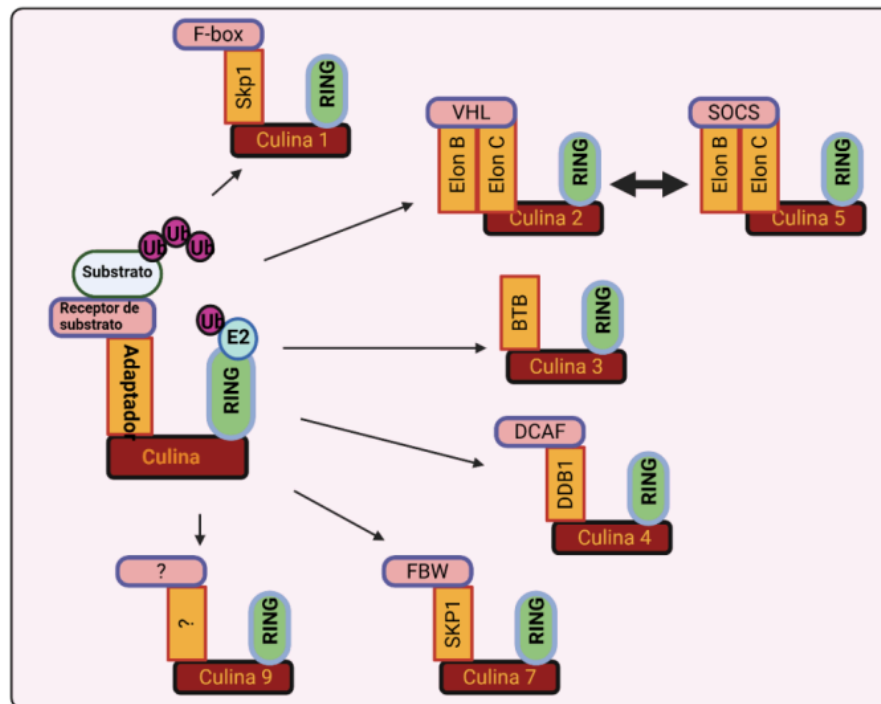


Figura 3. Sistema E3 ubiquitina ligasa-Culina-RING. La familia culina forma diferentes tipos de E3 ubiquitina ligasa. La conformación estructural de la E3 ubiquitina ligasa dependiente de culinas es una proteína que funciona de plataforma, que corresponde a los diferentes tipos de culinas, ésta une a la proteína RING que es la responsable de reclutar a la E2-Ub, por el otro lado la culina une a la proteína adaptadora que es la responsable de reconocer a la proteína receptora de sustrato, la proteína receptora de sustrato une específicamente a la proteína blanco (sustrato) que se va a ubiquitinar. Actualmente se conocen 7 tipos de culinas, y cada una forma un tipo diferente de E3 ubiquitina ligasa. La culina 2 es la plataforma para la E3 ubiquitina ligasa-VHL, que es muy semejante a la E3 ubiquitina ligasa culina 5. La E3 ubiquitina ligasa culina 3 no tiene proteína adaptadora y la culina 9 no se conocen con exactitud las proteínas adaptadoras y el receptor de sustrato.

La Cul1-RBX1 es la unidad básica del CRL1 y usa la proteína SKP1 como un adaptador para reclutar las proteínas F-box como receptor del substrato. El CRL2 usa el complejo elongina B y elongina C como adaptador para reclutar proteínas con caja-VHL como receptores de substrato. El CRL3 directamente recluta las proteínas BTB (receptor de substrato) sin la necesidad de una proteína adaptadora. CRL4 (incluyendo el CRL4A y CRL4B) usa DDB1 como adaptador para reclutar las proteínas DCAF como receptor de substrato. CRL5 está compuesto de Cul5 y RBX2, y éste usa el complejo elongina B y elongina C como el adaptador para reclutar las proteínas con caja “Suppressor of cytokine signaling” (SOCS) como el receptor de substrato. CRL7 ha sido conocido a usar la proteína adaptadora SKP1 para reclutar proteínas con caja-FBW8 o -FBW11 como receptores de substrato. El CRL9 abarca el Cul9 y RBX1, sin embargo, el adaptador y el receptor de substrato hasta el momento es desconocido (8) (**Figura 3**).

5.1.1. El Complejo ubiquitina ligasa E3 Culina2-RING-VHL

Los complejos E3 ubiquitina ligasa tipo Culina2-RING juegan un papel central en la selección específica de proteínas celulares para su degradación a través del sistema ubiquitina proteasoma. La proteína Culina-2, un miembro de las proteínas de la familia culina, es codificada por el gen *cul2*. La proteína Cul2 forma el complejo culina2-RING-VHL E3 ligasa. En el complejo Culina-2, la proteína Cul2 recluta en uno de sus extremos a la proteína RING (Rbx1) (también conocido como Roc1) en el cual esta proteína reconoce y se une a la enzima E2-ubiquitina, y en el otro extremo de la proteína Cul2 se une las proteínas elongina B y la elongina C como proteínas adaptadoras para reclutar la proteína VHL que funciona como receptora de substrato (9).

Con respecto a las proteínas culinas son proteínas evolutivamente conservadas presentes desde levaduras hasta el humano, con excepción de la proteína Cul2 que está presente solamente en organismos multicelulares. La estructura de las proteínas culinas son muy similares, con respecto a la Cul2 está tiene un dominio conservado evolutivamente llamado el dominio “cullin homology” (CH) en su sitio carboxilo terminal (C-terminal). El dominio CH tiene la función de interaccionar con la proteína Rbx1. Además, la interacción entre Cul2 y la proteína Rbx1 debe existir primero una modificación de tipo nedisilación (NEDD8) en la Cul2, donde esta modificación es similar para los otros miembros de la familia Culina. Por otro lado, El sitio N-terminal de Cul2 es la responsable para la interacción con las proteínas elongina B y elongina C y éstas se unen con las

diferentes proteínas receptoras que reconocen el sustrato, como es el caso de la proteína VHL (10).

Con respecto a las proteínas elongina B y elongina C éstas inicialmente fueron encontradas como dos subunidades regulatorias pertenecientes al complejo elongina, el cual este complejo elongina es un regulador positivo de la RNA polimerasa II para incrementar la tasa de alargamiento durante la transcripción del RNA mensajero. Actualmente se sabe que la elongina B y elongina C pueden unirse a Cul2 o también a la Cul-5 (Cul5) y funcionar como componentes adaptadores de la E3 ubiquitina ligasa (11). Con respecto al complejo elongina, ésta está conformada por las proteínas elongina A, elongina B y elongina C. La elongina A es la subunidad activa del complejo que cooperar en el proceso de transcripción con la RNA polimerasa II. La elongina B y elongina C son reguladores positivos de la elongina A y son capaces de formar un complejo binario estable para inducir actividad transcripcional de la elongina A. La elongina C puede unirse directamente a la elongina A en la ausencia de elongina B para formar un complejo AC con actividad específica en la transcripción, sugiriendo que la elongina C funciona como un inductor de la actividad de la elongina A. En contraste, la elongina B, un miembro de la familia de genes "ubiquitin homology" (UbH), no se une a la elongina A en ausencia de elongina C. En vez de esto, la elongina B tiene un papel de tipo chaperona para el ensamblaje del complejo elongina por la unión de elongina C y esto promueve su interacción con elongina A.

Por otro lado, la proteína VHL (pVHL) se une fuerte y específicamente al complejo elongina BC únicamente sin la presencia de elongina A, por lo tanto, la pVHL así como también la elongina A compiten por la unión hacia el complejo elongina BC de una manera mutuamente excluyente. Además, la unión de la pVHL hacia el complejo elongina BC inhibe su habilidad para interactuar con la elongina A, esto sugiere que la actividad de supresión de tumor que tiene la pVHL podría estar involucrada en la regulación de la actividad transcripcional de la elongina A evitando el alargamiento de la transcripción de RNA mensajeros (12).

Las proteínas receptoras de sustrato son los otros componentes importantes del complejo E3 ubiquitina ligasa culina2-RING. Estos receptores son dependientes de las proteínas culinas y la función importante es reconocer específicamente y unir el sustrato al complejo E3 ubiquitina ligasa para transferir la ubiquitina desde la enzima E2 al sustrato y así ser marcado específicamente para su degradación por el proteasoma. En el caso de la E3 ubiquitina ligasa dependiente de culina 2 este complejo puede reconocer a siete diferentes receptores de sustrato. Uno de estos receptores de sustrato es la pVHL y este receptor reconoce al sustrato "hipoxia induced factor" (HIF, por sus siglas en inglés)-alfa en condiciones de oxígeno normal (normoxia), el cual en estas condiciones HIF-1alfa

es ubiquitinado por este complejo y provoca su degradación (**Figura 4**). Otro receptor es “Leucine-Rich Repeat protein-1” (LRR1 por sus siglas en inglés), el cual fue primero encontrado a suprimir la señalización del receptor 4-1-BB en las células T CD4+ y CD8+. El receptor “Feminization-1b” (FEM1b) es otro que reconoce este complejo y está involucrado en la regulación de la secreción de insulina estimulado por glucosa. PRAME es otro receptor de sustrato, éste es un factor de transcripción esencial para el desarrollo embrionario en tiempo temprano. Otro receptor es ZYG11, que actúa como un regulador del ciclo celular en *Caenorhabditis elegans*, también es considerado un oncogén en cáncer de pulmón de células no pequeñas por vía de la regulación de la expresión de CCNE1. El receptor BAF250 el cual mono-ubiquitina los sitios de lisina 120 de las histonas H2B para promover la transcripción. Por último, está el receptor RACK1 que promueve la degradación de HIF-1alpha en una forma dependiente de la chaperona HSP90 pero de una manera independiente de la concentración de oxígeno (13), otra función es la presencia de agentes apoptóticos, RACK1 conduce la degradación de la proteína “Bcl-2-interacting mediator of cell death extra long” (BimEL) y también inhibe a la apoptosis en células de cáncer de pecho (14).

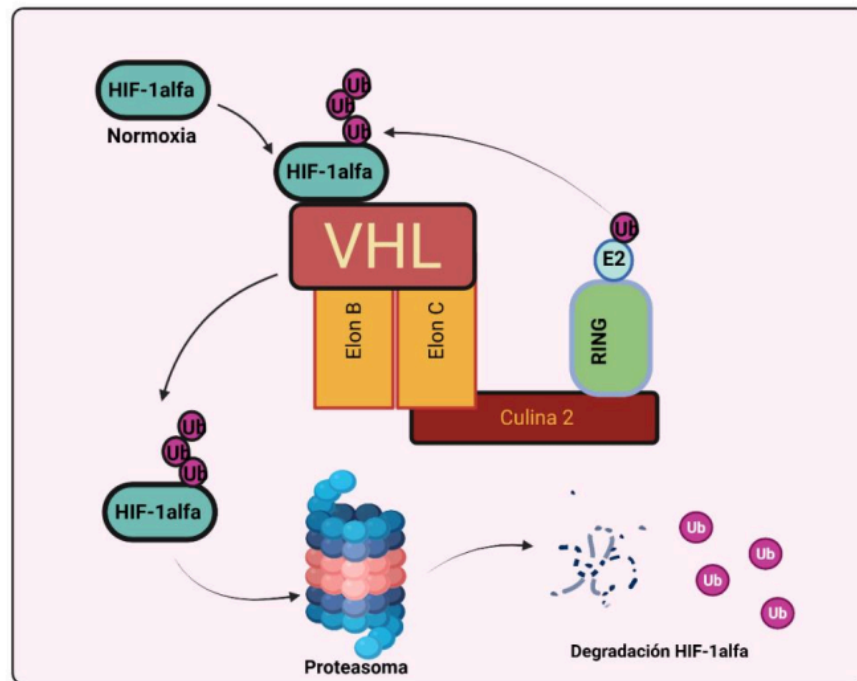


Figura 4. El eje VHL-HIF-1alfa. En condiciones normales de oxígeno, HIF-1alfa es degradado por el sistema ubiquitina proteasoma. HIF-1alfa es reconocido por el receptor del sustrato VHL del complejo E3 ubiquitina

ligasa Culina 2-Elongina BC-Ring. La enzima E2 transfiere la ubiquitina (Ub) a HIF-1alfa para ubiquitarlo, posteriormente ser degradado por el proteasoma.

Con respecto al receptor de substrato pVHL tiene una importancia clínica debido a que esta proteína fue descubierta en la enfermedad von Hippel-Lindau (VHL), el cual es un síndrome de cáncer hereditario raro (15). En este síndrome se observa que los pacientes tienen mutaciones en la pVHL y estas mutaciones provocan la pérdida de la función de la proteína, por ejemplo, interrumpe la interacción entre pVHL y la elongina B y elongina C provocando una inactivación del complejo E3 ubiquitina ligasa Culina2-RING-ElonginaB/C-VHL (16). La degradación dependiente del complejo Culina2-VHL de la subunidad HIF-1alfa es el más estudiado de las E3 ubiquitina ligasas en la tumorigénesis. Además, Culina2-VHL está involucrada en otros procesos celulares incluyendo la línea de germinación hasta la infección viral.

La pVHL, así como las otras proteínas que interactúan con Cul2-Rbx1 tales como LRR-1 y FEM-1, tienen una región de aminoácidos homologas entre ellos que es llamado la caja VHL. Esta caja tiene dos regiones, una llamada BC (con secuencia consenso: (S, T, P)LXXX(C, S, A)XXXphy, donde phy es cualquier aminoácido hidrofóbico), en esta región es donde se une la elongina B y elongina C, y la otra es la región Culina 2 (secuencia consenso: phyPXXphyXXXphy) y es la responsable para la unión a la proteína Culina 2. La caja VHL es muy similar a la caja presente en la proteína "Suppressor of cytokine signaling" (SOCS) donde SOCS tiene también la región BC y la región culina 5. Aunque ambas cajas, VHL y SOCS, usan elongina B y elongina C como un adaptador, éstas se unen a culina2 y culina5, respectivamente (17).

La estructura cristalina del complejo Culina 2 conformado por VHL, elongina B, elongina C muestra una forma tripoide, con la elongina C localizada en el centro y los otros componentes del complejo en los extremos. Culina 2 se une en la interface entre VHL y elongina C a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Con respecto a la elongina C, forma una estructura tipo "loop" con los residuos de aminoácidos 48-57, el cual es el sitio de contacto con la Culina 2 y además el N-terminal de Culina 2 es crítico para esta unión con elongina C. Por otro lado, las mutaciones dirigidas en la región L3G de Culina 2 drásticamente reduce la interacción entre Culina 2 y el complejo VHL-elongina-BC, indicando un sitio importante de interacción y conformación del complejo.

5.2. La familia HECT

La familia HECT está compuesta de 28 HECT E3s ubiquitina ligasa en el humano. Esta familia consiste en un dominio de unión al sustrato en el sitio N-terminal y un dominio HECT en el sitio C-terminal (**Figura 2**). La familia de HECT E3s son divididos dentro de tres grupos y esta división está basado sobre su dominio N-terminal, que corresponde a: la familia NEDD4, la familia HERC y la familia HECTs (18). Los E3 ubiquitina ligasa de esta familia HECT están representados por SMURF1(1zvd), NEDD4L (3jvz), WWPI (1nd7) y E6AP(1c4z).

5.3. La familia RBR

Esta familia está integrada por 14 miembros E3s ubiquitina ligasa en el humano. Todos tienen un motif RING1-IBR-RING2 (19) (**Figura 2**). Entre los miembros RBR E3s, PARKIN, HHARI y HOPI son los más representativos. RBR E3s son distintos desde los RING E3s porque el RBR forma un intermediario tioester con el C-terminal de la ubiquitina (19), en cambio esto no ocurre con el RING E3s. Esta familia tiene dos dominios RING, el dominio RING1 que recluta a la E2-ubiquitina y que posteriormente es transferido la ubiquitina hacia la cisteína catalítica del RING2. El RBR E3s transfiere la ubiquitina hacia el sustrato por un mecanismo similar a la familia de HECT E3s.

6. Degrones

La mayoría de las proteínas con una vida media corta se distinguen por tener en su secuencia aminoacídica regiones denominadas como determinantes estructurales de señalización que funcionan como blancos de reconocimiento para la maquinaria de E3 ubiquitina ligasa o para el proteasoma (o lisosomas en algunos casos); esta señal es considerada como una etiqueta de degradación o “degron”. Una señal de degradación o “degron” es usualmente definido como un elemento mínimo dentro de una proteína que es suficiente para el reconocimiento y degradación por un aparato proteolítico. Una propiedad importante de los degrones es que estas secuencias pueden ser transferibles, es decir que de forma artificial un elemento degron puede ser introducido por ingeniería genética a otra proteína de larga vida y esta nueva proteína recombinante sufrirá degradación en un tiempo corto.

En la parte del sitio N-terminal de algunas proteínas se ha detectado que hay presencia de una secuencia degron, ya que una E3 ubiquitina ligasa es capaz de unirse a la proteína con muy alta selectividad y especificidad de reconocimiento hacia los residuos de aminoácidos presentes en el sitio N-terminal de una proteína (20). Esta vía de

degradación, llamada como “N-end rule pathway”, establece el estado de la vida media de una proteína y está determinado por la naturaleza de sus residuos del N-terminal.

Otra manera en que el “degron” es reconocido por la E3 ubiquitina ligasa es la modificación del “degron” por fosforilación (fosfodegrones); este tipo de “degron” fosforilado es reconocido principalmente por la E3 ubiquitina ligasa SKP1-Cul1 (SCF), esta E3 ubiquitina ligasa requiere para el reconocimiento del “degron” que la fosforilación se lleve a cabo en los residuos específicos de serina o treonina. Uno de los ejemplos de fosfodegrones es la eliminación de ciclinas específicas e inhibidores de cinasas dependientes de ciclina por el sistema ubiquitina proteasoma. La forma fosforilada de la ciclina E y del inhibidor CDK p27^{Kip1} es reconocido por el complejo SCF para su degradación (21).

Por otro lado, el oxígeno puede ser otra señal de modificación del “degron”, esto es para el caso de HIF-1alpha, el cual está regulado por los niveles de oxígeno. La subunidad de HIF-1alpha es rápidamente degradado por el proteasoma bajo condiciones de normoxia. Esta regulación proteolítica depende sobre Culina2-RING-elongina B/C-VHL. La pVHL se une a HIF-1alpha vía un degron dependiente de oxígeno (ODD, por sus siglas en inglés). En las células que están bien oxigenadas, el HIF-1alpha está hidroxilado en los residuos de prolinas del ODD por medio de las proteínas prolil-hidroxilasas donde usan el oxígeno molecular para hidroxilar las prolinas, el ODD hidroxilado de HIF-1alfa es reconocido por la pVHL para su degradación (22).

En este capítulo abordamos la estructura base de las E3 ubiquitina ligasas y su función celular, con énfasis a la E3 ubiquitina ligasas Culina2-RING-Elongina B/C-VHL, esto con la finalidad de entender el mecanismo de la función de la pVHL en la célula.

Referencias

1. Akutsu M, Dikic I, Bremm A. Ubiquitin chain diversity at a glance. *J Cell Sci.* 2016; 129:875-80.
2. Meyer HJ, Rape M. Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell.* 2014; 157:910-921.
3. Clague MJ, Barsukov I, Coulson JM, et al. Deubiquitylases From Genes to Organism. *Physiol Rev.* 2013; 93:1289-1315.
4. Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* 2016; 26:399–422.
5. Ziv I, Matiuhin Y, Kirkpatrick D, et al. A Perturbed Ubiquitin Landscape Distinguishes Between Ubiquitin in Trafficking and in Proteolysis. *Mol Cell Proteom.* 2011; 10:M111.009753.

6. Toma-Fukai S, Hibi R, Naganuma T, et al. Crystal structure of GCN5 PCAF N-terminal domain reveals atypical ubiquitin ligase structure. *J Biol Chem*. 2020; 295:14630–14639.
7. Lydeard JR, Schulman BA, Harper JW. Building and remodelling Cullin–RING E3 ubiquitin ligases. *EMBO Rep*. 2013; 14:1050–1061.
8. Lin CP, Komives EA. Diversity of structure and function in Cullin E3 ligases. *Curr Opin Struct Biol*. 2024; 88:102879.
9. Finley D. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2009; 78:477–513.
10. Mahrour N, Redwine WB, Florens L, et al. Characterization of Cullin-box sequences that direct recruitment of Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules to Elongin BC-based ubiquitin ligases. *J Biol Chem*. 2008; 283:8005–8013.
11. Garrett KP, Aso T, Bradsher JN, et al. Positive regulation of general transcription factor SIII by a tailed ubiquitin homolog. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:7172–7176.
12. Chen Y, Cramer P. RNA polymerase II elongation factors use conserved regulatory mechanisms. *Curr Opin Struct Biol*. 2024; 84:102766.
13. Liu YV, Baek JH, Zhang H, et al. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O(2)- independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α . *Mol Cell*. 2007; 25:207–217.
14. Zhang W, Wang H, Li Z, et al. Cellular requirements for bovine immunodeficiency virus Vif-mediated inactivation of bovine APOBEC3 proteins. *J Virol*. 2014; 88:12528–12540.
15. Linehan WM, Lerman MI, Zbar B. Identification of the von Hippel–Lin- dau (VHL) gene. Its role in renal cancer. *JAMA*. 1995; 273:564–570.
16. Pause A, Lee S, Worrell RA, et al. The von Hippel–Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:2156–2161.
17. Kamura T, Sato S, Haque D, et al. The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev*. 1998; 12:3872–3881.
18. Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10:398–409.
19. Buetow L, Huang DT. Structural Insights into the Catalysis and Regulation of E3 Ubiquitin Ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016; 17:626–642.
20. Bartel B, Wunning I, Varshavsky A. The recognition component of the N-end rule pathway. *Embo J*. 1990; 9:3179–3189.

21. Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, et al. The SCF β TrCP ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B α and β -catenin and stimulates I κ B α ubiquitination in vitro. *Genes Dev.* 1999; 13:270-283.
22. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 2001; 292:464–468.

Capítulo III

La proteína von Hippel-Lindau (pVHL)

1. VHL

La historia de VHL se remonta desde los datos clínicos de pacientes que presentaban problemas en la retina y en el sistema nervioso central, y estos problemas estaban relacionados con casos familiares. Treacher Collins (1894) fue el primer médico que describió los hemangioblastomas retinales de tipo familiar en especímenes patológicos desde tres enucleaciones en dos hermanos. Por separado, Eugene von Hippel estudio las características clínicas y la progresión de las lesiones retinales (ahora conocidas como hemangioblastomas) (1). Posteriormente, con la confirmación patológica desde un espécimen enucleado de un paciente, Collins y Czeamk, introdujeron el termino de lesiones retinales angiomasos; Brandt reportó la autopsia realizada sobre el mismo

paciente 4 años después. La autopsia demostró la presencia de quistes y tumores renales así como también quistes epididimales. Por otro lado, Arvid Lindau, estudiando el sistema nervioso, fue el primero en proponer el término angiomatosis del sistema nervioso central, basado sobre una revisión de características patológicas y clínicas de 16 de sus pacientes y 24 pacientes tomados desde la literatura (2). Lindau encontró que los quistes y tumores fueron encontrados en la medula y en el cordón espinal y estaban asociados con los hemangioblastomas retinales y los tumores viscerales. En agradecimiento a los dos autores que describieron los hemangioblastomas retinales (von Hippel tumores) y los hemangioblastomas del cerebelo (tumores Lindaus), respectivamente, hoy en día se conoce como la enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL) (3).

1.1. El gen *vhl*

Después de determinar la entidad de la enfermedad de VHL, investigaciones fueron hechas para determinar la causa de esta enfermedad familiar. Estudios arrojaron la información que la enfermedad de VHL es hereditario y tiene un componente genético. El componente genético de esta entidad clínica fue el descubrimiento del gen *vhl*, este gen fue aislado y secuenciado en 1993 (4). El gen *vhl* está considerado como un gen supresor de tumor y se localiza en el cromosoma 3p25-26. Las alteraciones genéticas en el gen *vhl* son principalmente mutaciones que conducen a la pérdida de la función de este gen y esto ha sido correlacionado con familias que presentan la enfermedad de VHL y en pacientes con carcinoma de células renales (RCC, por sus siglas en inglés) esporádicos.

El gen *vhl* consiste de tres exones y codifica la proteína VHL (pVHL). El gen es altamente conservado en todas las especies (5). Las mutaciones de pVHL para generar la enfermedad de VHL se alinean al modelo de “dos-hit” de Knudson de cáncer hereditario (6). Este modelo consiste en que una mutación en el gen *vhl* proviene por herencia desde la línea germinal que resulta en un alelo defectivo en todas las células del cuerpo (primer hit); el segundo hit (o pérdida de heterocigosidad) se establece cuando un evento de mutación somática ocurre en el alelo del *vhl* normal y estos dos eventos genéticos altamente predispone para la formación de un tumor (6).

Con respecto a la transcripción del gen *vhl*, se ha determinado que su expresión del mRNA es alta en 27 tejidos normales diferentes, además otro estudio con 95 individuos reveló que la pVHL es ubicuamente expresados en la mayoría de los tejidos (7). A pesar de que la expresión del mRNA del gen *vhl* es relativamente ubicua, la producción de la proteína (pVHL) no es lo mismo, ya que los niveles de pVHL son bajos o ausentes en algunos tejidos, lo cual indica que esta pVHL está regulada o gobernada por otros elementos.

Como cualquier gen eucariotico con varios exones, estos pueden tener arreglos diferentes entre los exones y producir mRNA y proteínas variantes o isoformas (“splicing”); para el caso del gen *vhl* (con tres exones) despliega tres mRNAs y con la traducción correspondiente de sus proteínas variantes, el cual difiere tanto en la longitud de la proteína como en la combinación de los exónes. Las tres isoformas representativas de pVHL son la 213, 172, y 160 aminoácidos, estas isoformas son producidas por un lado por el “splicing” alternativo (fusión de exones) y por otro lado por el inicio de la traducción alternativa. Actualmente estas isoformas son conocidas como la isoforma uno que corresponde a VHL30 (masa molecular) o VHL213 (número de aminoácidos), la isoforma dos que corresponde a la VHL172 (172 aminoácidos), mientras que la isoforma tres corresponde a VHL19 (masa molecular) o VHL160 (160 aminoácidos). La VHL30 es la isoforma mas larga, con una masa molecular de 30 kDa y con 213 amnoácidos y consiste de un transcripto de mRNA conformado con los tres exones, mientras que el VHL19 tiene 160 aminoácidos y una masa molecular de 19 kDa con los tres exones en su mRNA, sin embargo, esta isoforma se genera por un desplazamiento en el inicio de la traducción interna (traducción alternativa) que corresponde en la metionica 54 (8). Para el caso de la isoforma VHL172, el cual proviene desde un “splicing” alternativo que une los exones uno y tres, excluyendo el exón dos, lo cual da como resultado una proteína de 172 aminoácidos (9) (**Figura 1A**). Las isoformas VHL30 y VHL19 son ambos biológicamente activos y son expresados en todos los tejidos (8).

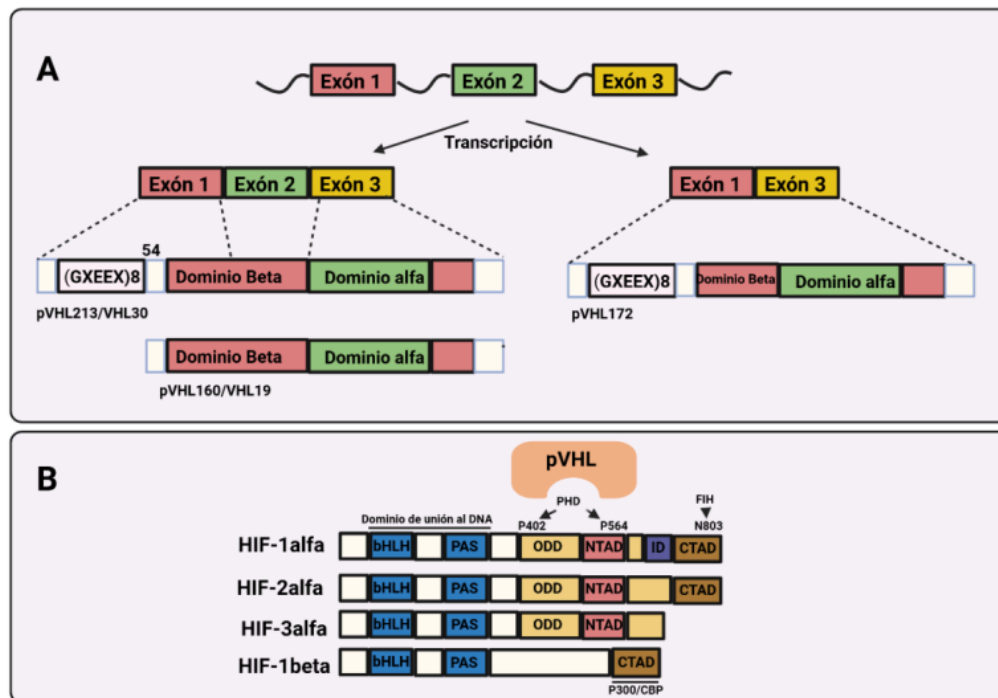


Figura 1. Gen y estructura proteica de VHL y HIFs. (A) El arreglo del gen *Vhl* en el DNA y los diferentes transcritos producidos. Los transcritos producen las diferentes proteínas VHL (pVHL) con número de aminoácidos/pesos molecular. (B) Estructura de HIFs. Los diferentes HIFs tiene en común el dominio de unión al DNA (bHLH y PAS) y los HIF-1, 2 y 3 tienen el dominio de hidroxilación dependiente de oxígeno el “degron dependiente de oxígeno” ODD, por sus siglas en inglés, y el factor de transactivación NTAD y CTAD, excepto HIF-3. En el dominio ODD y NTAD se une la pVHL. En el dominio CTAD es donde actúa la proteína FIH.

La localización celular de las isoformas de pVHL indica que están presente en el citosol, en el núcleo, en la mitocondria y en el retículo endoplásmico. Interesantemente, La VHL30 está localizada predominantemente en el citosol, o está asociada a la membrana (8), en cambio la VHL19 se encuentra en ambos en el núcleo y en el citosol, pero no está asociada con la membrana celular (8).

1.2. La proteína VHL (pVHL)

La isoforma VHL30 (proteína más grande) tiene dos principales dominios de unión a proteínas, los dominios alfa y beta, el cual son precedidos por un dominio N-terminal ácido. El dominio beta está constituido de aproximadamente 100 aminoácidos. Este dominio es rico en cadenas beta, el cual forma una estructura "beta-sheet", y en este dominio beta es donde interactúa con las proteínas HIFs hidroxilado, RNA polimerasa II, la isoforma de la proteína cinasa C y otras proteínas (10). El dominio alfa es el más corto y contiene los sitios de unión para elongina-B/C (caja/sitio BC), Culina-2 (caja/sitio Cul-2), p53 y otras proteínas (10). El dominio beta tiene otra unión de interface, la interface C, el cual es importante para la localización de VHL y unión a las proteínas TBP1 y EEF1A (**Figura 1A**).

La pVHL puede sufrir mutaciones inactivantes por el cual pierde su función, y se ha observado que éstas ocurren entre el codón 54 y el carboxilo terminal de la proteína. Estas mutaciones afectan ambas isoformas de la proteína pVHL30 y la pVHL19. La pVHL se encuentra en ambos compartimentos citoplásmico y nuclear y el tráfico entre estos dos compartimentos es esencial para la función de pVHL (11). La función más estudiada y caracterizada de la pVHL es la interacción con la proteína factor inducible por hipoxia (HIF, por sus siglas en inglés), el resultado de esta interacción es la degradación proteasomal de HIF. HIF es un factor transcripcional heterodimérico que consiste de una subunidad alfa inestable y dependiente del oxígeno y otra subunidad beta estable (independiente del oxígeno). Existen tres genes que codifican a HIF-alfa en el humano, HIF-1alfa, HIF-2alfa y HIF-3alfa (12) (**Figura 1B**). En algunas condiciones, HIF-1alfa y HIF-2alfa pueden ser mutuamente antagonistas. HIF-3alfa parece ser involucrado en un mecanismo de retroalimentación controlando la actividad de HIF-1alfa (13).

2. El eje VHL-HIF

Como anteriormente se mencionó, pVHL se une a la elongina C, el cual a la vez se une a la elongina B y Culina 2 para formar el complejo E3 ubiquitina ligasa VHL-elonginaBC-Cul2 (VCB-Cul2). En condiciones de normoxia, el complejo VCB-Cul2 se une a HIF-alfa para realizar la poliubiquitinación, marcándolo para la degradación proteasomal. Sin embargo, otras proteínas que reconoce pVHL unido al complejo han sido tentativamente identificados y estos incluyen a "estrogen receptor alpha" (14), "Kruppel-like factor receptor 4" (15), ERK5 (16), y "androgen receptor (17).

Ambos HIF-1alfa y HIF-2alfa tienen dos dominios de activación transcripcional, uno el "N-terminal transactivation domain" (NTAD) y el otro el "C-terminal transactivation

domain" (CTAD), estos dominios tienen la función de activar la transcripción de los genes blancos de HIF (18). La estructura de HIF-3alfa conforma a un NTAD únicamente y carece de CTAD (**Figura 1B**), con respecto a la regulación transcripcional hasta la fecha es poco entendido, y algunas variantes de HIF-3alfa al parecer inhiben la activación transcripcional dependiente de HIF *in vitro* e *in vivo* (18).

HIF es altamente dependiente de los niveles de oxígeno. Cuando el nivel de oxígeno es normal (normoxia), la subunidad de HIF-alfa sufre una hidroxilación enzimática en uno o ambos residuos de prolina que residen cerca del NTAD. Estas prolina que sufren hidroxilación están dentro del dominio de degradación dependiente de oxígeno ODD (por sus siglas en inglés), es decir es un "degron". Esta hidroxilación de los residuos de prolina es llevada a cabo por miembros de la familia de enzimas "oxygen- and 2-oxoglutarate dependent prolyl hydroxylase" (PHD) (19) y estas enzimas requieren como sustrato oxígeno y 2-oxoglutarato para llevar a cabo su función. Existen al menos tres PHDs identificados hasta la fecha: PHD1 (EGLN2), PHD2 (EGLN1) y PHD3 (EGLN3). Aunque el PHD2 es al parecer la primera hidroxilasa para ambos HIF-1alfa y HIF-2alfa, sin embargo, otros estudios indican que la PHD3 puede ser el principal responsable para la hidroxilación de HIF-2alfa. La hidroxilación de uno o ambos residuos de prolina del ODD dentro de HIF-1alfa y HIF-2alfa genera el sitio de reconocimiento con alta afinidad de unión para pVHL (**Figura 1B**) (20). La pVHL sirve como un componente de reconocimiento de sustrato de la E3 ubiquitina ligasa que atrae a esta maquinaria de conjugación de ubiquitina a las subunidades de HIF-alfa para realizar la poliubiquitinación de HIF y posteriormente su destrucción por el proteasoma.

Cuando la disponibilidad de oxígeno es limitante (hipoxia), las PHDs son enzimáticamente inactivadas en estas condiciones ya que ellas requieren de oxígeno para funcionar; por lo tanto, HIF-alfa no es hidroxilado en los residuos de prolina del ODD. La ODD no hidroxilado provoca que pVHL no se una a HIF-alfa y por lo tanto no se ubiquitina y no hay degradación. Al no existir degradación de HIF, las subunidades de HIF-alfa se acumulan en el citoplasma, posteriormente se translocan hacia el núcleo, para unirse con la subunidad HIF-beta (también llamado ARNT; "aryl hydrocarbon nuclear translocator"). Este heterodímero reconoce elementos de respuesta a HIF (ERH) en los promotores de los genes blanco y activa la transcripción de varios genes que están involucrados principalmente en la proliferación celular, angiogénesis, metabolismo de glucosa, apoptosis y otros procesos celulares (**Figura 2**). Similarmente, en la introducción de una inactivación de pVHL (por ejemplo, mutantes), aunque las subunidades de HIF-alfa son hidroxilados en las prolina de ODD, HIF no llega a ser degradado en condiciones de normoxia, debido a que pVHL modificada o mutada no puede unirse al HIF, y similar a lo que ocurre en hipoxia, HIF es libre para transactivar los genes blancos.

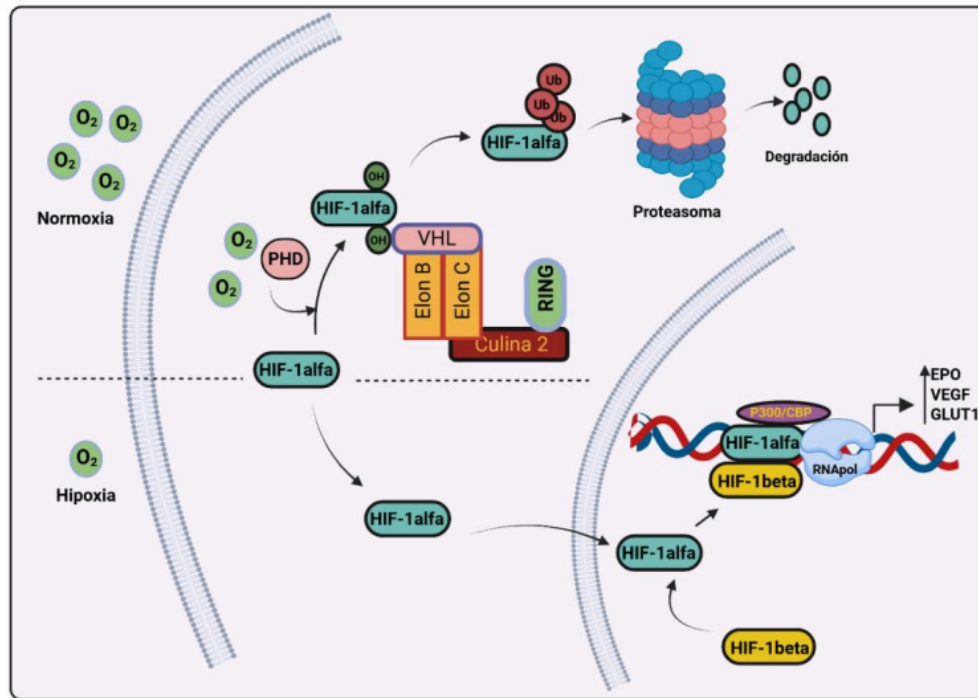


Figura 2. Degradación de HIF-1alfa por pVHL. En condiciones de normoxia HIF-1alfa es ubiquitinado por la E3 ubiquitina ligasa-VHL para su degradación por el proteasoma. En condiciones de hipoxia HIF-1alfa no es degradado y se transloca al núcleo celular para unirse con las subunidad HIF-1beta y reconocer los promotores de los genes blanco por HIF donde se acopla los co-activadores P300/CBP y la RNA polimerasa (RNA pol) para transcribir los genes que codifican a las proteínas EPO (eritropoyectina), VEGF (factor de crecimiento endotelial), GLUT1 (transportador de glucosa 1) y otros cientos de genes más.

Otro mecanismo de control de la actividad de HIF-alfa recae en la inhibición de la actividad transcripcional de HIF. Esta inhibición es llevado a cabo por la proteína “factor-inhibiting HIF”, FIH; FIH es una enzima hidroxilasa que hidroxila al residuo de asparagina 803 dentro del dominio CTAD de HIF-alfa. En condiciones de normoxia HIF-alfa sufre una hidroxilación dependiente de oxígeno por FIH (**Figura 1B**) (21). La hidroxilación de la asparagina de HIF por FIH evita el reclutamiento de los co-activadores transcripcionales p300 y la proteína de unión a CREB (CBP; CREB significa “cAMP response element binding protein”) y esto provoca una disrupción de la transactivación mediada por HIF-alfa y la no transcripción de los genes blancos (**Figura 2**). En contraste a la familia PHD, FIH permanece activa hasta en condiciones de hipoxia moderada, sugiriendo que en esta situación FIH puede actuar como un mecanismo secundario para inhibir la actividad transcripcional de HIF (22). Interesantemente, el CTAD de HIF-2alfa, al parecer, es relativamente más

resistente a la inhibición de FIH bajo condiciones de normoxia comparada al CTAD de HIF-1alfa. Esto indica que HIF-1alfa y 2alfa están altamente reguladas en condiciones de normoxia por dos mecanismos, uno que consiste en la hidroxilación del ODD para su degradación dependiente de pVHL y el otro mediante la inhibición de su actividad transcripcional por FIH.

2.1. Genes de respuesta por HIF

HIF es un factor de transcripción que activa de forma directa alrededor de 100 genes que participan en el metabolismo celular en condiciones de hipoxia. Estos genes inducidos por HIF incluyen a aquellos que están involucrados en la proliferación celular: “transforming growth factor” (TGF) y el “epidermal growth factor receptor” (EGFR); en angiogénesis: “vascular endothelial growth factor” (VEGF), “platelet-derived growth factor” B (PDGF B) e interleucina 8 (IL-8); en la toma de glucosa y metabolismo: “glucose transporter” 1 (GLUT1), 6-fosfofructocinasa 1 (PFK1) y en quimiotaxis: “stromal cell-derived factor” (SDF1) y su receptor C-X-C “chemokine receptor” 4 (CXCR4).

Por otro lado, en el caso de los tumores debido al sobre crecimiento celular se genera una zona de hipoxia principalmente en la parte mas interna del tumor, en esta zona hipóxica HIF está altamente involucrado en el mantenimiento y desarrollo del tumor. HIF induce la expresión de varios genes que participan de forma directa e indirecta en el ambiente tumoral, tales como la formación de la matriz extracelular y recambio de ella (“membrane type 1 matrix metalloproteinase” (MMP1) y “lysyl oxidase (LOX)). Además, genes relacionados a la transición epitelial a mesenquimal como TWIST1 y TWIST2 y el “hepatocyte growth factor receptor” (HGFR), que también son conocidos como genes blancos de HIF (23).

3. Función de VHL independiente de HIF

Recientes evidencias han indicado que pVHL tiene otras funciones diferentes que aquella relacionada con la regulación de la vía HIF. La mayoría de estas funciones alternantes han sido descubiertas a través de interacciones bioquímicas. Además, cuando la función de pVHL está alterada o mutada se observan cambios de expresión de genes independientes de HIF, lo cual sugiere que pVHL participa en otras funciones. Estas rutas o procesos celulares en donde participa pVHL son los siguientes (**Figura 3**):

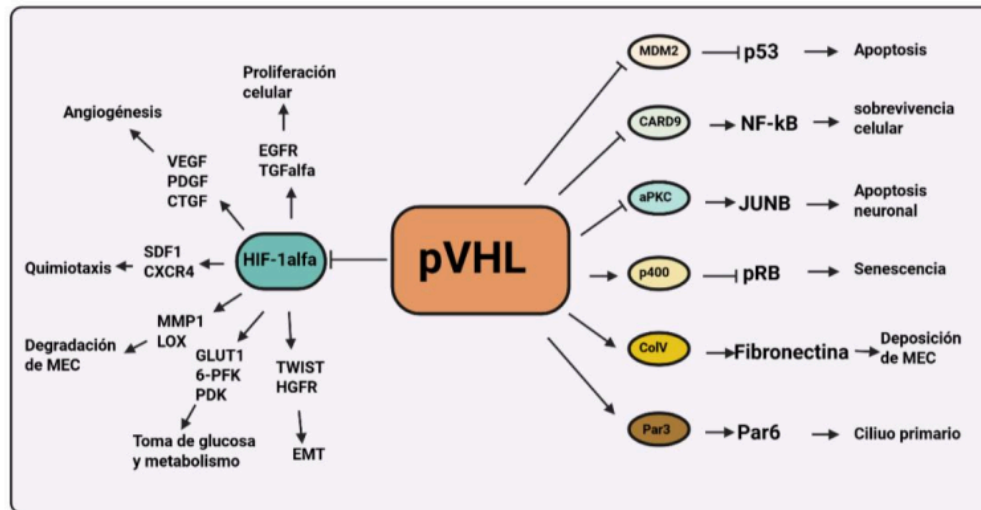


Figura 3. Función de pVHL. Algunos procesos celulares que son dependientes del eje pVHL-HIF-1alfa como angiogénesis, transporte de glucosa, proliferación celular, etc. y otros procesos celulares que son independientes del eje pVHL-HIF como apoptosis, supervivencia celular, apoptosis neuronal, etc.

3.1. Regulación de la apoptosis

Las células cancerosas tienen varios procesos biológicos alterados con la finalidad de mantener la supervivencia y resistir a las condiciones adversas. Por ejemplo, las células de cáncer renal tienen reprimida la apoptosis para resistir en el tratamiento con quimioterapia citotóxica convencional. Una de las proteínas involucradas en los cánceres es p53, esta proteína es un factor de transcripción y tiene función de regulación de la célula en aquellas condiciones adversas; en estas condiciones p53 se transloca al núcleo para transcribir genes relacionados con apoptosis y genes involucrados en el paro del ciclo celular, por tal motivo, p53 está considerado como una proteína supresora de tumor. A la vez, la p53 puede autoregularse ya que p53 transcribe su propia proteína MDM2 (una proteína ubiquitinante) que regula su estabilidad, esta proteína se une a p53 y lo ubiquitina para posteriormente la p53 ubiquitinada ser degradada por el proteasoma. Varios cánceres tienen alterada la función de p53 por medio de mutaciones o pérdida del gen. Sin embargo, existen algunos cánceres que no tienen alterado la p53 como es el caso del cáncer renal, indicando que existe una modulación funcional de su actividad o la activación de vías anti-apoptóticas alternativas (24). En este sentido, HIF y pVHL tienen la capacidad de influir en la función de p53 en las células de cáncer renal. Previos reportes

han mostrado que HIF puede directamente unirse a p53 para modular de forma negativa su actividad (25). Por otro lado, como una manera de contrarrestar el efecto de HIF sobre p53, pVHL es capaz de regular la función de p53 pero de una manera independiente de HIF. La pVHL se une a p53 para estabilizarlo y transportarlo al núcleo para incrementar su actividad transcripcional, además pVHL inhibe la actividad de la MDM2 para evitar la ubiquitinación de p53 y su posterior degradación (26). De esta manera la pérdida de pVHL en las células de cáncer renal resulta en la inactivación de p53 por ambos efectos dependientes e independientes de HIF.

El NF- κ B es un factor de transcripción y es uno de los reguladores claves de la inflamación ya que regula una cantidad enorme de citocinas. La familia NF- κ B consiste de p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50/p105 (NF- κ B1) y p52/p100 (NF- κ B2). En una célula en arresto, NF- κ B existe como homodímeros o heterodímeros y está inhibido su actividad por la unión de la I κ B (inhibidor de NF- κ B). Señales extracelulares o intracelulares inician la activación de NF- κ B, tales como citocinas pro-inflamatorias, el reconocimiento de los patógenos extracelulares o intracelulares (ejemplo TLRs) y estresores celulares (ejemplo, especies de oxígeno reactivo). El estímulo celular provoca que I κ B sea procesado y degradado por el proteasoma, el cual libera el NF- κ B y subsecuentemente causa activación y la transcripción de genes blanco.

Por otro lado, la vía del NF- κ B está relacionada con la inhibición de la apoptosis inducida por quimioterapia en las células de cáncer renal. Células deficientes en la pVHL presentan una actividad intensa de NF- κ B y esta actividad es parcialmente dependiente sobre la señal de HIF. La actividad de NF- κ B induce la expresión de genes anti-apoptóticos para inhibir este proceso. Por otro lado, la proteína CARD9 es un agonista que activa positivamente la función del NF- κ B. La pVHL tiene un efecto de modular negativamente la actividad de NF- κ B en una forma indirectamente, esto es por la unión de pVHL a CARD9, esta unión no induce la degradación de CARD9, mas bien es una señal para que CARD9 sea fosforilada por la proteína casein kinase 2 (CK2) y provocar su inhibición, esto resulta en la baja actividad del NF- κ B (27). La pérdida de pVHL en las células de cáncer renal provoca ambos una actividad mayor del NF- κ B y una inactivación de p53 para contribuir al fenotipo quimiorresistente de estas células.

3.1.1. Autofagia

El proceso de la autofagia es importante para el mantenimiento de la homeostasis celular ya que la autofagia remueve los organelos intracelulares dañados o proteínas anormales. Además de estas funciones básicas, la autofagia está involucrada en varios fenómenos fisiológicos y patológicos. La autofagia es inducida cuando las células están

expuestas a condiciones de estrés ambiental, tales como depleción de nutrientes o infección, para regular el crecimiento celular y muerte. En células cancerosas, la autofagia está involucrada en la supresión de la tumorigenesis, y principalmente se ha visto que esto es debido a que la proteína Beclina 1 (BECN1), el cual es importante para la inducción de la autofagia, no funciona adecuadamente en el cáncer de mama y ovario. Se ha visto que la restauración de la actividad de Beclina 1 enciende la autofagia e inhibe la proliferación de células cancerosas.

La autofagia esta regulada por el complejo mTORC1 (formado por las proteínas mTOR, Raptor, Deptor, PRAS40, mLST8); cuando existe riqueza de nutrientes el complejo mTORC1 está activo e inhibe la autofagia directamente reprimiendo el complejo de iniciación de autofagia ULK1, sin embargo cuando la célula está en condiciones de inanición ULK1 se activa para iniciar la autofagia y mTORC1 se apaga. La ruta de señalización del complejo mTORC1 es fundamental en la regulación del crecimiento celular y proliferación, y la hiperactivación de mTORC1 es un hallazgo común en las células de cáncer de riñón dependiente de la pVHL. La falta de regulación negativa de mTORC1 correlaciona con la progresión de un tumor y pobre diagnóstico en pacientes con cáncer de riñón. Recientemente se demostró que la proteína RAPTOR puede ser reprimida por pVHL. La pVHL interacciona con RAPTOR para incrementar la degradación de esta proteína por la ubiquitinación, así inhibiendo la señalización de mTORC1. Lo anterior correlaciona con la hiperactivación de la señalización de mTORC1 en células de cáncer de riñón porque se ha visto que estas células tumorales son deficientes en la pVHL. Se tiene reportado que la pérdida de la función de la pVHL-1 en *Caenorhabditis elegans* incrementa la actividad de mTORC1, lo cual sugiere que este sistema es un mecanismo conservado evolutivamente. Este nuevo mecanismo sugiere que pVHL está contralando el proceso canceroso ya que el apagado de la actividad de mTORC1 por vía degradación de RAPTOR es un mecanismo de encendido de la autofagia para evitar la sobrevivencia de las células cancerosas (28).

Otra evidencia de que la pVHL está relacionado con la autofagia es en los diferentes grados de tumor de cáncer de células de riñón, donde los niveles de expresión de pVHL y la proteína LC3B (proteína que participa en la formación de vesículas autofágicas) están inversamente correlacionados. Se sabe que la pVHL se une con LC3B y lo ubiquitina, por lo tanto, una pVHL mutante no interacciona con LC3B y tampoco induce su ubiquitinación. En un trabajo se observó que la autofagia mediada por LC3B fue inhibida por una pVHL funcional y la ubiquitinación y eliminación de LC3B fue implicado en la muerte celular inducido por autofagia, sin embargo, al inhibir el proteasoma (con pVHL mutado) los resultados fueron contrarios. Esto demuestra que pVHL interactúa con LC3B e inhibe la autofagia mediada por esta proteína por la vía de ubiquitinación y eliminación de LC3B (29).

En otro trabajo se demostró que la pVHL suprime la autofagia inducida por estrés nutricional en células de cáncer renal. Se observó que la pVHL se une directamente al regulador de la autofagia Beclina 1, después de haber sido hidroxilado mediante PHD1 en el residuo prolina 54 de esta proteína. Esta unión inhibió la asociación del complejo Beclina1-VPS34 con ATG14L, de esta forma se inhibió la iniciación de la autofagia en respuesta a deficiencia nutricional. Por otro lado, también se observó que la expresión de Beclina1 no hidroxilada aborta la inhibición de la autofagia mediada por pVHL. Además, los niveles de Beclina 1 hidroxilada son inversamente correlacionados con los niveles de autofagia en células de cáncer de riñón que expresan una pVHL funcional y en pacientes con un pronóstico pobre de cáncer de riñón. Esto revela que pVHL suprime el crecimiento tumoral (30).

En general, la participación de la pVHL en autofagia es poco controversial ya que se ha demostrado que pVHL activa la autofagia o la inhibe. Sin embargo es importante señalar que se debe de tener cuidado en la interpretación de estos eventos ya que los estudios fueron hechos en condiciones y tipos celulares diferentes.

3.2. Control de la senescencia celular

La senescencia celular es el fenómeno del arresto del crecimiento de forma irreversible en respuesta al daño del DNA (incluyendo telómeros cortos), así como también es un mecanismo importante en la supresión de tumor *in vivo*. Interesantemente, se ha reconocido que la oxigenación fisiológica que puede extender el espacio replicativo de las células en cultivo es debido a una desminución relativa de la cantidad de estrés oxidativo. Algunos reportes han confirmado que este fenómeno es en parte debido a la estabilización de HIF (31). Por lo tanto, se ha visto que la inactivación de pVHL estabiliza a HIF e induce senescencia en condiciones *in vitro* e *in vivo* (32), sin embargo, se observó que la senescencia es independiente de la función de HIF y p53. Posteriormente se encontró que la senescencia por la pérdida de la función de pVHL es por la actividad de la proteína retinoblastoma (pRb) y por la proteína p400, ya que se sabe que p400 inhibe a retinoblastoma. Todo lo anterior indica que pVHL activa a p400 para inhibir a retinoblastoma y de esta forma se controla la senescencia celular de una forma independiente de HIF.

3.3. Estabilización de microtúbulos y mantenimiento del cilio primario

El cilio primario es una estructura especializada sobre la superficie celular que sirve como una antena de la célula y regula la transducción de señales químicas y mecánicas. El

axonema ciliar es la unidad básica del cilio y es una estructura circular que tiene nueve subunidades de microtubulos arreglados en dobletes y el axonema nace desde el cuerpo basal o centriolo madre. La pVHL se asocia con los microtúbulos para darle estabilidad y esta función es independiente de HIF y de su actividad E3 ubiquitina ligasa (33). El efecto de la pVHL sobre la dinámica de los microtúbulos está regulado negativamente por “glycogen synthase kinase 3” (GSK-3) (34). Interesantemente, el GSK-3 activo puede promover la estabilidad de los microtúbulos y mantenimiento del cilio en una manera independiente de pVHL, sin embargo, se ha visto también que la inactivación de GSK-3, la estabilidad de los microtúbulos y mantenimiento del cilio recae en la pVHL, por lo cual sugiere que la estabilidad de los microtúbulos puede estar asociado por ambas proteínas (pVHL y GSK-3).

3.4. Regulación de la formación de la matriz extracelular y la adhesión célula-célula

La matriz extracelular es una barrera física que inhibe la migración e invasión de células cancerosas, y a la vez, esta matriz puede proveer señales de sobrevivencia hacia estas células para el mantenimiento de la polaridad celular en contexto con las uniones intracelulares. La pVHL puede unirse directamente a la fibronectina y el colágeno hidroxilado IV; interesantemente, los estudios con mutantes de la pVHL han concluido que la pVHL no tiene la capacidad de unión con la fibronectina y colágeno (35). Las células con deficiencia en la función de pVHL presentan una organización de la matriz extracelualr ineficiente y se ha visto que este efecto es no controlado por HIF. La pVHL tiene la capacidad de poder orquestar la interacción de los componentes de la matriz extracelular y esta función se realiza sin que la pVHL se una al complejo E3 ubiquitina ligasa Cul2-elonginaBC. Además, el arreglo de la matriz extracelular por pVHL está regulado parcialmente por modificaciones post-traduccionales que sufre la pVHL con moléculas tipo ubiquitina (“like-ubiquitin”), como la NEDD8 (36).

También se ha visto que la polaridad celular y el ensamblaje de las uniones intercelulares (ejemplo uniones adherentes y uniones fuerte) no ocurren adecuadamente en la células que carecen de la función de la pVHL y este proceso es también independiente de HIF. Todo lo anterior indica que pVHL está involucrado en el desarrollo de las uniones intercelulares.

3.5. Hipoxia/VHL y el eje lactato-NDRG3-Raf-ERK

La proteína NDRG3 es un blanco de la enzima prolil-hidroxilasa PHD2 (Egln1) y de pVHL, ya que bajo condicones de normoxia, NDRG3 es ubiquitinado y degradado, parecido

a lo que ocurre con HIF. NDRG3 se acumula en condiciones de hipoxia y se une a lactato y posteriormente interactúa con la proteína c-Raf para la activación de la vía Raf-ERK, y de esta manera, se contribuye al crecimiento celular en condiciones de hipoxia. NDRG3 permanece muy estable al unirse con el lactato, inclusive cuando las células están reoxigenadas. Esta interacción molecular sugiere que la respuesta inducida por el eje lactato-NDRG3-Raf-ERK contribuye al mantenimiento de la progresión de un tumor bajo condiciones prolongadas de hipoxia. Este evento significa que NDRG3 actúa como un sensor de lactato inducible por hipoxia que provee una señal hipóxica crucial de regulación dependiente de oxígeno, pero independiente de HIF; por lo tanto, un blanco combinatorio de ambos HIF y NDRG3 podría ser una terapia altamente efectiva para el cáncer (37).

3.6. Eje hipoxia/VHL-AKT-mTOR

La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR está bien establecida su participación en la ruta regulatoria del crecimiento celular. La fosforilación de AKT en los residuos de treonina 308 y serina 473 incrementa su actividad de cinasa para estimular su activación y encender la ruta de señalización hacia mTORC1, esto conduce a un incremento en la actividad de varias rutas anabólicas y biosintéticas para el crecimiento celular y proliferación. La actividad de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR está aumentada en condiciones de hipoxia. En tumores que están en condiciones de hipoxia, el AKT es activado por fosforilación y este evento es a través de la inducción de miR-21 (38), el AKT fosforilado se recluta en la mitocondria para encender el metabolismo glucolítico y mantiene el balance redox en las células tumorales.

Guo y cols mostraron que AKT es activado para promover tumorigenesis en células que carecen de oxígeno o de pVHL funcional. Cuando se reestablece la función de la pVHL en la célula se encontró que pVHL se une al AKT que primeramente fue hidroxilado por PHD2 (EglN1) y esta interacción provoca un efecto de inhibición de la fosforilación y actividad de cinasa de AKT de una manera independiente de HIF (39). Recientemente, Zhang y cols crearon un atlas de proteogenómica de varios cánceres con mutaciones en la pVHL y observaron que estas células tienen una alta actividad de la señal AKT/mTOR (40). Estos estudios sugieren que la pVHL controla la actividad de AKT para inhibir la vía de señalización AKT/mTOR.

3.7. El eje EglN3-VHL-EPOR

La producción de células de glóbulos rojos incrementa la capacidad de llevar oxígeno y capacita el cuerpo a sobrevivir en condiciones duras de hipoxia. Por ejemplo, la

eritropoyetina (EPO) estimula la expresión de su propio receptor de eritropoyetina (EPOR) y esta estimulación del receptor hace encender la vía EPOR-JAK2-STAT5, la cual es responsable para la proliferación celular y diferenciación terminal de los globulos rojos.

La EPOR está regulado por la señalización PHD3 (EglN3)-VHL. Heir y cols encontraron que el recambio del EPOR está regulado por la disponibilidad de oxígeno y a través de la señalización intrínseca de PHD3 (EglN3)-VHL-EPOR. Las prolinas de los residuos 419 y 426 de la región citoplásmica de EPOR son hidroxilados por PHD3, para ser reconocidas por pVHL para la poli-ubiquitinación y su posterior degradación por el proteasoma (41). Sin embargo, el papel funcional del eje EglN3-VHL-EPOR en la hipoxia o en enfermedades asociadas con la pérdida de la función de la pVHL permanecen todavía en estudio.

3.8. El eje VHL-B-Myb

La proteína B-myb es un factor transcripcional que regula el ciclo celular y la condensación y la estabilidad cromosomal. Okumura y cols mostraron que la pVHL puede reconocer a la proteína B-Myb y conducir a la ubiquitinación y a su degradación en el proteasoma, sin embargo, este proceso de degradación puede ser interrumpido por la fosforilación de B-Myb (42). Además, se ha visto que la eliminación del gen *B-myb* incrementa el crecimiento tumoral por la regulación de diferentes genes bajo el control de HIF, sin embargo, el efecto antagónico de B-Myb en la tumorigenesis lo realiza en forma independiente de HIF.

3.9. Otras proteínas reguladas por pVHL

La pVHL tiene otras funciones importantes en las células o enfermedades que por ejemplo son: sinaptogénesis (porque regula a Filamin A (FLNA)), función del centrosoma (porque regula a Cep68) y defensa inmune antiviral (porque regula a “mitochondrial antiviral signaling protein” (MAVS)). Estos procesos regulados por la pVHL son a través de su actividad de E3 ubiquitina ligasa y por la señalización de la prolil hidroxilación. Específicamente, PP5 y AURKA son blanco de la pVHL a través de la regulación independiente de oxígeno (43). MAVS y KLF4 son sustratos de la pVHL, pero se desconoce si esto es dependiente de oxígeno. Por otro lado, se conocen otras proteínas que son dependientes de oxígeno para su ubiquitinación y degradación proteasomal y que están reguladas por la pVHL y estas proteínas son las siguientes: EGFR, atypical protein kinase C, Sprouty 2, adrenergic receptor II, Myb-binding protein 160, RPB1, RPB7, Cep68, IL-32, CERKL, FLNA y ERK5/BMK1 (44). Además, se sabe que la pVHL induce la expresión de la aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) a través de la activación transcripcional directa del

factor de transcripción HNF-4. ALDH2 contribuye en la sensibilidad de las células de cáncer renal hacia el tratamiento con antraciclina. Estos sustratos/reguladores pueden proveer nuevas guías para un mayor entendimiento de las funciones fisiológicas y patologías de la pVHL.

3.10. VHL e infección viral

Los virus secuestran la célula infectada para poder llevar a cabo su replicación viral. Por lo general, los virus inhiben la función de la pVHL para activar a HIF-1alfa en las condiciones de hipoxia. El síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2 (SARS-CoV-2) es el agente etiológico de la enfermedad de coronavirus 2019 (COVID-19). En los casos de COVID-19 fatales y severos se observó que se disparó un estallido de citocinas pro-inflamatorias en los pacientes y con ello una hipoxia sistémica. Se ha demostrado que las proteínas no estructurales 5 y 16 (NSP5, NSP16) de SARS-CoV-2 pueden sobre activar la función de HIF-1alfa y con mayor potencia lo hace el NSP16. La NSP16 interrumpe la interacción de pVHL con HIF-1alfa, y de esta forma inhibe la degradación dependiente de ubiquitina de HIF-1alfa y esto permite a que HIF-1alfa se una al promotor de la IL-6 para inducir su expresión (45). Sin embargo, en otro trabajo se demostró que la Nsp16 puede ser degradado por la vía pVHL en ensayos *in vitro* como *in vivo* y por lo tanto se dice que pVHL puede inhibir la replicación de SARS-CoV (46). Esto es controversial, la función de pVHL en la infección por el virus SARS-CoV-2, requiere de mayor investigación.

En otro sistema se demuestra la utilización de la vía HIF-1alfa para beneficio de la replicación viral. En la infección con el virus de necrosis de riñón y de bazo (ISKNV, por sus siglas en inglés) que afecta a 50 especies de peces, se ha demostrado que durante la infección la hipoxia favorece el incremento de la replicación de ISKNV y que el virus manipula la vía HIF para su beneficio. Esta manipulación es por medio de la proteína VP077R del ISKNV, la cual interacciona con la pVHL, esta interacción inhibe la unión a HIF-1alfa y de esta manera se evita la degradación de éste. Además, se ha visto que VP077R se une con FIH y lo lleva a degradación; de esta manera el virus ISKNV inhibe a la función de pVHL y de FIH para mantener activo a HIF-1alfa (47).

Para el caso del virus de la hepatitis B sucede lo mismo, la proteína X del virus de hepatitis B (HBx) potencia la estabilidad de la proteína de HIF-1alfa y HIF-2alfa. La sobre expresión de HIF-2alfa por el HBx es porque se inhibe la degradación de HIF-2alfa debido que a HBx se une a la pVHL. Por otro lado, HBx también puede activar la ruta del NF-kB para la sobre expresión de HIF-2alfa (48).

Como se sabe, el papilloma virus humano HPV16 está asociado fuertemente con cáncer cervico uterino. Se ha demostrado que la proteína E6 (considerada como oncogénica) de HPV16 promueve la hipoxia inducida por alto consumo de glucosa y esto es debido porque la E6 estorba la interacción entre HIF-1alfa y pVHL. Esta disociación atenua la ubiquitinación de HIF-1alfa porque pVHL pierde su función y esto causa acumulación de HIF-1alfa. Esto sugiere que la oncoproteína E6 juega un papel importante en la regulación de HIF-1alfa por la inhibición de la función de la pVHL (49).

Todos estos eventos demuestran que las proteínas virales interaccionan con la pVHL e inhiben su función y por lo tanto estabilizan a HIF-1alfa como un mecanismo de patogenicidad para la replicación viral.

La proteína adaptadora MAVS se ancla por su propia cuenta a la membrana externa de la mitocondria, donde interacciona con las proteínas sensoras Mda5 o RIG-1, las cuales son sintetizadas en una infección viral. Tanto Mda5 y RIG-1 son dos sensores de RNA citoplásmico que reconocen RNA viral liberado durante la replicación viral. La interacción de MAVS con RIG-1 y Mda5 activa MAVS. El MAVS activado entonces señala corriente abajo hacia las cinasas IKK y TBK1, las cuales inducen las actividades de los factores de transcripción, NF-kB y "IFN regulatory factor 3" (IRF3), para conducir a la producción de interferones (IFNs) tipo I y citocinas proinflamatorias (50). La modulación de la respuesta antiviral es llevada a cabo por la degradación de MAVS, RIG-1 y Mda5 por vía ubiquitinación y degradación por el proteasoma y dependiente de E3 ubiquitina ligasas RNF125 (51).

Recientemente se demostró que la pVHL regula negativamente la inmunidad innata antiviral, la cual actúa principalmente induciendo la degradación de MAVS (también conocido como Cardif, IPS-1 o VISA). Una sobre expresión de la pVHL disminuye la respuesta celular hacia una infección viral, mientras que el "knock-down" de pVHL ejerce el efecto opuesto. Lo anterior sucede porque la pVHL adiciona una cadena de poliubiquitina en el residuo K420 de MAVS, lo cual provoca la degradación proteasomal de MAVS. En un modelo de pez cebra, se observó que después de una infección viral los niveles de MAVS permanecen bajos, pero llegan a ser mucho mas altos en el pez cebra deficiente en el gen *vhl*, además se observó que los niveles muy altos de MAVS correlacionan con una exagerada respuesta antiviral. Este resultado demuestra que la pVHL participa en la regulación de la inmunidad innata antiviral para evitar una exacerbación de citocinas inflamatorias (52).

Finalmente, la pVHL no solamente es una proteína que funciona como componente de una E3 ubiquitina ligasa para degradar a los HIFs, sino que también tiene otras funciones independientes de HIF en varios procesos celulares remarcando la importancia

de su estudio en la célula. Entender el mecanismo de esta proteína es clave en los eventos celulares donde la pérdida de su función puede estar relacionada con sucesos de desarrollo de enfermedades, esto con lleva a que la pVHL podría ser usado como un blanco terapéutico debido a las múltiples actividades que posee en la célula.

Referencias

1. Hippel E, Netzhaut ED, Beobachtungen K. Über eine sehr seltene Erkrankung der Netzhaut. Graefes Archiv Clin Exp Ophthalmol. 1904; 59:83–106.
2. Lindau A. Zur Frage der Angiomatosis Retinae und Ihrer Hirnkomplikationen. Acta Ophthalmol. 1927; 4:193–226.
3. Melmon KL, Rosen SW. Lindau's disease. Review of the literature and study of a large kindred. Am J Med. 1964; 36:595–617.
4. Latif F, Tory K, Gnarr J, et al. Identification of the von Hippel–Lindau disease tumor suppressor gene. Science. 1993; 260:1317–1320.
5. Woodward ER, Buchberger A, Clifford SC, et al. Comparative sequence analysis of the VHL tumor suppressor gene. Genomics. 2000; 65:253–265.
6. Knudson AG. Genetics of human cancer. Ann Rev Genet. 1986; 20:231–251.
7. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. Mol Cell Proteom. 2014; 13:397–406.
8. Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG., Jr. pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:11661–11666.
9. Richards FM, Schofield PN, Fleming S, et al. Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. Hum Mol Genet. 1996; 5:639–644.
10. Leonardi E, Murgia A, Tosatto SC. Adding structural information to the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor interaction network. FEBS Lett. 2009; 583:3704–3710.
11. Lee S, Neumann M, Stearman R, et al. Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von Hippel–Lindau tumor suppressor protein. Mol Cell Biol. 1999; 19:1486–1497.
12. Wang V, Davis DA, Haque M, et al. Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. Cancer Res. 2005; 65:3299–3306.

13. Mandriota SJ, Turner KJ, Davies DR, et al. HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell*. 2002; 1:459–468.
14. Jung YS, Lee SJ, Yoon MH, et al. Estrogenreceptora is a novel target of the Von Hippel-Lindau protein and is responsible for the proliferation of VHL-deficient cells under hypoxic conditions. *Cell Cycle*. 2012; 11:4462-4473.
15. Gamper AM, Qiao X,, Kim J, et al. Regulation of KLF4 turnover reveals an unexpected tissue- specific role of pVHL in tumorigenesis. *Mol Cell*. 2012; 45:233-243.
16. Arias-Gonza L, Moreno-Gimeno I, del Campo AR, et al. ERK5/BMK1 is a novel target of the tumor suppressor VHL: implication in clear cell renal carcinoma. *Neoplasia*. 2013; 15:649-659.
17. Wang J, Zhang W, Ji W, et al. The von Hippel- Lindau protein suppresses androgen receptor activity. *Mol Endocrinol*. 2014; 28:239-248.
18. Sang N, Fang J, Srinivas V, et al. Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 alpha is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. *Mol Cell Biol*. 2002; 22:2984-2992.
19. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001; 292:468–72.
20. Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O2 sensing and cancer. *Nature Rev*. 2008; 8:865–873.
21. Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem*. 2002; 277:26351–26355.
22. Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, et al. The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res*. 2006; 66:3688–3698.
23. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Rev*. 2003; 3:721–732.
24. Vasavada SP, Novick AC, Williams BR. P53, bcl-2, and Bax expression in renal cell carcinoma. *Urology*. 1998; 51:1057–1061.
25. Sanchez-Puig N, Veprintsev DB, Fersht AR. Binding of natively unfolded HIF-1alpha ODD domain to p53. *Mol Cell*. 2005; 17:11–21.
26. Roe JS, Kim H, Lee SM, et al. p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell*. 2006; 22:395–405.

27. Yang H, Minamishima YA, Yan Q, et al. pVHL acts as an adaptor to promote the inhibitory phosphorylation of the NFkappaB agonist Card9 by CK2. *Mol Cell*. 2007; 28:15–27.
28. Ganner A, Gehrke C, Klein M, et al. VHL suppresses RAPTOR and inhibits mTORC1 signaling in clear cell renal cell carcinoma. *Sci Rep*. 2021; 11:14827.
29. Kang HM, Noh KH, Chang TK, et al. Ubiquitination of MAP1LC3B by pVHL is associated with autophagy and cell death in renal cell carcinoma. *Cell Death Dis*. 2019; 10:279.
30. Wang Z, Yan M, Ye L, et al. VHL suppresses autophagy and tumor growth through PHD1-dependent Beclin1 hydroxylation. *EMBO J*. 2024; 43:931-955.
31. Welford SM, Bedogni B, Gradin K, et al. HIF1alpha delays premature senescence through the activation of MIF. *Genes Dev*. 2006; 20:3366–3371.
32. Young AP, Schlisio S, Minamishima YA, et al. VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat Cell Biol*. 2008; 10:361–369.
33. Hergovich A, Lisztwan J, Barry R, et al. Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat Cell Biol*. 2003; 5:64–70.
34. Hergovich A, Lisztwan J, Thoma CR, et al. Priming-dependent phosphorylation and regulation of the tumor suppressor pVHL by glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol*. 2006; 26:5784–5796.
35. Hoffman MA, Ohh M, Yang H, et al. von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Hum Mol Genet*. 2001; 10:1019–1027.
36. Russell RC, Ohh M. NEDD8 acts as a ‘molecular switch’ defining the functional selectivity of VHL. *EMBO Rep*. 2008; 9:486–491.
37. Lee DC, Sohn HA, Park ZY, et al. A lactate-induced response to hypoxia. *Cell*. 2015; 161:595–609.
38. Polytaichou C, Iliopoulos D, Hatzia Apostolou M, et al. Akt2 regulates all akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of mir-21 upon oxygen deprivation. *Cancer Res*. 2011; 71:4720–4731.
39. Guo J, Chakraborty AA, Liu P, et al. PVHL suppresses kinase activity of akt in a proline-hydroxylation-dependent manner. *Science*. 2016; 353:929–932.
40. Zhang Y, Kwok-Shing NP, Kucherlapati M, et al. A pan-cancer proteogenomic atlas of pi3k/akt/mtor pathway alterations. *Cancer Cell*. 2017; 31:820–832.e3.
41. Heir P, Srikumar T, Bikopoulos G, et al. Oxygen-dependent regulation of erythropoietin receptor turnover and signaling. *J Biol Chem*. 2016; 291:7357–7372.
42. Okumura F, Uematsu K, Byrne SD, et al. Parallel regulation of von hippel-lindau disease by pvhl-mediated degradation of b-myb and hypoxia-inducible factor alpha. *Mol Cell Biol*. 2016; 36:1803–1817.

43. Dushukyan N, Dunn DM, Sager RA, et al. Phosphorylation and ubiquitination regulate protein phosphatase 5 activity and its prosurvival role in kidney cancer. *Cell Rep.* 2017; 21:1883–1895.
44. Segura I, Lange C, Knevels E, et al. The oxygen sensor phd2 controls dendritic spines and synapses via modification of filamin A. *Cell Rep.* 2016; 14:2653–2667.
45. Mou X, Luo F, Zhang W, et al. SARS-CoV-2 NSP16 promotes IL-6 production by regulating the stabilization of HIF-1 α . *Cell Signal.* 2024; 124:111387.
46. Yu X, Chen S, Hou P, et al. VHL negatively regulates SARS coronavirus replication by modulating nsp16 ubiquitination and stability. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 459:270-276.
47. He J, Yu Y, Liu W, et al. Molecular mechanism of infectious spleen and kidney necrosis virus in manipulating the hypoxia-inducible factor pathway to augment virus replication. *Virulence.* 2024; 15:2349027.
48. Hu JL, Liu LP, Yang SL, et al. Hepatitis B virus induces hypoxia-inducible factor-2 α expression through hepatitis B virus X protein. *Oncol Rep.* 2016; 35:1443-1448.
49. Guo Y, Meng X, Ma J, et al. Human papillomavirus 16 E6 contributes HIF-1 α induced Warburg effect by attenuating the VHL-HIF-1 α interaction. *Int J Mol Sci.* 2014; 15:7974-7986.
50. Cai X, Chen ZJ. Prion-like polymerization as a signaling mechanism. *Trends Immunol.* 2014; 35:622–630.
51. Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, et al. Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104:7500–7505.
52. Du J, Zhang D, Zhang W, et al. pVHL Negatively Regulates Antiviral Signaling by Targeting MAVS for Proteasomal Degradation. *J Immunol.* 2015; 195:1782-1790.

Capítulo IV

Características de la enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL)

1. La enfermedad/síndrome de von Hippel-Lindau (VHL)

La enfermedad/síndrome de Von Hippel-Lindau (enfermedad VHL o síndrome VHL) es un síndrome multi-sistémico de tipo familiar y de origen genético desde la línea germinal provocada por mutaciones del gen supresor de tumor von Hippel-Lindau (VHL). La enfermedad de VHL es un desorden neoplásico dominante autosomal, en el cual múltiples tumores de tipo benigno y maligno están presentes, así como también quistes. Estos desordenes neoplásicos se desarrollan en el sistema nervioso central (el cerebro, el cordón espinal, la retina y el oído interno) y órganos viscerales (riñón, glándula adrenal, páncreas, epidídimo y ligamentos anchos) (1). A pesar de su clasificación como un desorden dominante, el patrón más común en la enfermedad de VHL es la herencia de una variante genética desde línea germinal (mutación) en un alelo del gen *vhl*, seguido por un segundo cambio somático, que conduce la pérdida del segundo alelo (**Figura 1**). En aproximadamente el 20% de los casos, el síndrome VHL es esporádico, causado por un segundo cambio genético que se expande durante la formación de células reproductivas, o muy tempranamente durante la embriogénesis (2).

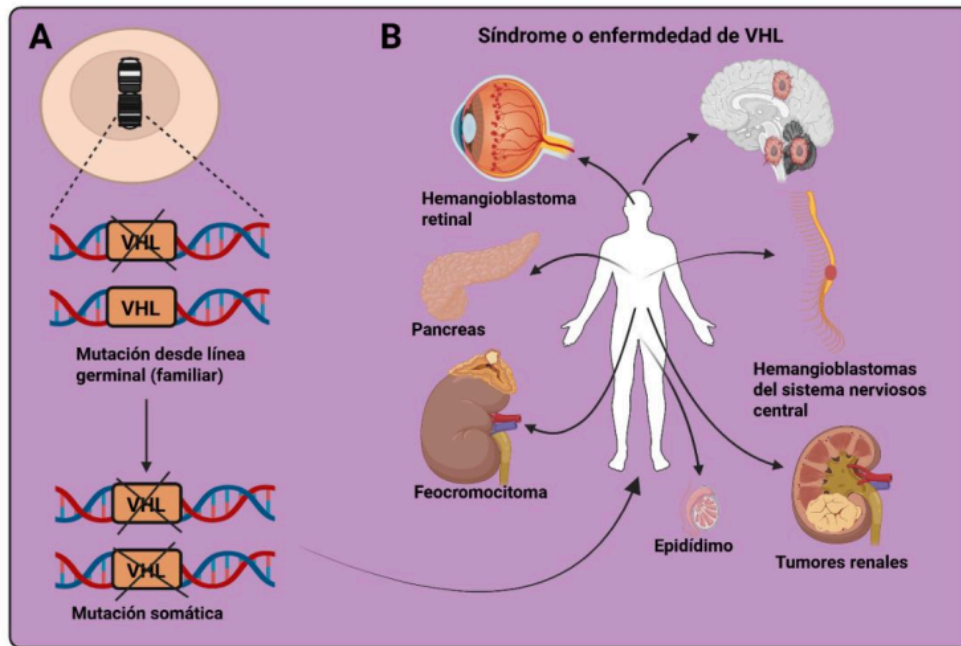


Figura 1. Síndrome o enfermedad de von Hippel Lindau (VHL). El síndrome o enfermedad de VHL se presenta principalmente de forma familiar y por el modelo de dos pasos. Una mutación en un alelo del gen *Vhl* proviene de forma familiar, el segundo evento es una mutación somática en el segundo alelo del gen *Vhl* (A). Los pacientes con la enfermedad de VHL presentan diferentes alteraciones como tumores y quistes en diferentes órganos como el cerebelo, cerebro, el ojo, el cordón del sistema nervioso central, riñón, glándula adrenal, epidídimo, entre otras manifestaciones.

2. Síndrome de VHL

2.1. Criterios para el diagnóstico

Melmon y Rosen, en el año 1964, fueron los primeros en proponer los criterios clínicos para el diagnóstico del síndrome de VHL. Ellos reconocieron los hemangioblastomas del cerebro como el sello distintivo de los tumores de Lindau (3). La enfermedad de Lindau (ahora conocida como VHL) fue definida como la presencia de un hemangioblastoma de cerebro asociado con uno de los siguientes padecimientos: hemangioblastoma retinal, o un quiste pancreático, o anomalías renales o del epidídimo. Ellos reconocieron que la enfermedad de VHL es de naturaleza hereditaria, así como también la penetrancia de las mutaciones y la expresión o manifestación clínica retardada (3). Debido a la herencia, ellos propusieron extender el criterio diagnóstico para aquellos casos donde un sólo miembro de la familia que presente como requisito solamente un hemangioblastomas del sistema

nervioso central podría ser considerado como causal de la enfermedad de VHL familiar. La definición para el diagnóstico de VHL fue posteriormente refinada por Lamiell y otros (4) para incluir una lista más amplia de consideraciones como son los tumores viscerales. Además, otro criterio de diagnóstico para la enfermedad de VHL frecuentemente incluye ambos la parte genética y la clínica (5).

Actualmente por ser un síndrome los criterios usados para el diagnóstico de VHL son variados e incluye los siguientes: hemangioblastomas del sistema nervioso central (incluye hemangioblastoma retinal); tumores del saco endolinfático; carcinoma de células renales (RCC, por sus siglas en inglés), feocromocitoma, paraganglioma y/o tumores de glómus; neoplasmas neuroendocrinos y/o quistes múltiples del páncreas.

El diagnóstico de la enfermedad de VHL es realizado de la siguiente manera. Si un individuo tiene las siguientes combinaciones de manifestaciones de factores genéticos/familiares: en al menos dos de los hemangioblastomas del sistema nervioso central; en al menos un hemangioblastoma del sistema nervioso central y una de las otras manifestaciones descritas arriba; en al menos uno de las manifestaciones descritas arriba y una mutación patogénica en el gen *vhl* o un relativo primer grado con VHL.

Usando los avances en las pruebas genéticas que incluyen la secuenciación del DNA y la semicuantitativa "Southern blotting", una mutación en el gen *vhl* puede ahora ser identificado con una certeza del 100% en el paciente. El diagnóstico de la enfermedad VHL es particularmente un reto aparente para los casos nuevos sin una historia familiar. En estos casos, el mosaicismo en los leucocitos de sangre periférica que no lleva la mutación de VHL podría resultar en una prueba genética falso negativo. Los cuidados de las pruebas clínicas y el análisis de mutaciones en otros tejidos o manifestaciones podrían revelar la presencia de la enfermedad VHL en estas instancias.

2.2. Epidemiología

La incidencia de la enfermedad de VHL es baja y se reporta en los rangos desde 1 en 36000 a 1 en 45000 nacimientos. La enfermedad de VHL tiene una prevalencia de 1 en 38000 a 1 en 91000 personas. Típicamente, la enfermedad de VHL primero se manifiesta en la segunda década de la vida. En el tiempo de detección, el 50% de los pacientes tienen los síntomas. Los hemangioblastomas cerebrales se presentan en un 35% de los casos más comunes. La penetrancia de la enfermedad VHL es en la mayoría completa a los 70 años de edad del paciente. Sin embargo, el uso de equipos con imágenes mejoradas y otras herramientas de diagnóstico, la primera manifestación de la enfermedad se diagnostica

más tempranamente. En un análisis de 82 pacientes holandeses con enfermedad VHL alrededor del 95% de los pacientes presentaron la primera manifestación a los 34 años (6).

Recientemente, investigaciones han reportado evidencia de una progresividad a una edad temprana del inicio de la enfermedad y más severa se presenta en las generaciones sucesivas. Este fenómeno es conocido como una anticipación de la manifestación genética y esto puede ser debido a un encortamiento de la longitud del telómero. La esperanza de vida para los pacientes con la enfermedad VHL, históricamente, ha sido entre 40 y 52 años. Actualmente, a diferencia de la población general, la esperanza de vida en el hombre (59.4 años) es significativamente más alta que la mujer (48.4 años) (7). A pesar del entendimiento y avances en el tratamiento, la esperanza de vida de la enfermedad VHL es la más baja en comparación con otros síndromes de tumores hereditarios comunes (7).

Reportes establecen que la causa mayor de mortalidad podría ser cualquiera de los hemangioblastomas del sistema nervioso central (SNC) o el RCC. Sin embargo, en los pacientes con enfermedad VHL que manifiestan hemangioblastomas SNC, estos tumores son la causa primaria de muerte. La muerte en pacientes con enfermedad VHL es más probable (73%) debido a las causas propias relacionadas a la enfermedad que a causas no relacionadas (7).

3. Tumorigénesis en la enfermedad VHL

La ruta del eje pVHL/HIF ha sido implicado en la tumorigénesis para RCC, retinal hemangioblastomas, hemangioblastomas de SNC y tumores neuroendocrinos del páncreas. La inactivación de la función de la pVHL conduce a incrementar la expresión y estabilización de las proteínas HIF en tumores relacionados con la enfermedad (8). Específicamente, HIF-2alpha es necesario y suficiente para RCC. HIF-2alpha también puede ser requerido para la formación y crecimiento de hemangioblastomas SNC y retinal (8). HIF puede conducir a tumorigénesis por la sobre regulación diferencial de más de 50 genes, que incluyen los genes que codifican para factores de crecimiento (TGF, PDGF), angiogénesis (VEGF) y metabolismo de glucosa (GLUT1, PFK1). Además, HIF puede conducir la activación de genes que afecta el microambiente del tumor como LOX, MMP1. También es posible que la pérdida de la actividad de la pVHL puede conducir a tumorigénesis por la vía de HIF independiente. Como se dijo anteriormente, la pVHL ha sido implicado en la regulación de la apoptosis (inactivación de p53 e incremento de la actividad de NF-kB), estabilización de microtúbulos y regulación de la matriz extracelular (9).

4. Mecanismo de inactivación del gen *vhl*

La mayoría de los pacientes con enfermedad VHL heredan una mutación de línea germinal desde un pariente afectado y un alelo normal desde el pariente no afectado (**Figura 1**). Las mutaciones más comunes de la línea germinal son la mutación con cambio de sentido (27-38%) y mutación sin sentido (13-27%). Grandes deleciones en el gen *vhl* se presentan en un 9-20% o microdeleciones en un 10%, así también re-arreglos del gen en un 25% pueden ocurrir, y estos provienen en su mayoría por mutaciones de línea germinal. Inserciones o mutaciones sitio de "splice" del gen *vhl* son raros (10).

Los eventos de mutaciones somáticas o tejido específico en el gen conducen a inactivación homocigótica del alelo VHL y con carácter tumorigénico. Estos eventos de segundo hit o mutación somática son frecuentemente por la pérdida alélica (49%) o por hipermetilación (35%) del alelo normal. La inactivación somática del alelo sano puede también ocurrir debido a mutaciones puntuales, especialmente en antecedentes de grandes deleciones del locus 3p como un primer hit (11).

5. Correlación del genotipo-fenotipo

La enfermedad VHL ha sido clasificada en los tipos 1, 2 con base a las manifestaciones fenotípicas clínicas que presentan los pacientes. Estos dos tipos clínicos de la enfermedad VHL son clasificados con base a la frecuencia de RCC o feocromocitomas. Paciente que no presenta la manifestación clínica de feocromocitoma es categorizados como enfermedad VHL tipo 1, mientras un paciente con presencia de feocromocitoma es categorizado como tener la enfermedad VHL tipo 2. El tipo 2 es sub-clasificado en tres subtipos, A, B y C, y es con base a la presencia o ausencia de hemangioblastomas y RCC. El tipo 2A y el tipo 2B ambos tienen hemangioblastomas y RCC, la diferencia es que el subtipo 2B no tiene hemangioblastomas, pero si presentan RCC. El tipo 2C, el cual es raro, incluye solamente feocromocitomas, con ausencia de hemangioblastomas o RCC y en algunos casos con la presencia de neoplasia endocrina múltiple. Algunos autores clasifican la presencia de policitemia Chuvash como un tipo 3 de enfermedad VHL pero no está muy bien fundamentada (12).

Con respecto de una asociación entre el fenotipo con el genotipo del gen *vhl*, estudios en familiares ha reportado una relación con las manifestaciones genéticas de VHL. La enfermedad VHL tipo 1 está probablemente asociado con las mutaciones que provocan una severa pérdida de la función de pVHL, estas mutaciones incluyen deleciones, mutaciones sin sentido y otras microdeleciones/inserciones en el gen *vhl*. Las mutaciones con cambio de sentido que provocan a cambios estructurales en la pVHL también están

asociados al fenotipo tipo 1 (13). Una subclasificación en el tipo 1 de la enfermedad se ha propuesto con base a la presencia de deleciones en el gen *vhl* y que también hay presencia de deleciones en el gen vecino o continuo C3 (o también llamado como el gen F10) al gen *vhl*, sin embargo, este evento puede ocurrir con una muy baja incidencia en los casos con RCC. La inactivación del gen *vhl* y el C3 en los casos de RCC está relacionado a una desventaja en el crecimiento para las células tumorales, el cual produce un riesgo más baja significativamente de RCC, esta relación de estos dos genes mutados ha sido propuesto a una subclasificación del tipo 1B en la enfermedad de VHL (14).

La enfermedad tipo 2, alrededor del 78-96% de los casos está asociado con mutaciones con cambio de sentido. Las mutaciones con cambio de sentido presentes en el tipo 2 resulta en una substitución de un aminoácido presente en la superficie de la pVHL y estas mutaciones en estas posiciones pueden predecir un feocromocitoma con alto tiempo de vida (13). En un estudio de 16 familias con enfermedad de VHL tipo 2, desde una región "Black Forest" de Alemania, se observó que todos los pacientes comparten un bajo riesgo de RCC (el cual es clasificado como tipo 2A), estas 16 familias comparten una mutación con cambio de sentido Tyr169His del gen *vhl* indicando que esta mutación tiene un efecto fundador y esto fue confirmado sobre el análisis de haplotipos (15).

Mutaciones con cambio de sentido en el codón 167 (Arg167Gln o Arg167Trp) puede provocar a un fenotipo de enfermedad VHL tipo 2B con un alto riesgo de RCC (60% en pacientes con 60 años de edad) y feocromocitomas (82% en 50 años de edad) (16). Casos raros de familiares con presencia solamente de feocromocitomas están relacionados a tener mutaciones con cambio de sentido específicas en los codones del gen *vhl* en la posición 238, 259 y otras mutaciones puntuales raras (17).

6. Pruebas genéticas

La prueba genética es realizada cuando existe sospecha de la enfermedad VHL ya que la presentación clínica de un paciente es dudosa. Después de obtener una historia médica y una historia familiar, una examinación clínica debe ser realizada al inicio para posteriormente hacer la prueba de mutación en el gen *vhl*. Para hacer la prueba de mutación en el gen, una muestra de sangre periférica es obtenida del paciente. Para el caso de mutación por duplicación y delección del gen una prueba de Southern blotting es usado, en esta prueba puede detectar la delección o perdida completa del gen, además en esta prueba detecta rearrreglos del gen. Para confirmar deleciones del gen una hibridación *in situ* por fluorescencia es adecuada (18). Alternativamente, una prueba de "multiplex ligation-dependent probe amplification" (MLPA por sus siglas en inglés) es también usado para detectar deleciones e inserciones en gen *vhl* (19).

En la actualidad se conocen alrededor de 377 mutaciones en la secuencia nucleotídica del gen, para conocer estas mutaciones la secuenciación del gen *vhl* es adecuada y ésta se realiza secuenciando los exones codificantes y algunos casos los intrones-exones son necesarios (20). Cuando una búsqueda de una mutación falla para identificarla en la muestra de sangre periférica, la búsqueda de DNA desde otros tejidos puede ser útil para confirmar el diagnóstico (**Figura 2**).

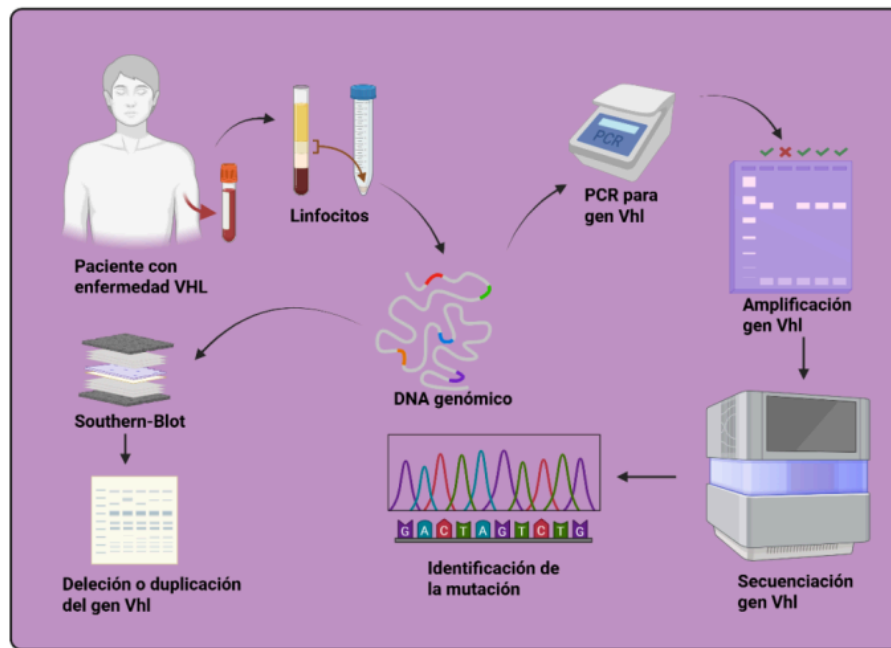


Figura 2. Identificación molecular de mutación del gen *Vhl*. Una vía es la identificación por amplificación del gen *Vhl* y secuenciación. Para la identificación de deleciones o duplicaciones del gen *Vhl* la opción es por “Southern blotting”. Con estos métodos moleculares se confirman las mutaciones en el gen *Vhl*.

7. Tamizaje de la enfermedad VHL

El tamizaje inicial de la línea de trabajo incluye una historia y examinación clínica del paciente; una examinación oftalmológica que incluye fundoscopia, una imagen de resonancia magnética nuclear del eje cráneo-espinal, riñones, páncreas e hígado, una examinación audiológica y pruebas de laboratorio (para detectar feocromocitomas) (19). Las pruebas genéticas de los leucocitos de sangre periférica y/o otros tejidos del cuerpo es

realizado para confirmar la presencia de una mutación del gen *vhl*. La prueba genética podría ser útil en el paciente que presenta manifestaciones clínicas asociadas a la enfermedad de VHL (19).

8. Prevención y asesoramiento genético

El diagnóstico prenatal y pre-implantación en el feto de las mujeres embarazadas con riesgo debido a cualquier pariente familiar que es conocido con la enfermedad de VHL o presenta una mutación en el gen debe ser una alternativa para tomar una decisión de prevenirlo o no hacerlo. Este diagnóstico prenatal se hace empleando las pruebas genéticas y debe ser altamente confiable (21). Para estos casos el asesoramiento genético es importante para prevenir aquellos casos de malas interpretaciones de resultados de las pruebas.

Los efectos secundarios desde las manifestaciones de la enfermedad VHL son mitigables por vigilancia rutinaria y por una temprana detección. El riesgo de cáncer renal podría ser incrementada por exposición a los productos del tabaco y otras toxinas. Deportes de contacto debe ser evitado si lesiones adrenales o pancreáticas son presentes.

9. Manifestaciones clínicas

Los siguientes apartados hablaremos muy general de las manifestaciones clínicas más comunes de la enfermedad VHL.

9.1. Los hemangioblastomas del sistema nervioso central (SNC)

Los hemangioblastomas del SNC son las manifestaciones más frecuentes en la enfermedad VHL, ellos abarcan alrededor del 60 al 80% de los casos. Los tumores más comunes se presentan en el cerebelo, en el tallo cerebral y el cordón espinal. Estos tumores son benignos, y pueden permanecer latentes por muchos años. Sin embargo, el crecimiento del tumor puede causar un efecto por la masa con signos variables y síntomas en el paciente y esto depende sobre la localización y tamaño del tumor. Los pacientes con tumores en el cerebelo o en el tallo cerebral usualmente se presentan con síntomas de presión intracraneal incrementada. Ataxia es un signo común de un tumor en el cerebelo. Los tumores en el cordón espinal pueden ser asociados con dolor neurogénico, déficit sensorial, cambios propioceptivos, paraparesia (una parálisis parcial) e hipertonicidad medular (12).

9.2. Hemangioblastoma retinal

Los hemangioblastomas retinales son las manifestaciones primarias más frecuentes de la enfermedad VHL. La tasa de incidencia ha sido reportada entre 49 a 85%. Mas de la mitad de los pacientes tienen lesiones bilaterales y alrededor de un tercio de los pacientes tienen múltiples lesiones. Las manifestaciones de las hemangioblastomas retinales van desde un rango desde anomalías de los capilares pequeños hasta grandes lesiones que tienen una apariencia típica de un nódulo rojizo con marcada dilatación y vasos aferentes y eferentes tortuosos. Los tumores más grandes pueden conducir a edema retinal, exudados fuertes y desprendimiento retinal exudativo. Cambios fibróticos pueden resultar en el desprendimiento de la retina, el cual pueden conducir a hemorragias en el vitreo, el desarrollo de glaucoma neovascular, y eventualmente en tisis bulbar. Pérdida de la visión es generalmente causado por exudación desde el tumor o por tracción de proliferación glial sobre la superficie del tumor. Las lesiones son mayormente localizadas en la periferia retinal (85%), también ellos son localizados cerca o en el disco óptico, pero son menos frecuentes. La mayoría del hemangioblastoma retinal crece con el paso del tiempo, pero algunos pueden ser estables por un periodo largo de tiempo, o, aunque raro, pueden hasta regresar espontáneamente (22).

9.3. Tumores renales

Los quistes renales benignos y carcinoma de célula renal (RCC) malignos están presentes en dos tercios de los pacientes con enfermedad VHL y por lo regular el RCC es la causa principal de mortalidad en esta enfermedad. El riesgo de RCC varía en los diferentes subtipos de la enfermedad VHL, sin embargo, hasta 45% de los pacientes desarrollan múltiples y tumores bilaterales a la edad de 60 años. Los quistes son usualmente múltiples, bilaterales, y pueden ser precursores de RCCs. Los RCCs asociados con la enfermedad de VHL son siempre del subtipo de células claras. Hay una variabilidad de subtipos de tumores renales con base a la histología, que no hablaremos de ellos. Existe una prevalencia y significancia clínica de las diferentes mutaciones de VHL y deleciones en 3p25 que correlacionan altamente con los diferentes subtipos histológicos de los tumores de riñón; por ejemplo, el RCC de células claras muestra la tasa más alta de mutaciones en el gen *vhl*, excediendo el 80% de todos los casos, en contraste, mutaciones en *vhl* no exceden el 30% en los otros subtipos renales. Estos resultados son importantes para el desarrollo del tratamiento, indicando que el tratamiento anti-VHL no debe ser limitado a los pacientes con RCC de células clara (12).

La mayoría de los casos de RCCs son asintomáticos, pero dolor en la espalda baja o hematuria podría estar presente en el tiempo del diagnóstico. Las lesiones renales frecuentemente crecen lentamente; por lo tanto, lesiones más pequeñas (menos que 2 cm) pueden ser clínicamente manejables. Tumores más grandes que 4.5 cm son usualmente asociados con metástasis (12).

9.4. Feocromocitoma

Los tumores neuroendocrinos, feocromocitomas y paragangliomas se desarrollan desde las células cromafines de la medula adrenal y ganglio parasimpático o simpático, respectivamente. En la mayoría de los casos, los tumores son benignos, aunque la enfermedad metastásica puede desarrollarse en aproximadamente el 25% de los tumores (23). Mas que un tercio y hasta el 50% de las feocromocitomas ocurren como parte de los síndromes hereditarios, incluyendo neoplasias endocrinas múltiples, neurofibromatosis de tipo 1, enfermedad VHL, síndrome paraganglioma-feocromocitoma hereditario, triada Carney y díada Carney-Stratakis.

Las feocromocitomas son usualmente bilaterales y ocurre en temprana edad (12). Los pacientes son frecuentemente asintomáticos. En contraste a los casos de feocromocitoma esporádico, en muchos pacientes con enfermedad VHL no hay producción excesiva de catecolamina por el tumor. Sin embargo, cuando hay sobre producción de catecolaminas, algunos, pero no todos los pacientes presentan con síntomas tales como palpitaciones, sudoración y dolor de cabeza. La feocromocitoma productora de catecolaminas no diagnosticado puede resultar en crisis hipertensiva, falla del corazón, y derrame cerebral. Aproximadamente 3% de los pacientes con enfermedad VHL desarrollan un tumor maligno con metástasis (24).

En conclusión, la pérdida de la función de pVHL por mutación provoca manifestaciones en varios órganos, esto indica que la regulación negativa en pVHL (no mutación) podría estar involucrada esta proteína en enfermedades relacionadas con los órganos como el páncreas, el ojo, cerebro de pacientes con no enfermedad de VHL. En los siguientes capítulos abordaremos la asociación de la pVHL con la no enfermedad de VHL.

Referencias

1. Chittiboina P, Lonser RR. Von Hippel-Lindau disease. Handb Clin Neurol. 2015; 132:139–156.

2. Ding X, Zhang C, Frerich JM, et al. De novo VHL germline mutation detected in a patient with mild clinical phenotype of von Hippel-Lindau disease. *J Neurosurg.* 2014; 121:384–386
3. Melmon KL, Rosen SW. Lindau's disease. Review of the literature and study of a large kindred. *Am J Med.* 1964; 36:595–617.
4. Lamiell JM, Salazar FG, Hsia YE. von Hippel–Lindau disease affecting 43 members of a single kindred. *Medicine.* 1989; 68:1–29.
5. Lonser RR, Butman JA, Huntoon K, et al. Prospective natural history study of central nervous system hemangioblastomas in von Hippel–Lindau disease. *J Neurosurg.* 2014; 120:1055–1062.
6. Kruizinga RC, Sluiter WJ, de Vries EGE, et al. Calculating optimal surveillance for detection of von Hippel–Lindau-related manifestations. *Endocr Relat Cancer.* 2014; 21:63–71.
7. Wilding A, Ingham SL, Laloo F, et al. Life expectancy in hereditary cancer predisposing diseases: an observational study. *J Med Genet.* 2012; 49:264–269.
8. Wang Y, Abu-Asab MS, Shen D, et al. Upregulation of hypoxia-inducible factors and autophagy in von Hippel–Lindau-associated retinal hemangioblastoma. *Graefes Archiv Clin Exp Ophthalmol.* 2014; 252:1319–1327.
9. Li M, Kim WY. Two sides to every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. *J Cell Mol Med.* 2011; 15:187–195.
10. Stolle C, Glenn G, Zbar B, et al. Improved detection of germline mutations in the von Hippel–Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum Mutat.* 1998; 12:417–423.
11. Wait SD, Vortmeyer AO, Lonser RR, et al. Somatic mutations in VHL germline deletion kindred correlate with mild phenotype. *Ann Neurol.* 2004; 55:236–240.
12. Shuin T, Yamasaki I, Tamura K, et al. Von Hippel-Lindau disease: Molecular pathological basis, clinical criteria, genetic testing, clinical features of tumors and treatment. *Jpn J Clin Oncol.* 2006; 36:337–343.
13. Ong KR, Woodward ER, Killick P, et al. Genotype-phenotype correlations in von Hippel–Lindau disease. *Hum Mutat.* 2007; 28:143–149.
14. McNeill A, Rattenberry E, Barber R, et al. Genotype-phenotype correlations in VHL exon deletions. *Am J Med Genet A.* 2009; 149A:2147–2151.
15. Brauch H, Kishida T, Glavac D, et al. Von Hippel–Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. *Hum Genet.* 1995; 95:551–556.
16. Maher ER, Webster AR, Richards FM, et al. Phenotypic expression in von Hippel–Lindau disease: correlations with germline VHL gene mutations. *J Med Genet.* 1996; 33:328–332.

17. Woodward ER, Eng C, McMahon R, et al. Genetic predisposition to pheochromocytoma: analysis of candidate genes GDNF, RET and VHL. *Hum Mol Genet.* 1997; 6:1051–1056.
18. Stolle C, Glenn G, Zbar B, et al. Improved detection of germline mutations in the von Hippel–Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum Mutat.* 1998; 12:417–423.
19. Binderup MLM, Bisgaard ML, Harbud V, et al. Von Hippel–Lindau disease (vHL). National clinical guideline for diagnosis and surveillance in Denmark. 3rd edition. *Dan Med J.* 2013; 60:B4763.
20. Schmidt LS, Linehan WM. Editorial comment. *Urology.* 2014; 83:675.e675. discussion 675.e675–676.
21. Simpson JL, Carson SA, Cisneros P. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for heritable neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005; 34:87–90.
22. Karimi S, Arabi A, Shahraki T, et al. Von Hippel-Lindau Disease and the Eye. *J. Ophthalmic Vis Res.* 2020; 15:78.
23. Ayala-Ramirez M, Feng L, Johnson MM, et al. Clinical risk factors for malignancy and overall survival in patients with pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas: Primary tumor size and primary tumor location as prognostic indicators. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96:717–725.
24. Crespigio J, Berbel LCL, Dias MA, et al. Von Hippel-Lindau disease: A single gene, several hereditary tumors. *J Endocrinol Investig.* 2018; 41:21–31.

Capítulo V

Manipulación genética del VHL

1. Edición del genoma

La edición del genoma de un organismo es un elemento importante para el estudio de los genes y la asociación con una enfermedad. La edición del genoma debe ser específica y controlada para asegurar que únicamente un gen es alterado dentro de los miles de genes que existen. El sistema de recombinación es una estrategia actualmente aceptada y que cumple los requisitos para una buena edición del genoma de un organismo. Este sistema ha sido empleado con gran éxito en el ratón y la utilidad ha sido enorme para entender la función de un gen en una enfermedad. En la actualidad existen sistemas de recombinación de DNA sitio específica que se usan para manipular el genoma del ratón. La aplicación de estos sistemas junto con las técnicas de modificación de un gen blanco en células madre embrionarias (ratones transgénicos) ha hecho posible la modificación del genoma del ratón en una manera deseada. Estas modificaciones pueden ser tan finas como la generación de mutaciones puntuales en un gen específico hasta re-arreglos cromosomales sitio específico. El sistema de recombinación de DNA ha logrado ser una herramienta útil que es posible eliminar un gen de una manera condicional en un patrón de espacio y tiempo deseado, que es conocido como ratones “knock-out”.

La pVHL es un gen represor de tumor y para entender su función se ha utilizado el ratón knock-out en el gen *vhlh* en forma tejido específico y en un tiempo deseado. Para entender la manipulación genética de la pVHL en los ratones knock-out, en este capítulo se tomará puntos sobre las bases de la manipulación o edición genética en ratones y los estudios de ratones knock-out en la pVHL.

2. El sistema de recombinasa sitio específica

La recombinación de DNA se logra mediante el uso de los sistemas de recombinasa sitio específica, que es la base fundamental para la edición del genoma del ratón y el fundamento de este sistema recae en dos elementos básicos: 1) la utilización de una enzima recombinasa y 2) una secuencia de DNA que es específicamente reconocida por la enzima recombinasa. La enzima recombinasa reconoce eficiente y específicamente una secuencia

nucleotídica de DNA consenso con orientación 5' a 3'; esta secuencia de DNA consenso es conocida como el sitio de reconocimiento o sitio de recombinación (**Figura 1A y B**). La enzima recombinasa funciona mediante el reconocimiento de dos sitios de recombinación que están ubicados en una distancia en el DNA, que posteriormente la enzima cataliza la recombinación del DNA entre los dos sitios de recombinación para la modificación del DNA. Dependiendo de la orientación y localización de los dos sitios de recombinación la modificación del DNA por la enzima recombinasa puede generar diferentes eventos: una eliminación (delección) o inserción de una secuencia de DNA que está dentro de los dos sitios de recombinación con la misma orientación (también se conoce como secuencia flanqueada (floxed) por los dos sitios de recombinación) (**Figura 1C**); una inversión de la secuencia del gen cuando los dos sitios de recombinación están en orientación invertidas (**Figura D**); y por último una translocación de DNA cuando los dos sitios de recombinación están en las diferentes cadenas de DNA (**Figura 1E**) (1).

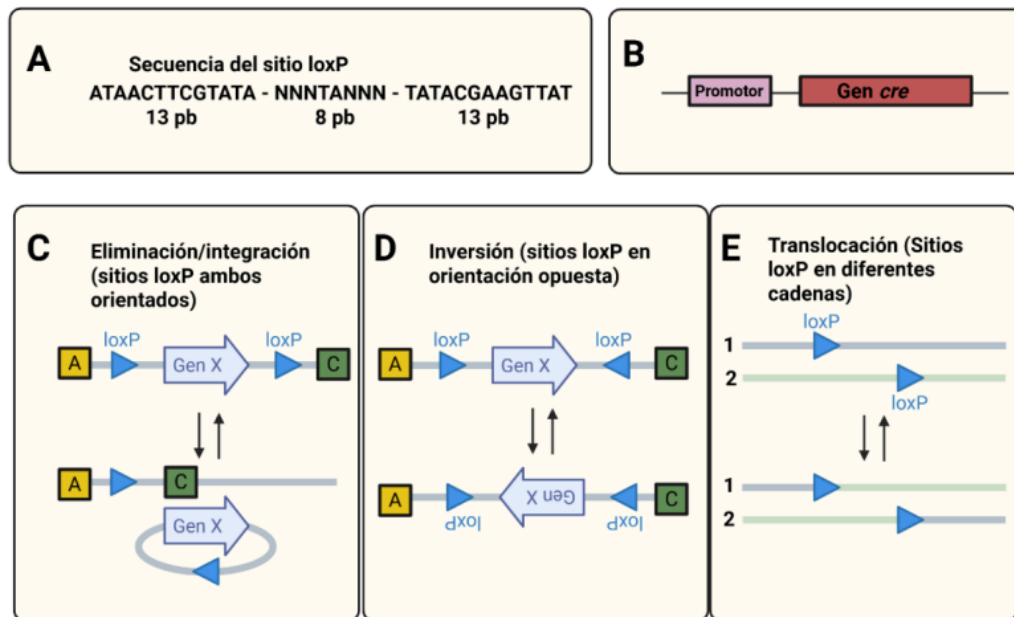


Figura 1. El sistema loxP-Cre. (A) Se muestra la secuencia consenso del sitio loxP que es reconocido por la enzima recombinasa (enzima Cre). La letra N significa cualquier nucleótido. (B) El gen *cre* es expresado bajo un promotor deseado o célula/tejido específico. Arreglos posibles dependiendo de la orientación de los sitios loxP. Cuando los sitios loxP están en la misma orientación el gen que está flanqueado por los sitios loxP (Gen X) se elimina o se integra (C). Cuando los sitios loxP están en orientación opuesta el gen X se invierte en la orientación (D). Cuando los sitios loxP están en cadenas diferentes provoca un intercambio de cadenas (E).

Actualmente, hay dos tipos de sistemas de recombinasas que han sido aplicados en experimentos de gen dirigido: el sistema Cre-*loxP* del bacteriófago P1 (2) y el sistema Flp-

FRT de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (3). La enzima recombinasa es Cre y Flp y el sitio de recombinación es *loxP* y *FRT* para los sistemas Cre-*loxP* y Flp-*FRT*, respectivamente. Cada una de estas enzimas recombinasas (Cre o Flp) reconocen una secuencia consenso de 34 pares de base que consiste en 13 pares de bases repetidos invertidos que flanquean un “core” no-palindrómico de 8 bp el cual define la orientación de la secuencia del sitio de recombinación (*loxP* o *FRT*) (**Figura 1A**). Por otro lado, la enzima recombinasa funciona de forma autónoma con alta fidelidad de reconocimiento del sitio de recombinación, no es necesario cofactores o elementos de secuencia DNA adicional (no recombinación homologa) para la eficiente recombinación. Otra característica, la recombinación puede suceder a grandes distancias (Mb) y en un amplio rango de tipos o estadios celulares *in vitro* e *in vivo*. Si se desea eliminar una secuencia de DNA, por ejemplo, un gen, entonces un sitio de recombinación (ya sea *loxP* o *FRT*) debe estar al inicio del gen y el otro sitio de recombinación debe estar al final del gen, esto es lo que se conoce como la secuencia flanqueada (floxed) o más común alelo condicionado. Estas propiedades hacen los sistemas Cre-*loxP* y Flp-*FRT* muy útiles para la modificación de DNA sitio específica, especialmente para generar alelos condicionados en el ratón (1).

3. Diseño básico

Los dos elementos básicos del sistema de recombinasa, la enzima recombinasa y el sitio de recombinación, se genera por separado en el genoma del ratón, es decir se genera un ratón que posee el alelo condicionado (el gen blanco flanqueado con los sitios de recombinación) (**Figura 2A**) y por otro lado, un ratón transgénico para la enzima recombinasa (**Figura 2B**). La línea de ratón transgénico a la recombinasa puede tener la característica de que la enzima se exprese en cualquier tipo de célula o tejido o que se exprese de forma única y específica a un tejido o tipo de célula. Para el último caso, la enzima recombinasa está bajo el control de un promotor tejido o célula específica. En este sentido se conocen una gran lista de promotores que funcionan únicamente en un tejido o célula específica (Tabla 1), esto con la finalidad de que la recombinasa se exprese únicamente en el tejido o célula específica. La línea de ratón que lleva el alelo condicional se diseña con el gen blanco flanqueado por dos sitios de recombinación (ya sea *loxP* o *FRT*) y este diseño debe ser en los dos alelos del gen blanco, el alelo condicional no es necesario que esté en un tejido o célula específica.

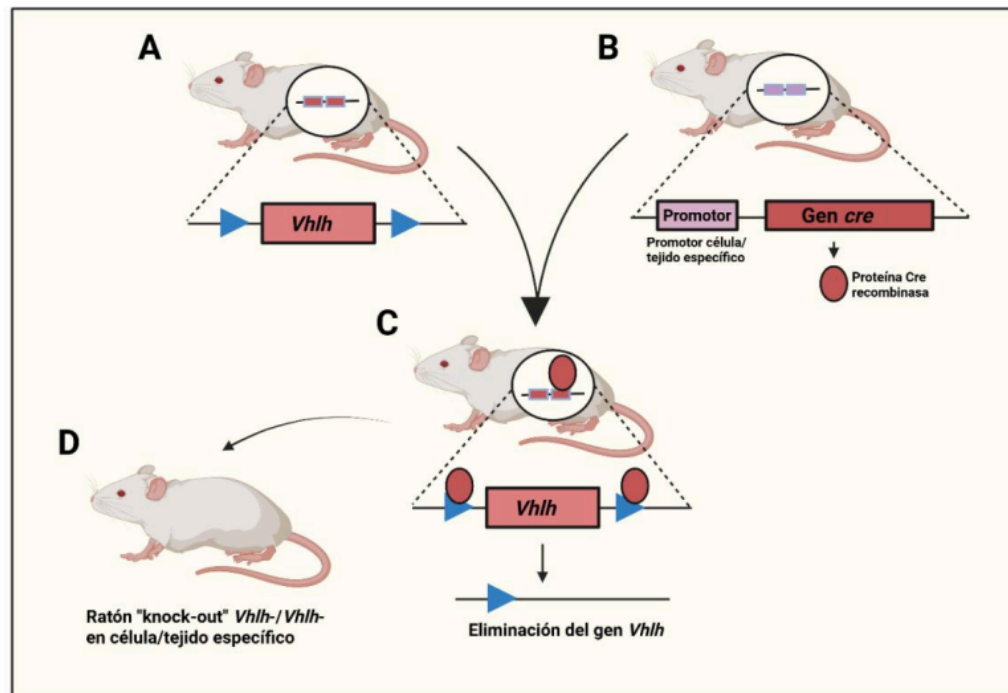


Figura 2. Generación de ratones knock-out para el gen *vhlh* por el sistema loxP-Cre. Por un lado, se genera un ratón transgénico desde la línea germinal con el gen deseado a eliminar (en este caso el gen *vhlh*) flanqueado con los sitios loxP (A). Por aparte se genera otro ratón transgénico para el gen *cre* que está regulado bajo un promotor célula o tejido específico para que la proteína Cre se exprese únicamente en la célula o tejido elegido (B). Ambos ratones se cruzan para que se elimine el gen *vhlh* por el sistema loxP-Cre que puede ocurrir en un solo alelo (heterocigoto) (C) y después de otra serie de cruces se obtiene un ratón que no tiene el gen deseado (*vhlh*) en ambos alelos (D).

Para generar el evento de la eliminación del gen blanco, las dos líneas de ratón se cruzan para obtener el ratón transgénico doble (la recombinasa y el alelo condicionado) en este ratón (**Figura 2C**) en el cual se producirá el evento de knock-out del gen blanco en un alelo (heterocigoto) y posteriormente en el segundo alelo para llegar a obtener el ratón knock-out homocigoto (**Figura 2D**). Este evento de eliminación del gen blanco ocurre porque la célula específica expresará la enzima recombinasa y esta enzima reconocerá los dos sitios de recombinación en el genoma de la célula y efectuará la recombinación eliminando el gen blanco. Este solo ocurrirá en la célula o tejido específico, mientras el gen blanco permanece intacto y funcional en las células de los otros tejidos que no expresen la enzima recombinasa. Una ventaja importante de este diseño binario es que ofrece una gran versatilidad para los estudios de función del gene, por ejemplo, una línea de ratón con alelo

condicionado puede ser cruzado con diferentes líneas de ratón Cre para estudiar la función del gen en tipos de células diferentes o tejidos (1).

La generación de ratones equipados con sistemas de recombinación sitio específica (Cre-*loxP* o Flp/*FRT*) es un sistema potencial para estudiar la función del gene tejido específico y para crear un mejor modelo de enfermedad humana. El éxito en el logro del ratón knock-out depende sobre la expresión consistente de la recombinasa *in vivo* y del diseño cuidadoso del alelo condicional.

4. Sistema Cre-*loxP* inducible (CreERT)

Al generar un ratón knock-out para un gen blanco llega a suceder que el ratón se muere en la fase embrionaria, como es el caso del ratón knock-out para la pVHL, por el cual no puede estudiarse este gen. Para lograr el estudio de aquellos genes blancos con funciones vitales durante el desarrollo del ratón se generó un nuevo sistema de recombinasa Cre-*loxP* modificado para hacerlo inducible la función de la enzima recombinasa. Esto se basa en modificar la enzima Cre para que se exprese o funcione de forma inducible y en un tiempo deseado (en el ratón maduro). Un sistema Cre inducible está controlado por los elementos regulatorios específicos de la célula (promotores y potenciadores) que regulan la expresión de Cre y por otro lado, inducible es por inductores exógenos para que funcione o se active la enzima Cre; estos inductores que se emplean es el tamoxifeno (tam) o tetraciclina (tet) (4).

El sistema Cre inducible por tamoxifeno está basado por una modificación de la proteína Cre, el cual Cre está fusionado con el dominio de unión de ligando del receptor de estrógeno (ER-LBD, por sus siglas en inglés). La proteína Cre fusionada es llamada como CreER recombinasa inducible por tamoxifeno (también conocido como CreERT, Cr-ER^T). La proteína CreERT se expresa en la célula específica (bajo el control de un promotor célula/tejido específico) y normalmente está presente en el citoplasma de la célula, pero CreERT está inactivo porque se une con la proteína de choque térmico 90 (HSP90), esta interacción evita que CreERT tenga actividad funcional en el núcleo celular. Al ratón transgénico puede ser tratado con tamoxifeno en el tiempo deseado y esto provoca que el tamoxifeno (tamoxifeno como tal o un derivado como el 4-hidoxitamoxifeno; 4-OHT) se une al dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno fusionado a Cre y esta unión permite la separación de la HSP90 de la CrERT. El CreERT libre se transloca al núcleo de la célula y la interacción de Cre con los sitios loxP para realizar la recombinación y eliminación del gen blanco. En este sistema, el tamoxifeno es sistémicamente administrado por la vía inyección intraperitoneal (**Figura 3A**) (5).

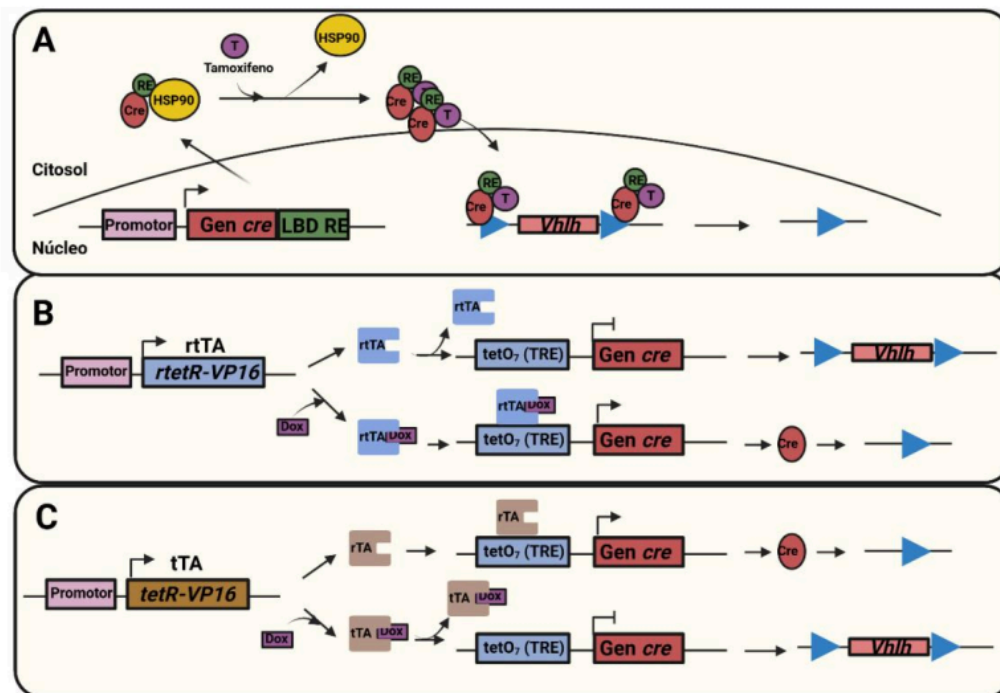


Figura 3. Ratón knock-out inducible. (A) El sistema loxP-Cre inducido por tamoxifeno se enciende cuando se administra tamoxifeno al ratón que posee el sistema loxP-Cre inducible. Este sistema consiste en que el gen *cre* esta fusionado con el dominio de unión del ligando (LBD, por sus siglas en inglés) del receptor de estrógeno (RE). La proteína CreRE se expresa durante todo el tiempo, pero es inactiva por la unión de la chaperona HSP90. La administración de tamoxifeno al ratón provoca la liberación de la chaperona y la proteína CreRE se introduce al núcleo para reconocer los sitios loxP y eliminar el gen deseado (en este caso el gen *vhlh*). (B) El sistema es inducido por tetraciclina o derivados de este compuesto (Dox) mediante el factor de transcripción rtTA dependiente de Dox. Este sistema se conoce como Tet-on. La proteína rtTA se produce bajo un promotor, esta proteína en ausencia de Dox no se une a la secuencia de reconocimiento tetO₇ y como consecuencia no se transcribe el gen *cre* y no se produce la eliminación del gen. Cuando se administra tetraciclina (Dox), éste se une al factor de transcripción rtTA provocando la unión a la secuencia tetO₇ y la transcripción del gen *cre* para producir la proteína Cre y reconocer los sitios loxP y eliminar el gen. El sistema Tet-on es empleado para encender en un tiempo deseado el proceso de eliminación del gen en el ratón. (C) El sistema Tet-off. El sistema no se induce cuando Dox se une al factor de transcripción tTA. El factor de transcripción tTA se produce y en ausencia de Dox se une específicamente a la secuencia tetO₇ y transcribe el gen *cre* para llevar a cabo su función. Cuando se administra Dox al ratón, este compuesto se une a tTA para apagar su función de transcripción y no producir la proteína Cre. Este sistema se usa para parar la eliminación de un gen en un tiempo deseado.

Otro sistema inducible y temporal es el sistema tetraciclina (Tet), también llamado sistema Cre inducible por doxyciclina (Dox; un derivado de tetraciclina). Dox es mucho

mas costosos, pero muy eficiente en el control del “Ter receptor” (TetR) que la tetraciclina. Este sistema es disponible en dos modos, Tet-on y Tet-off, el cual permite la activacion del gen dependiente de Dox (6) o la inactivación. El sistema Tet consiste de tres elementos: “reverse tetracycline-controlled transactivator” (rtTA), “tetracycline-controlled transactivator” (tTA) y “tetracycline responsive element” (TRE o tetO₇; 7 repetidos de tetO) presente en un promotor. El sistema Tet regula la expresión del gen *cre* y esta regulación es debido a que el gen *cre* corriente arriba tiene el TRE tipo tetO₇. La proteína rtTA o tTA reconoce y se une a la secuencia tetO₇ para activar o reprimir, respectivamente, la transcripción del gen *cre* y esta unión es dependiente del ligando tetraciclina o Dox.

En el sistema “Tet-on”, la proteína rtTA se une al ligando Dox, el cual puede unirse a la secuencia tetO₇ y activa la expresión del gen *cre*, cuando no hay Dox entonces rtTA no se une a la secuencia tetO₇ (**Figura 3B**). Para el caso del sistema “Tet-off”, la proteína tTA se une a la secuencia tetO₇ normalmente (sin presencia de Dox) y transcribe el gen *cre*, sin embargo, la presencia de Dox, este ligando se une a tTA y provoca la liberación de tTA de la secuencia tetO₇ el cual inactiva la expresión de Cre (Tet-off”) (**Figura 3C**). Estos dos sistemas no están en el mismo ratón, son en ratones separados y dependiendo de las necesidades de encendido (“Tet-on”) o apagado (“Tet-off”) del sistema de recombinasa es el uso de cada uno de ellos. En el sistema Tet, la doxiciclina es usualmente administrada en el alimento o en el agua para beber (7).

Debido a la gran utilidad del sistema Cre-*loxP*, numerosas líneas de ratón transgénicos de Cre inducibles y/o Cre órgano específico han sido creados y algunos están en proceso de desarrollo. El uso de promotores tejido específico es otro elemento importante para la expresión de Cre, el cual resumimos algunos de los más comúnmente promotores/potenciadores tejidos específicos usados en las líneas de ratones Cre (**Tabla 1**). Por otro lado, existen varias dependencias que promueven el uso de promotores de Cre que son seleccionados y resumidos sobre las organizaciones [International Mouse Phenotyping Consortium \(IMPC\)](#), [Mouse Genome Informatics \(MGI\)](#), [The Jackson Laboratory \(JAX Cre repository\)](#) y la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tabla 1. Promotores célula/tejido específico. Se enlista un resumen de los promotores más representativos para cada sistema u órgano.

Sistema u órgano	Tejido/célula	Promotor específico
	Epidermis	Krt5
		Krt10

Piel		Krt14
		Krt18
	Folículo piloso	Lgr6
Digestivo	Intestino	Car1
		Vil1
	Hígado	Alb
	Páncreas	Sox9
		Gcg
		Ghlr
		Ins 1 y 2
Esqueleto	Osteoblasto	BGLAP
		Colla1
		Sp7
	Condrocito	Acan
		Col10a1
Sistema Nervioso	Cerebro	Aldh111
		Dlx1
		Gad2
		Nes
	Cerebelo	Pcp2
	Cordón espinal	Cdh3
		Htr6
	Células T	CD2
		CD4
		CD8
		Foxp3

Sistema inmune	Células B	CD19
	Macrófagos	Lyz2
	Células dendríticas	CD11c
	Tejido hematopoyético	CD45
		Ly5
		Vav

5. Ratones knock-out en la pVHL

Una primera línea de ratón knock-out para la pVHL fue la eliminación del gen *vhlh* (el homólogo del gen *vhl* humano) desde la etapa embrionaria. El gen *vhlh* fue eliminado por el método de recombinación homóloga en células madre embrionarias murinas para generar una línea de ratón con alelo VHL inactivado, tanto heterocigótico (un solo alelo eliminado) como homocigótico (ambos alelos eliminados). Mientras el ratón heterocigótico VHL (+/-) aparece fenotípicamente normal, el ratón homocigótico VHL -/- muere en el útero entre los días 10.5 al 12.5 de gestación (E10.5 a E12.5). Los embriones VHL -/- homocigóticos presentan un desarrollo normal hasta el E9.5 a E10.5, después de estas etapas embrionarias se presenta un desarrollo de falta de génesis normal de la placenta. La vasculogénesis embrionaria de la placenta falla en los ratones VHL -/-, el cual presenta el desarrollo de lesiones hemorrágicas en la placenta. Subsecuentemente, la hemorragia en los embriones VHL -/- causa necrosis y muerte del embrión. Estos resultados indican que la expresión de VHL es crítica y vital para el desarrollo vascular normal en el embrión (8).

Debido a que la eliminación homocigótica del gen *vhlh* murino resulta en letalidad embrionaria, entonces es necesario emplear el sistema de recombinasa Cre-loxP inducible para estudiar el efecto de la pérdida de la pVHL en los diferentes órganos del ratón. El sistema CreERT-loxP inducible por tamoxifeno es el más usado para generar ratones knock-out en la pVHL, en este libro para simplificar todos los ratones knock-out en la pVHL son generados por el sistema CreERT-loxP inducible principalmente por tamoxifeno. A continuación, se abordará los efectos de la pérdida de la pVHL en los diferentes tejidos o células del ratón.

La inactivación del gen *vhlh* en el ratón específicamente en todos los elementos celulares del cartílago produce un crecimiento más lento que el ratón control (sin pérdida del gen *vhlh*) y desarrolla un severo enanismo. Además, se observa alteraciones en una tasa reducida de proliferación del condrocito, un incremento de la matriz extracelular del cartílago y presencia de células con fenotipo atípica. Esto indica que la pVHL tiene un

papel crucial en el desarrollo del hueso endocondrial y es necesario para la proliferación del condrocito normal *in vivo* (9).

La relación entre pVHL y el desarrollo de células T fue estudiado en ratones knock-out en el gen *vhlh* específica en el timocito, la pérdida de la función de la pVHL resulta en una actividad transcripcional de HIF-1alfa en esta célula, así como también el ratón presenta un fenotipo de talla pequeña. El ratón knock-out en la pVHL tiene una reducción marcada en el número total de timocitos CD4+/CD8+ y la reducción celular está asociada con un aumento de apoptosis *in vivo* e *in vitro* en los timocitos. Por otro lado, la inactivación de HIF-1alfa (por knock-out) en los timocitos deficientes en la pVHL restablece la celularidad del timocito, así como también en la viabilidad del timocito *in vitro*, esto sugiere que la regulación de HIF-1alfa por la vía pVHL es requerido para el desarrollo y viabilidad del timocito normal (10).

En el caso de la colitis intestinal, un ratón knock-out en el gen *vhlh* y otro ratón knock-out para HIF-1alfa fueron generados. La colitis en el ratón con eliminación de HIF-1alfa tiene signos clínicos más severos (mortalidad, pérdida de peso, colon alargado), mientras que el ratón con eliminación de la pVHL presenta un nivel de incremento de HIF-1alfa y genera protección en la colitis, además una marcada expresión de genes protectivos de la barrera intestinal como “multidrug resistance gene-1”, “intestinal trefoil factor” y CD73. En la colitis intestinal, la pVHL tiene una participación indirecta y la actividad de HIF-1alfa protege contra esta enfermedad (11).

La eliminación de la pVHL en las células glomerulares del riñón de ratón es suficiente para iniciar una glomerulonefritis creciente necrotizante y con una alta expresión del gen *Cxcr4* inducida por la actividad de HIF; por otro lado, el bloqueo con un anticuerpo anti-*Cxcr4* en el ratón knock-out para el gen *vhlh* presenta una mejoría. Este resultado indica el papel de protección de pVHL contra el desarrollo de la glomerulonefritis del ratón (12). En el mismo sentido, el podocito es una célula componente del glomérulo del riñón con una función de barrera de filtración. La pérdida del gen *vhlh* específico en el podocito genera glomerulomegalia y glomeruloesclerosis ocasional, a pesar de preservar el desarrollo glomerular. La inactivación de gen *vhlh* en el podocito *in vitro* resulta en una desventaja de sobrevivencia significativa, particularmente cuando el podocito se estimula con un agente pro-apoptótico. Estos eventos sugieren que la pVHL tiene una función de contrarrestar la progresión de la enfermedad glomerular posiblemente por hipoxia (13).

3

La proteína fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) es una enzima que cataliza la reacción de hidrólisis del grupo fosfato del fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato. PTEN es considerada una proteína supresora de tumor que controla la división y muerte celular por medio de la inactivación de la ruta de señalización PI3K-AKT/PKB y ella está

asociada con varios tipos de cáncer. Con la finalidad de estudiar PTEN y pVHL en la formación de tumor del tracto genital, un ratón knock-out en PTEN y otro ratón knock-out en pVHL fueron generados en el epitelio del tracto genital. La inactivación de PTEN o de pVHL en los ratones fallan en producir un fenotipo de tumor, sin embargo, el ratón con doble knock-out en la pVHL y PTEN produce un tumor del tracto genital benigno con regiones de metaplasia escamosa y cistadenoma (14). En otro trabajo similar el ratón con doble knock-out en PTEN y pVHL produce la formación de quistes en un periodo corto (15). Estos resultados demuestran que ambas proteínas PTEN y pVHL están relacionadas para controlar la supresión del tumor del tracto genital.

La eliminación de la pVHL en la célula beta del páncreas conduce a un fenotipo de intolerancia a la glucosa severa en el ratón adulto. La célula beta requiere a pVHL y es un elemento crítico para la función de esta célula. La producción de insulina es normal en el ratón knock-out en la pVHL pero con respecto a la secreción de esta hormona es errónea cuando el ratón está en una condición de concentración alta de glucosa, así también, la pérdida de la pVHL provoca una desregulación de las enzimas glucolíticas, el cual señala que la pVHL puede regular adecuadamente la homeostasis energética de la célula beta e indica que la pVHL puede estar asociado con la diabetes (16).

La eliminación de la pVHL en el hígado de ratón provoca una pérdida de la homeostasis del hierro y en la regulación de la expresión del péptido hepcidina *in vivo* (17). La hepcidina es una hormona que controla el metabolismo del hierro en el hígado y también la homeostasis del oxígeno, por el cual la pérdida de la función de esta hormona puede generar anemia. La hepcidina es un péptido pequeño sintetizado en el hígado, es un regulador clave de la absorción de hierro y homeostasis en el animal. La producción de hepcidina se incrementa por una sobre carga de hierro y decrementa por la anemia e hipoxia. En el mismo grupo de trabajo, el ratón con una doble knock-out en la pVHL y HIF-1alfa produce una estabilización de la proteína HIF-2alfa y genera una expresión baja de la hormona hepcidina y esto es a través de un incremento de la eritropoyetina durante la eritropoyesis. Esto indica que la pVHL regula la estabilidad de HIF-2alfa para una expresión adecuada de hepcidina en el contexto de una respuesta adaptativa hacia la anemia por deficiencia de hierro (18). Por otro lado, un ratón con eliminación de la pVHL heterocigótica (un solo alelo eliminado) en el hígado desarrolla hemangiomas cavernosos, que histológicamente estos tumores están asociados con esteatosis hepatocelular y proliferación focal de vasos pequeños. Los hepatocitos con pérdida de la pVHL resulta en una esteatosis severa, muchas cavidades vasculares llenas de sangre y vascularización incrementada dentro del parenquima hepático, el cual sugiere que la pVHL regula la esteatosis hepática (19).

La inactivación de la pVHL en una subpoblación de células del túbulo distal del riñón resulta en lesiones de hiperplasia en las células clara, una inflamación severa y fibrosis. Este mismo ratón también desarrolla un sobrecrecimiento vascular (hemangioma) dependiente de HIF-2alfa y una eritropoyesis extramedular en el hígado. Esto indica que los leucocitos derivados de la médula ósea están involucrados en el proceso del daño del hígado (20). En el mismo sentido, otro grupo de investigación generó un ratón knock-out en la pVHL específico en los ductos colectores y un subgrupo de túbulos distales del riñón. Este ratón muestra una disrupción epitelial e inflamación intersticial a los 2 meses de edad, con lesiones de quistes, fibrosis severa e hiperplasia. Por otro lado, el ratón knock-out en HIF-1alfa no produce las lesiones anteriormente mencionadas. Todo esto señala que la pVHL es un elemento importante en la regulación negativa del desarrollo del carcinoma de célula renal de célula clara (21).

En el caso del pulmón, la pVHL tiene una participación en la fibrosis. La expresión de pVHL es elevada en pulmón fibrótico de ratón y humano y esta sobre producción de pVHL estimula la proliferación del fibroblasto. Para entender con mas detalle esta función de la pVHL, un ratón con eliminación de la pVHL en el fibroblasto muestra elevación en los eritrocitos, hematocrito, contenido de hemoglobina y activación de HIF y sus genes blancos. Al inducir la fibrosis en el pulmón con bleomicina en el ratón knock-out se observa una acumulación de colágeno, proliferación de fibroblastos, diferenciación y desregulación de proteínas de matriz. Estos resultados indican que la pVHL es un controlador clave en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (22).

6. Péptidos de penetración

Otra estrategia terapéutica de tipo no genético es la introducción de la proteína de forma exógena a la célula blanco para restablecer la función. Como es sabido, las proteínas es difícil que puedan penetrar a una célula por la membrana celular, salvo que sea por vía receptor o endocitosis, en este sentido existen péptidos que tienen la función de penetrar las células de una forma eficiente. Los péptidos de penetración celular (PPC), también conocidos como péptidos con dominio de transducción de proteína o péptidos Troyanos, son péptidos de estructura diversa y con propiedades fisicoquímicas determinadas que permiten a travesar la membrana citoplasmática de la célula. Los PPC comparten características comunes: primero, ellos son péptidos cortos conformados entre 5-30 aminoácidos y ellos tienen la habilidad de cruzar la membrana celular. La célula puede capturar el PPC por una vía dependiente o independiente de energía. El mecanismo de penetración del PPC depende de algunos factores para la eficiencia como son: el tipo de célula, la masa y estructura de la carga, la forma de unión, la concentración de PPC y el

tiempo de incubación. Los mecanismos de penetración del PPC a la célula más comunes son la endocitosis y la translocación directa; en el caso de la endocitosis esta puede ser por la ruta de la clatrina o independiente de clatrina. La desventaja que tiene PPC es que carece de selectividad por la célula, el cual PPC puede introducirse en la célula blanco como también en la célula no blanco del tejido sano.

Debido a su baja citotoxicidad e inmunogenicidad, PPC ha sido aplicado *in vitro*, así como también *in vivo* (23) con muy buenos resultados. El primer PPC descubierto fue en 1988 (24) que corresponde al péptido TAT que es derivado de la proteína “human immunodeficiency virus-1” (HIV-1). En actualidad existen otros PPC como el pVEC derivado de la secuencia caderina de ratón y otros PPC quiméricos y sintéticos como transportan, MPG, MAP y R6W3.

Las aplicaciones de PPC han sido amplias y es un método para el transporte de partículas terapéuticas a través de la membrana celular. Numerosos estudios han confirmado su potencial uso *in vitro* e *in vivo* (25), como elementos para introducir dentro de la célula proteínas de interés y nanopartículas, así como también ácidos nucleicos. Por ejemplo, estudios preclínicos exitosos en fase I, II y III incluye el uso de TAT conjugado con proteínas. Los datos obtenidos de estas pruebas clínicas con TAT han mostrado que el uso de PPC para terapia clínica es posible, ya que este método está bien tolerado y directo hacia blancos intracelulares. Hasta el momento, la penetración de péptidos ha sido usado en pruebas clínicas que incluye sobre el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, dolor, pérdida auditiva y hasta para arrugas faciales (26).

Una de las primeras pruebas clínicas de fase III terminada es el uso de TAT en combinación con un inhibidor de c-Jun cinasa, el llamado XG-102, este PPC a base de TAT es seguro para inhibir la inflamación intraocular y reducir el dolor en pacientes que sufren cirugía de catarata. Otro miembro del inhibidor de c-Jun cinasa conjugado con TAT (compuesto AM-111) ha sido usado en el estudio sobre el tratamiento de la pérdida auditiva en prueba clínica de fase III (27).

Por otro lado, con respecto a la edición genética de un genoma PPC ha sido usado como vehículo de entrada para las proteínas Cre recombinasa, “nucleasas zinc-finger”, “transcription activator-like effector nucleases” (TALENs) y “clustered regularly interspaced short palindromic repeats” (CRISPR/Cas9) de una forma exitosa para la modificación genética (28). En general los PPC son considerados como otra alternativa para la introducción de una proteína de interés en una célula blanco para restablecer su función.

Con respecto a pVHL existe un trabajo donde un fragmento funcional de pVHL está conjugado con el péptido TAT denominado TAT-VHL. El TAT-VHL ha sido demostrado su capacidad de penetración y funcionalidad en células madre derivadas de piel. Las células madre de piel fueron expuesta al TAT-VHL a una concentración adecuada y posteriormente

se observó que la TAT-VHL tuvo funcionalidad en estas células debido a la diferenciación de las células madre a células de tipo neurona (29). Esto muestra que el manejo de la pVHL puede ser por medio del uso de los PPC para aquellos casos de restauración de la función de la pVHL en las células o tejidos donde el gen *vhl* está alterado.

En este capítulo se resumió la función de la pVHL en diferentes órganos por medio del uso de ratones knock-out, en los siguientes capítulos se abordaron con más detalle la función de la pVHL en enfermedades donde existe más información.

Referencias

1. Kwan KM. Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis*. 2002; 32:49-62.
2. Lakso M, Sauer B, Mosinger B Jr, et al. Targeted oncogene activation by site specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:6232–6236.
3. Dymecki SM. Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:6191–6196.
4. McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2017; 7: 1-12.
5. Brocard J, Warot X, Wendling O, et al. Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:14559-14563.
6. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*. 1995; 268:1766-1769.
7. Kim H, Kim M, Im SK, et al. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*. 2018; 34:147-159.
8. Gnarr JR, Ward JM, Porter FD, et al. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:9102-9107.
9. Pfander D, Kobayashi T, Knight MC, et al. Deletion of *Vhlh* in chondrocytes reduces cell proliferation and increases matrix deposition during growth plate development. *Development*. 2004; 131:2497-2508.
10. Biju MP, Neumann AK, Bensinger SJ, et al. *Vhlh* gene deletion induces Hif-1-mediated cell death in thymocytes. *Mol Cell Biol*. 2004; 24:9038-9047.
11. Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, et al. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest*. 2004; 114:1098-1106.
12. Ding M, Cui S, Li C, et al. Loss of the tumor suppressor *Vhlh* leads to upregulation of *Cxcr4* and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat Med*. 2006; 12:1081-1087.

13. Bruckamp K, Jim B, Moeller MJ, et al. Hypoxia and podocyte-specific Vhlh deletion confer risk of glomerular disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293:F1397-1407.
14. Frew IJ, Minola A, Georgiev S, et al. Combined VHLH and PTEN mutation causes genital tract cystadenoma and squamous metaplasia. *Mol Cell Biol*. 2008; 28:4536-4548.
15. Frew IJ, Thoma CR, Georgiev S, et al. pVHL and PTEN tumour suppressor proteins cooperatively suppress kidney cyst formation. *EMBO J*. 2008; 27:1747-1757.
16. Puri S, Cano DA, Hebrok M. A role for von Hippel-Lindau protein in pancreatic beta-cell function. *Diabetes*. 2009; 58:433-441.
17. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*. 2007; 117:1926-1932.
18. Mastrogriannaki M, Matak P, Mathieu JR, et al. Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica*. 2012; 97:827-834.
19. Haase VH, Glickman JN, Socolovsky M, et al. Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:1583-1588.
20. Bader HL, Hsu T. Inactivation of the tumor suppressor gene von Hippel-Lindau (VHL) in granulocytes contributes to development of liver hemangiomas in a mouse model. *BMC Cancer*. 2016; 16:797.
21. Pritchett TL, Bader HL, Henderson J, et al. Conditional inactivation of the mouse von Hippel-Lindau tumor suppressor gene results in wide-spread hyperplastic, inflammatory and fibrotic lesions in the kidney. *Oncogene*. 2015; 34:2631-2639.
22. Zhou Q, Chen T, Zhang W, et al. Suppression of von Hippel-Lindau Protein in Fibroblasts Protects against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016; 54:728-739.
23. Khafagy S, Morishita M, Isowa K, et al. Effect of cell-penetrating peptides on the nasal absorption of insulin. *J Control Release*. 2009; 133:103-108.
24. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 1988; 55:1189-1193.
25. Regberg J, Eriksson JN, Langel U. Cell-penetrating peptides: From cell cultures to in vivo applications. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013; 5:509-516.
26. Efficacy of AM-111 in patients with acute sensorineural hearing loss. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00802425>, 2014.
27. Efficacy and safety of AM-111 as acute sudden sensorineural hearing loss treatment (ASSENT). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02809118>, 2017.
28. Rádis-Baptista G, Campelo IS, Morlighem JR, et al. Cell-penetrating peptides (CPPs): From delivery of nucleic acids and antigens to transduction of engineered nucleases for application in transgenesis. *J Biotechnol*. 2017; 252:15-26.
29. Kanno H, Kubo A, Yoshizumi T, et al. Isolation of multipotent nestin-expressing stem cells derived from the epidermis of elderly humans and TAT-VHL peptide-mediated neuronal differentiation of these cells. *Int J Mol Sci*. 2013; 14:9604-9617.

Capítulo VI

VHL en la piel

15

1. La piel

¹ La piel es la cubierta externa del humano y uno de sus órganos más extensos. Actúa como una barrera protectora que aísla al organismo del medio ambiente, protegiéndolo y contribuyendo a mantener íntegra las estructuras; funciona también como un sistema de comunicación con el entorno y es uno de los principales órganos sensores, ya que contiene terminaciones nerviosas que actúan como receptores de tacto, presión, dolor y temperatura. La piel está formada por dos capas principales la epidermis y la dermis. Las células principales que forman la epidermis se llaman queratinocitos. La epidermis tiene otras células como los melanocitos que dan la pigmentación a la piel y células de Langerhans y linfocitos, que se encargan de dar protección inmunológica. La epidermis crece constantemente, pero mantiene siempre el mismo espesor debido a un proceso de descamación. Las células situadas en el estrato germinativo se dividen frecuentemente y forman células hijas que emigran progresivamente desde la profundidad hasta la superficie, donde acaban por desprenderse. La epidermis está conformada de estratos y depende de la diferenciación de los queratinocitos; el estrato germinativo o capa basal es el más profundo, el estrato espinoso que son células con forma poligonal con alto contenido de tonofibrillas, el estrato granuloso que contiene gránulos basófilos de queratohialina (la precursora de la queratina) y estrato córneo que está formado por células planas queratinizadas anucleadas.

7

Con respecto a la dermis, se encuentra debajo de la epidermis, tiene la característica de presentar una gran abundancia de fibras de colágeno y elásticas producidas por los fibroblastos que se disponen de forma paralela y le confieren la consistencia y elasticidad de la piel. En la dermis se encuentran los anexos cutáneos como los pelos y uñas (córneos) y glandulares como las sebáceas y sudoríparas, además de poseer de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas (Figura 1).

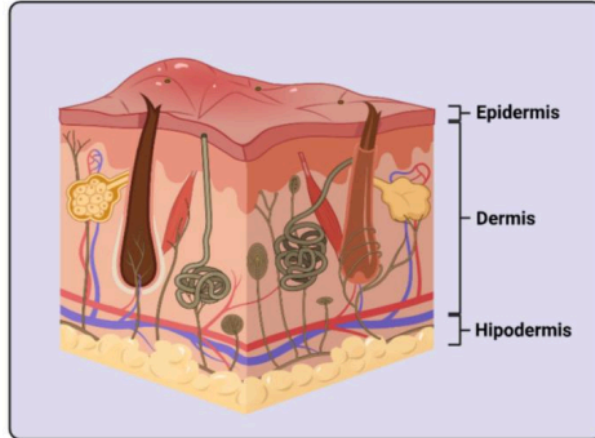


Figura 1. Estructura de la Piel. La piel se divide en tres capas, la epidermis que posee los queratinocitos y es una estructura estratificada dependiendo del proceso de diferenciación de los queratinocitos; la dermis constituida por células de fibroblastos, matriz extracelular y diferentes tipos de glándulas; por último, la hipodermis que corresponde a tejido adiposo.

En la piel, como cualquier otro órgano, se presentan procesos normales como patológicos y en este capítulo revisaremos la participación de la pVHL en la piel.

2. Restauración de la piel y pVHL

La piel puede sufrir aberturas o heridas por traumas o en los procesos quirúrgicos, por lo que la reparación de una herida es un proceso coordinado por varios eventos fisiológicos. La reparación de heridas es un proceso dinámico que involucra interacciones complejas de moléculas de la matriz extracelular, mediadores solubles, varias células residentes e infiltrado de subtipos de leucocitos. El objetivo inmediato en la reparación de una herida es lograr la integridad del tejido y la homeostasis. El proceso de reparación de una herida involucra tres pasos, que llega a sobreponerse en el tiempo y en el espacio, nombrado: inflamación, re-epitelización y remodelamiento del tejido. La re-epitelización es acompañado por un incremento de la proliferación de queratinocitos y una guía de migración de ellos. Estos procesos requieren de cambios ordenados en el comportamiento y fenotipo de los queratinocitos, el cual son dictados por un intercambio entre los queratinocitos y los fibroblastos dermales, un ejemplo es la comunicación epitelial-mesenquimal. Este intercambio demanda la integración de diversas señales a través de una red de factores solubles ejerciendo actividad autocrina y paracrina en el ambiente de

la herida, culminando en respuestas celulares apropiadas (1). Las aberraciones a esta red de señalización pueden ocasionar eventos de migración o proliferación erróneas, provocando a una insuficiente o excesiva reparación de la herida y que puede ser una amenaza de un sobre crecimiento para formar un tumor. Por lo tanto, para entender los efectos de cualquier molécula en la función celular normal, estudios dentro de su papel en esta red de señalización y como ellos culminan a una respuesta celular apropiada llega ser fundamental y necesaria.

2.1. TAK1 en la restauración de la piel

La cinasa activadora del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta)-1 (TAK1) pertenece a la familia de MAPK cinasas. Esta serina/treonina cinasa es un intermediario clave en las citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) e interleucina 1 (IL-1) (2), así como también en la ruta de señalización del TGF-beta (3). TAK1 activado tiene la capacidad de estimular la cascada de MAPK y la cinasa "NF-kB-inducing cinasa-IkB". TAK1 lleva a cabo esta señalización por la activación de "c-Jun N-terminal cinasa" (JNK) y p38 MAPK el cual esta ruta desemboca en la activación del factor de transcripción NF-kB (2). Estudios de "knok-out" en TAK1 específico en las células del queratinocito de ratón confirman el papel de TAK1 en la inflamación de la piel. Además, estos ratones despliegan una epidermis anormal con diferenciación errónea, incrementada proliferación celular y desarrollan micro-abscesos intraepidermales, y estos ratones mueren al día 7 después de nacimiento (4). Aunque el papel de TAK1 en la respuesta inflamatoria está bien establecido, el papel de TAK1 y su mecanismo de acción en la proliferación y migración de los queratinocitos se desconoce.

Como se indicó, la proliferación y la migración celular es importante en la reparación de una herida y son dos eventos importantes en la re-epitelización. En primera instancia, el perfil de expresión de TAK1 durante la reparación de la herida en el ratón muestra que la expresión del mRNA y la proteína de TAK1 es elevada y en un tiempo temprano en el epitelio de la zona de la herida, comparada con su expresión basal en la piel sin herida. Este evento también ocurre en piel ulcerada humana. Esto indica un papel importante de TAK1 durante la re-epitelización de la piel que ha sufrido una herida (5) **(Figura 2).**

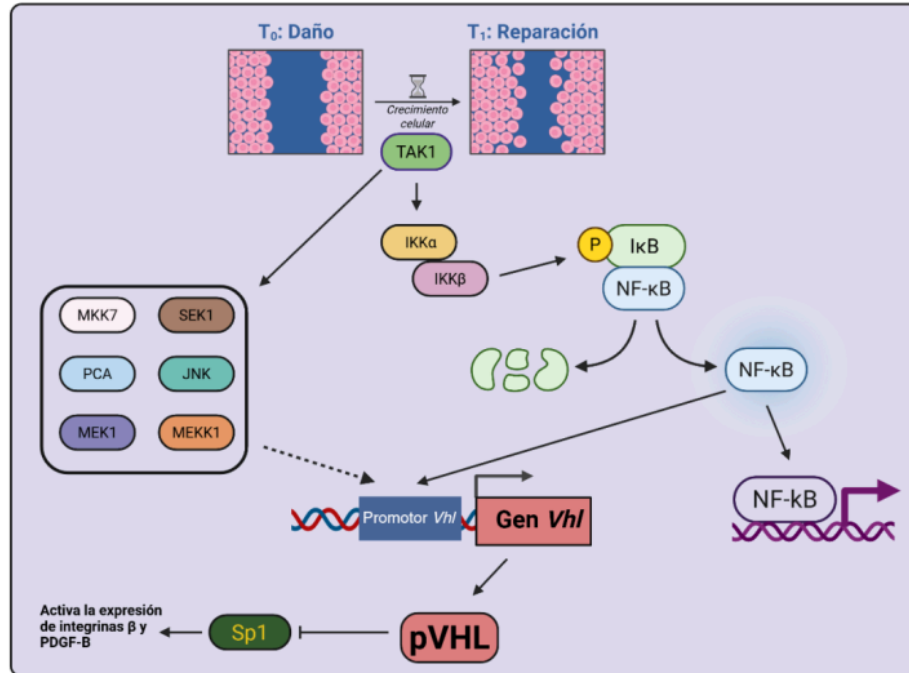


Figura 2. Reparación de una herida en la piel. La proteína TAK1 está involucrada en la reparación de una herida en la piel, esta proteína en el queratinocito activa el complejo IKK para encender la ruta del NF-κB. El factor de transcripción NF-κB transcribe otros genes dependientes de él, uno de ellos es el gen *vhl*. Por otro lado, TAK1 puede activar otras proteínas (mostradas del lado izquierdo) y éstas al parecer participan en la activación del promotor del gen *vhl*. La producción de la proteína VHL (pVHL) inactiva a la proteína Sp1 que está involucrada en la expresión de integrinas beta y PDGF-B.

Con respecto a la migración celular, las células deficientes en TAK1 migran más rápido que aquellas cuando el TAK1 es expresado de forma normal. Las proteínas involucradas en la migración celular Cdc42, Rac1 y RhoA son más activas en las células deficientes de TAK1, esto indica que TAK1 ejerce una función de retraso de la migración celular, así como también en la proliferación, por otro lado, en las células deficientes de TAK1 existe un incremento en la expresión de las integrinas Beta1 y beta5 y PDGF/HGF, esto indica que TAK1 regula negativamente la expresión de estas proteínas (5).

2.2. TAK1 y pVHL en la restauración de la herida

En los últimos años se ha visto una relación entre la actividad de TAK1 con la pVHL en el proceso de reparación de una herida de la piel. La activación de TAK1, al inicio de la herida, provoca una estimulación de los mediadores IKKalfa/beta, MKK7 y JNK (6); los queratinocitos transfectados con las proteínas IKKalfa/beta y TAK1 estimulan la actividad promotora del gen *vhl*, así también se reporta que otros elementos como MKK7, JNK, proteína cinasa A, MEK1, MEKK1 y SEK1 pueden estar regulando la expresión de la pVHL humana. El promotor del gen *vhl* tiene un sitio de unión putativo del factor de transcripción NF-kB (7); una mutación sitio dirigida en el sitio de unión de NF-kB en el promotor del VHL abate el efecto estimulante de IKKalfa/beta y TAK1 en los queratinocitos. En los queratinocitos deficientes en TAK1 muestran una reducción en la fosforilación de NF-kB (p65) y una débil detección del pVHL, sin embargo, la restauración de la expresión de TAK1 en los queratinocitos muestra lo contrario, un incremento de la expresión de la pVHL y fosforilación de NF-kB. Además, por ensayos bioquímicos se ha demostrado que la NF-kB (p65) se une específicamente en el sitio de unión de NF-kB presente en el promotor del gen *vhl*. Esto indica que la señalización TAK1/IKK/NF-kB es necesaria para la inducción de la expresión de pVHL en el queratinocito (5) (**Figura 2**).

Por otro lado, se ha detectado que en el promotor de los genes PDGF-B e integrinas beta1, beta3 y beta5 se encuentran elementos putativos de unión al factor de transcripción Sp1. Por lo tanto, la proteína Sp1 se une a estos sitios de unión en los promotores de estos genes, excepto para integrina beta3. No obstante, también se sabe que la pVHL se puede unirse a la proteína Sp1 e inhibir su actividad en la célula del queratinocito; como se mencionó que la carencia de TAK1 reduce la expresión de pVHL, entonces la ausencia de pVHL permite que Sp1 quede libre para unirse y transcribir estos genes blancos. Para corroborar esto se trabajó con el queratinocito deficiente en TAK1 pero transfectado con el gen *vhl* y se observó una reducida expresión de integrina beta1 y beta5 y PDGF-B, y la ausencia de Sp1 en los promotores de estos genes. Por otro lado, también se tiene demostrado que la expresión del mRNA y de la proteína VHL durante la reparación de una herida muestra una correlación con la expresión de TAK1 en tiempo temprano. Estos resultados muestran que TAK1/NF-kB sobre regula la expresión de pVHL, el cual se une al factor de transcripción SP1 e impide la expresión de PDGF-B e integrinas durante la reparación de la herida (5).

La regeneración y mantenimiento del epitelio para cerrar la herida es orquestada por interacciones epitelio-mesenquimal (fibroblastos) y regulada por la acción de quimiocinas y factores de crecimiento (8). La señalización PDGF-B/HGF juega un papel importante en la proliferación epidermal, y esta señalización está controlada por TAK1. Esto indica que los queratinocitos liberan PDGF-B pero estas células no tienen los receptores alfa-PDFG o beta-PDFG para reconocerlo; entonces las células blanco para

PDGF-B son los fibroblastos dermales. El PDGF-B actúa sobre los fibroblastos para incrementar la producción de HGF y este factor es el que estimula la proliferación del queratinocito (9). Esto indica que, para regular la proliferación del queratinocito por el HGF, TAK1 activa a NF- κ B para inducir la expresión de pVHL y la pVHL secuestra al factor de transcripción Sp1, el cual es requerido para la expresión de PDGF-B y de forma de retroalimentación regular la producción de HGF en el fibroblasto (**Figura 2**). El efecto de TAK1 en los queratinocitos epidermales es de tipo homeostático durante la formación epidermal, modula la proliferación celular por una vía paracrina doble, que involucra a los fibroblastos dermales, lo cual enfatiza la importancia de la comunicación epitelial-mesenquimal en la regulación de la proliferación epidermal (5).

2.3. HIF en la restauración de la herida

La piel, aunque es el órgano más expuesto al aire, paradójicamente siempre está en un ambiente relativamente hipóxico, ya que el oxígeno se toma de la sangre (10), por lo tanto, HIF-1alfa siempre está presente de forma constitutiva en la capa basal epidermal.

En recientes años se ha demostrado que HIF-1alfa participa en los eventos de cierre de una herida. En el área cercana de una herida se encuentra en un estado altamente hipóxico por la propia pérdida de estructuras vasculares y el alto consumo de oxígeno por la llegada de una respuesta inflamatoria (11). Este microambiente hipóxico potencia la actividad de HIF-1alfa y promueve la liberación de un número de factores angiogénicos (como VEGF) que regula la sobrevivencia de las células endoteliales que migran y proliferan para la formación de nuevos capilares y esto mejora la revascularización y reparación de la herida (12). Todo esto es demostrado con ratones “knock-out” en HIF-1alfa en las células de queratinocito, donde el aumento de nuevas células endoteliales no ocurre y el cierre de la herida es retardada (13); HIF-1alfa, además de inducir la producción de VEGF, potencia la movilidad de los queratinocitos y fibroblastos dermales a través de su influencia sobre la expresión de metaloproteinasas de matriz e integrinas (14), así como también activa las cascadas de proliferación celular, sobrevivencia y migración. Todo esto señala que HIF-1alfa es un potenciador de la reparación de heridas.

Con respecto a HIF-2alfa, existe evidencia que señala que HIF-2alfa tiene un comportamiento diferente al de HIF-1alfa. En el caso de la piel, el modelo murino de “knock-out” de HIF-2alfa en los queratinocitos con expresión normal de HIF-1alfa demuestra una aceleración del cierre de la herida. Además, el modelo murino con delección de ambos pVHL y HIF-2alfa específicamente en los queratinocitos demuestra un aumento potenciado en la expresión de HIF-1alfa y una sustancialmente acelerada cierre de la herida, lo cual es más evidente durante el inicio de la fase de reparación de la herida

y con una respuesta inmune más baja comparada con la herida de un ratón normal. Esto señala que en el queratinocito existe una función opuesta entre HIF-1alfa y HIF-2alfa, donde HIF-1alfa potencia el cierre de una herida y HIF-2alfa retarda este proceso en la piel (15).

3. VHL en el ciclo celular de Xeroderma pigmentoso grupo C

La Xeroderma pigmentoso, abreviada como XP, es una rara enfermedad hereditaria de la piel que tiene carácter autosómico recesivo y en donde el paciente homocigoto recesivo muestra una marcada tendencia a desarrollar cáncer de piel como consecuencia de la exposición al sol. Los homocigotos son frecuentemente asintomáticos, es decir, no desarrollan la enfermedad. La XP es causada por un mal funcionamiento de los mecanismos de reparación del ADN.

La XP está asociada con un defecto en el mecanismo de reparación del DNA dañado por la luz ultravioleta, concretamente es el sistema de reparación por escisión de nucleótido (NER, por sus siglas en inglés). La lesión más significativa que produce la luz ultravioleta sobre el DNA consiste en la formación de los dímeros de timina; dos timinas adyacentes en una misma cadena de DNA se unen covalentemente, determinando problemas muy serios en el proceso de replicación del DNA, que finalmente explican de forma molecular las alteraciones que presenta los pacientes con XP. La enfermedad es consecuencia de la mutación de cualquiera de los nueve genes XP implicados en la reparación del ADN: DDB2, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, POLH, XPA, y XPC. Las personas con XP necesitan protección total contra la luz solar. Se distinguen cinco formas clínicas: la forma oculo-cutánea, representada por el XPC; la forma neuro-cutánea, que se ve esencialmente en el XPA; la forma neurológica sin afectación cutánea ni ocular, XPB; la forma variante, representada por el XPV que está asociada con otras enfermedades.

Los fibroblastos de pacientes con XP son útiles para comprender la enfermedad, sin embargo, la obtención de líneas celulares a partir de fibroblastos XP es un reto. Previos intentos para immortalizar fibroblastos XP para la obtención de una línea celular a partir de la introducción de construcciones genética que codifican para el antígeno T grande del virus SV40 han sido exitosos en XP de los grupos B y C y fue extremadamente raro en la XPV, incluso hasta cuando las células fueron co-transfectadas con el virus de papiloma humano 16 o tratados con radiación ionizante (16). En un caso la transfección de SV40 resultó en la immortalización de fibroblastos del grupo XPC, probablemente esto fue generado a través de una selección de un cariotipo peculiar entre aquellos fibroblastos transformado con SV40 parentales (16).

Por otro lado, en un estudio reportado mostraron que una línea de células de fibroblastos (GM2995) derivada de la piel aparentemente normal de un paciente con XPC sometidas a

repetidas serie de pases de cultivo *in vitro* presento cambios característicos del fenotipo transformante celular. Estos cambios morfológicos incluyen aneuploidía, espacio de vida prolongada y la habilidad para crecer bajo condiciones independientes de adhesión en agar suave (17). Defectos en la progresión del ciclo celular y en puntos de chequeo están asociados a contribuir a los procesos de carcinogénesis. Interesantemente, la función de algunos genes involucrados en estas rutas en los fibroblastos XPC transformados están correlacionados con la pérdida de la función de p53, un regulador clave del ciclo celular, y con la pérdida de la habilidad de p53 para transactivar sus genes blancos p21^{Waf1} y HDM2 sobre la exposición a agentes de daño del DNA como la radiación ionizante. Estos resultados sugieren que la transformación está asociada con inestabilidad genética en los fibroblastos de XPC. Esta inestabilidad podría conducir hacia el desarrollo de mutaciones de p53, así como también en una pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto celular (18).

En varios trabajos se ha visto que la pVHL tiene una función importante en la regulación de la salida del ciclo celular por privación de suero (19). En caso de las células de fibroblastos transformados de XPC irradiadas con luz UVC entre los pases de cultivo celular 9 y 28 mostraron que la pVHL de 30 Kda se expresó en el pase 9 de las células y en el pase 28 las células exhibieron la expresión de una proteína adicional de 37 Kda que reacciona con el anticuerpo anti-VHL. La expresión de esta proteína adicional que es inmunorreactiva con el anticuerpo anti-VHL en las células de pase tardía correlaciona con la carencia de la acumulación de p27^{Kip1}. Esto indica que probablemente la pVHL junto con la p27^{Kip1} inhiben la función de p53 y el proceso de transformación de los fibroblastos de XPC se puede asociar con la pVHL, y que probablemente esta proteína altera la expresión/función de algunos productos de genes que participan en las rutas de señalización de la regulación del ciclo celular (18).

3.1. La pVHL y reparación del DNA

Cuando una base nucleotídica está alterada en una cadena del DNA, ésta tiene que ser reparada para conservar la integridad de la secuencia del DNA; existen varios sistemas de reparación del DNA y uno de ellos es la reparación por escisión del nucleótido (NER, por sus siglas en inglés). En este sistema participan un complejo de proteínas y la mutación en alguno de ellos provoca la enfermedad de XP como se dijo anteriormente. La reparación de un nucleótido del DNA también puede ocurrir durante el proceso de transcripción. En el paso del alargamiento de la transcripción puede existir un reconocimiento de una alteración en la cadena de DNA y por lo tanto hay un arresto de la función de la RNA polimerasa II (RNA pol II) por una señal o censo para que participe el sistema NER. Después de la señal, la RNA pol II tiene que ser removido por el complejo NER para ganar

acceso hacia el sitio de daño al DNA. Esta remoción puede ser por dos mecanismos: a) un movimiento retrasado de la RNA pol II y b) degradación de la RNA pol II por ubiquitinación. Los mecanismos no están bien clarificados, sobre todo para el caso de la ubiquitinación de la RNA pol II, sin embargo, se ha demostrado que en levadura la poliubiquitinación y degradación de la subunidad grande de Pol II (Rpb1) es mediante la actividad de la E3 ubiquitina ligasa conformada por las elonginas C y A, culina 3 y el RING finger proteína Roc1 (Rbx1) y probablemente la pVHL (20), sin embargo, en las células humanas no se ha determinado el papel de la pVHL sobre la RNA pol II.

Por otro lado, el compuesto ecteinascidin 743 (Et743; también llamado como trabectedina) tiene actividad contra diferentes modelos de cánceres, inclusive se usa como un tratamiento para sarcomas de tejido blando y en pruebas clínicas para cánceres de ovario, mama, próstata y para sarcomas pediátricos. El mecanismo de acción de Et743 es dependiente sobre la reparación por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción (es decir una reparación durante la transcripción). Et743 es también conocido como un potente inhibidor de la transcripción, ya que se une al DNA el cual arresta la RNA pol II y logra reclutar el complejo NER y por lo tanto elimina la RNA pol II y paro de la transcripción. De esta manera, la actividad anti-proliferativa de Et743 es dependiente sobre el complejo NER en los casos de XP, donde hay deficiencia de la función de NER. Al estudiar el efecto de Et743 sobre la RNA pol II en las líneas celulares isogénicas de XPD y XPD-C se observó que la línea celular XPD no presento efecto de degradación de la RNA pol II, mientras que la RNA pol II fue rápidamente degradada en las células XPD-C. También se observó que cuando las células fueron tratadas con un inhibidor del proteasoma (MG132) no hubo degradación de RNA pol II por el compuesto Et743, sin embargo, en el caso de las células deficientes del complejo NER provenientes de XPA, XPG y XPF, el Et743 no pudo degradar la RNA pol II. Estos resultados muestran que el complejo de reparación del DNA NER es requerido para la degradación de la RNA pol II en respuesta al compuesto Et743 (21).

Otro trabajo donde estudia con mayor detalle la degradación de la RNA pol II, sugiere que el complejo de E3 asociado a pVHL se une a las subunidades Rpb1 y la Rpb7 hiperfosforiladas de la RNA pol II para llevarlo a la degradación (22). Los queratinocitos provenientes de XP deficientes en la función de la pVHL tratados con Et743 no logran la degradación de la RNA pol II, contrario a esto en las células se observaron una acumulación de la RNA pol II hiperfosforilada. En contraste, los queratinocitos XP complementadas con la pVHL degradan la RNA pol II en respuesta a Et743. Estos experimentos sugieren que la pVHL está implicada en la ruta que conduce a la degradación de la RNA pol II hiperfosforilado en las células tratadas con Et743 (**Figura 3**). Al estudiar los

efectos de la pVHL sobre la sobrevivencia celular en respuesta a Et743, los queratinocitos XP que sobre expresan la pVHL son más sensible al tratamiento con Et743 que su contraparte de queratinocitos XP que no producen la pVHL. Estos resultados indica que el pVHL está involucrada en la degradación de la RNA pol II en las células tratadas con Et743 y ayuda a la actividad anti-proliferativa del compuesto Et743 (21).

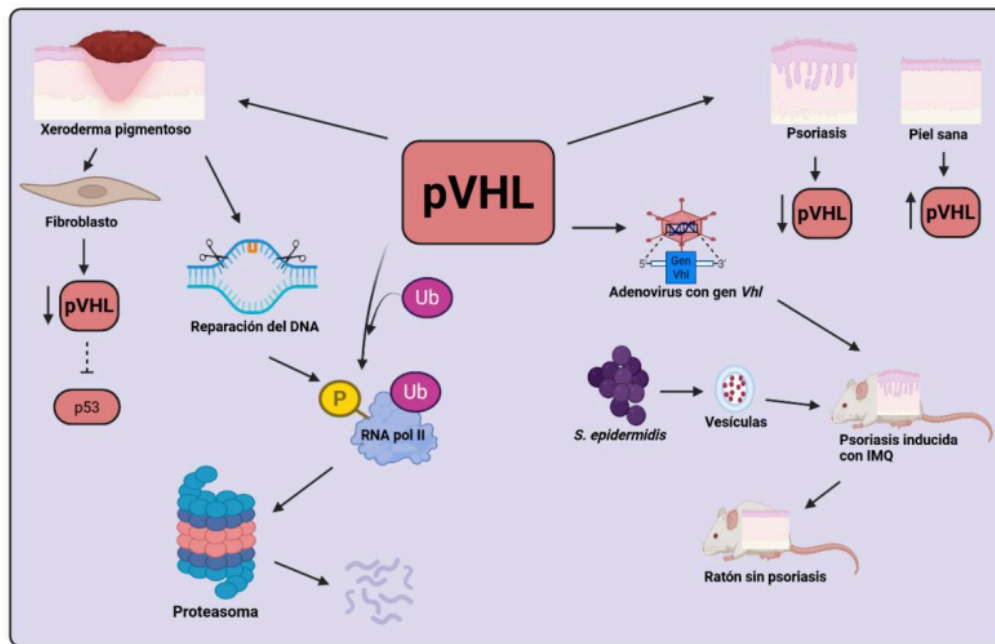


Figura 3. Función de pVHL en las enfermedades de la piel. La pVHL esta involucrada en la enfermedad de Xeroderma pigmentoso (XP) debido a que los fibroblastos obtenidos de pacientes con esta enfermedad tienen una baja expresión de la pVHL y al parecer se piensa que la baja expresión de pVHL inactiva la proteína p53. Por otro lado, se ha demostrado que la pVHL participa en la eliminación de la proteína RNA pol II por medio de la ubiquitinación y degradación del proteasoma. La RNA pol II es un participante en el sistema de reparación del DNA por escisión del nucleótido (NER) que en la enfermedad de XP está alterado este sistema de reparación y por lo cual la pVHL (aunque en baja expresión) puede participar por la eliminación de RNA pol II. En la piel de pacientes con psoriasis se tiene detectado que la pVHL tiene una baja expresión comparada con la piel sana de sujetos sanos. La reconstitución de la función de la pVHL mediante la aplicación tópica de un Adenovirus que lleva clonado el gen *vhl* en la piel de ratón con psoriasis inducida por imiquimod (IMQ) provoca una resolución de la psoriasis, así como de igual manera, la aplicación de vesículas provenientes de la bacteria *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*).

En resumen, con la finalidad de entender la función de la pVHL en la degradación de la RNA pol II, se puede concluir que la subunidad Rpb1 (componente de RNA pol II) hiperfosforilado está sujeto a ubiquitinación, particularmente en respuesta hacia radiación UV y agentes de daño del DNA. Interesantemente, se ha visto que Rpb1 y Rpb6 (componentes de la RNA polimerasa II) comparten una similitud de secuencia con el dominio de HIF-1alpha en cual se une con pVHL. De acuerdo con esto, la evidencia bioquímica señala que la pVHL específicamente se une a Rpb1 hiperfosforilado en una manera dependiente de hidroxilación de su prolina, esta forma ubiquitinada se lleva a la degradación por el proteasoma, pero esta interacción entre pVHL y Rpb1 está regulada por radiación UV (23).

Otra subunidad de la RNA pol II humana es la 7 (hRpb7) y pVHL puede directamente unirse también a esta subunidad a través de su dominio beta de VHL, ya que se ha visto que las mutaciones en este dominio de VHL decrecienta la unión de pVHL a la hRpb7. La interacción de pVHL con hRpb7 produce una degradación dependiente de ubiquitinación. Por otro lado, la pVHL puede también suprimir la transactivación del promotor de VEGF inducida por hRpb7, indicando que la pVHL tiene como blanco a hRpb7 y la pVHL puede regular la angiogénesis por inhibir la expresión de VEGF de una forma HIF-1alfa independiente (24). Con respecto a la piel, enfermedades de carácter inflamatorio están relacionadas con angiogénesis asociada a VEGF donde los queratinocitos son los productores de VEGF en las enfermedades inflamatorias como la psoriasis, la dermatitis atópica, etc, por lo que se sugiere que pVHL en los queratinocitos puede jugar un papel importante en la regulación de la angiogénesis.

4. La pVHL y psoriasis

La psoriasis ³ es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel, que produce lesiones escamosas engrosadas e inflamadas, con una amplia ² variabilidad clínica y evolutiva. No es contagiosa, aunque puede ser hereditaria. Afecta a cualquier parte de la piel, frecuentemente en las zonas de codos, rodillas, cuero cabelludo, abdomen, piernas y espalda.

La patogenia de la psoriasis ² está poco esclarecida, hay 3 hechos biológicos básicos: la hiperplasia epidérmica que es un aumento de la población germinativa, el infiltrado inflamatorio de la dermis y la angiogénesis. La inflamación viene mediada por el linfocito T CD4+ que libera citocinas proliferativas, que estimulan la proliferación de los queratinocitos. A la vez, los queratinocitos también contribuyen en el disparo del proceso inflamatorio de la piel. En la psoriasis también se presenta deficiencia en la diferenciación de los queratinocitos, una alta descamación del estrato córneo y un incremento en la

angiogénesis. En la actualidad no está muy claro quién es el responsable del inicio de la psoriasis.

Una característica de la psoriasis es la rápida proliferación de los queratinocitos, durante el cual la apoptosis está bloqueada y un aumento de la angiogénesis es también observado. En condiciones de hipoxia, las células tumorales producen "histone deacetylase-1 (HDAC-1), el cual esta proteína sobre regula a HIF-1alfa y provoca un efecto inhibitorio en la producción de la pVHL, por lo tanto, esto da como resultado una sobre expresión de VEGF por HIF-1alfa. En un trabajo publicado por nuestro grupo de investigación, se analizó la expresión de HDAC-1, HIF-1alfa, VHL y VEGF en biopsias de piel lesionada de pacientes con psoriasis y piel de sujetos sanos. El resultado mostró una sobre expresión del mRNA para HDAC-1, HIF-1alfa y VEGF en la piel lesionada de pacientes psoriáticos, en comparación con la piel de sujetos sanos. En contraste, la proteína anti-angiogénica pVHL, tanto su mRNA como la proteína se encontraron con expresión baja en la piel psoriática, pero con una alta expresión en la piel sana (**Figura 3**). Este hallazgo sugiere que HDAC-1, HIF-1alfa y VEGF están involucrados en el mecanismo molecular de una la piel psoriática y pVHL puede estar relacionada en el paro del proceso de la psoriasis (25) y por lo que se encontró disminuida en las lesiones psoriáticas.

En los tejidos tumorales en condiciones de hipoxia, es de todo conocido que la expresión de VEGF es positivamente regulado por HDAC1 y negativamente regulado por pVHL por la vía de HIF-1alfa y además que HIF-1alfa está constitutivamente expresado en los queratinocitos normales. Con la finalidad de elucidar la función de HDAC1 y pVHL en la regulación de VEGF en el queratinocito, en un trabajo de nuestro grupo de investigación, células de queratinocitos (línea HaCaT) fueron transfectadas con los genes codificantes de HDAC1 y pVHL. La producción de VEGF se incrementó en las células HaCaT transfectadas con HDAC1, mientras que VEGF se mantuvo en un nivel basal en las células transfectadas con pVHL bajo condiciones de normoxia. La producción de VEGF se decremento en las células HaCaT tratadas con un inhibidor de HDAC1, así como también en células transfectadas con HDAC1-siRNA (un RNA inhibidor de HDAC1). Por otro lado, los niveles de HIF-1alfa citoplásmico fueron bajos en las células transfectadas con pVHL, y HIF-1alfa se incrementó en las células transfectadas con HDAC1. Estos resultados demuestran que HDAC1 regula positivamente la producción de VEGF por vía HIF-1alfa en los queratinocitos, y que la pVHL regula negativamente a VEGF probablemente por la degradación de HIF-1alfa (26) en esta misma célula.

Con la finalidad de determinar el efecto de la pVHL en la psoriasis y con base a que se había reportado que la pVHL está ausente en las lesiones de pacientes psoriáticos, se decidió estudiar la restauración de la expresión de pVHL en la piel lesionada psoriática, el cual podría reducir el efecto de la psoriasis. Nuestro grupo de investigación usó un modelo

de ratón tipo psoriasis inducida por imiquimod en el cual fue introducida en la piel un vector de adenovirus que expresa la pVHL (AdvHL) para restituir la baja expresión de esta proteína. Los resultados mostraron que la piel lesionada psoriática del ratón tiene una baja expresión de pVHL y una alta expresión de HIF1-alfa. Remarcablemente, la retribución de pVHL en la piel psoriática del ratón reduce significativamente las lesiones psoriáticas con una menor eritema, descamación y grosor de la epidermis y una baja vasculatura comparado con la piel lesionada psoriática sin la restauración de la pVHL. Además, la restauración de la pVHL en la piel psoriática fue capaz de reducir la expresión de HIF-1alfa y TNF-alfa (una citocina pro-inflamatoria presente en la psoriasis) y reducción del infiltrado celular inmune (principalmente neutrófilos productores de IL-17). Estos resultados demuestran claramente que la pVHL tiene un papel de protección contra la psoriasis murina inducida por imiquimod y además juega un papel importante en la patofisiología de la psoriasis (27) (**Figura 3**).

Por otro lado, la microbiota de la piel tiene un papel fundamental en la regulación inmunológica de este órgano. *Staphylococcus epidermidis* es un habitante natural de la piel y tiene una función de control del sistema inmune. Esta bacteria puede producir vesículas extracelulares y transportar diferentes moléculas. En nuestro grupo de trabajo reportamos que la aplicación de vesículas extracelulares de *S. epidermidis* sobre la piel lesionada de un ratón con psoriasis inducida por imiquimod reduce las lesiones psoriáticas (el eritema, la descamación y el grosor de la epidermis y baja vasculatura) comparado con la piel lesionada psoriática sin la aplicación de las vesículas extracelulares de *S. epidermidis* (**Figura 3**). Las vesículas extracelulares de *S. epidermidis* redujo la expresión de VEGF, IL-6, IL-23, IL-17F, IL-36gamma y IL-36R en la piel lesionada psoriática (citocinas presentes en la psoriasis). Este trabajo demuestra que la microbiota de la piel, *S. epidermidis*, puede controlar la psoriasis por medio de la expulsión de moléculas transportadas en las vesículas extracelulares (28). Además, en un trabajo aun no publicado por nuestro grupo de investigación se ha demostrado que la aplicación de *S. epidermidis* más glicerol (como fuente de carbono) en la piel de ratón con psoriasis inducida por imiquimod induce la expresión de la pVHL, este resultado sugiere que *S. epidermidis* podría controlar la psoriasis a través de la inducción de la pVHL.

Aunque se demuestra que la pVHL tiene una función en la piel normal también se sugiere su participación en las enfermedades de la piel como la xeroderma pigmentoso y psoriasis, esto puntualiza que más investigación sobre la pVHL en la piel es necesario ya que en el caso de la psoriasis la restauración de la función de la pVHL produce cambios importantes de mejoría y la aplicación de estrategias usando la pVHL en la piel puede ser prometedora.

Referencia

1. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83:835-870.
2. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, et al. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature.* 1999; 398:252-256.
3. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, et al. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science.* 1995; 270:2008-2011.
4. Omori E, Matsumoto K, Sanjo H, et al. TAK1 is a master regulator of epidermal homeostasis involving skin inflammation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2006; 281:19610-19617.
5. Tan SH, Pal M, Tan MJ, et al. Regulation of cell proliferation and migration by TAK1 via transcriptional control of von Hippel-Lindau tumor suppressor. *J Biol Chem.* 2009; 284:18047-18058.
6. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene.* 2007; 26:3214-3226.
7. Zatyka M, Morrissey C, Kuzmin I, et al. Genetic and functional analysis of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene promoter. *J Med Genet.* 2002; 39:463-472.
8. Chong HC, Tan MJ, Philippe V, et al. Regulation of epithelial-mesenchymal IL-1 signaling by PPARbeta/delta is essential for skin homeostasis and wound healing. *J Cell Biol.* 2009; 184:817-831.
9. Lederle W, Stark HJ, Skobe M, et al. Platelet-derived growth factor-BB controls epithelial tumor phenotype by differential growth factor regulation in stromal cells. *Am J Pathol.* 2006; 169:1767-1783..
10. Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, et al. The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell.* 2005; 8:443-454.
11. Varghese MC, Balin AK, Carter DM, et al. Local environment of chronic wounds under synthetic dressings. *Arch Dermatol.* 1986; 122:52-57.
12. Loh SA, Chang EI, Galvez MG, et al. SDF-1 alpha expression during wound healing in the aged is HIF dependent. *Plastic Reconstr Surg.* 2009; 123:65S-67S.
13. Zhang X, Liu L, Wei X, et al. Impaired angiogenesis and mobilization of circulating angiogenic cells in HIF-1alpha heterozygous-null mice after burn wounding. *Wound Repair Regen.* 2010; 18:193-201.

14. Deonaraine K, Panelli MC, Stashower ME, et al. Gene expression profiling of cutaneous wound healing. *J Translational Med.* 2007; 5:11.
15. Cowburn AS, Alexander LEC, Southwood M, et al. Epidermal deletion of HIF-2 α stimulates wound closure. *J Invest Dermatol.* 2014; 134:801-808.
16. Volpe JP, Cleaver JE. Xeroderma pigmentosum variant cells are resistant to immortalization. *Mutat Res.* 1995; 337:111-117.
17. Nagasawa H, Zamansky GB, McCone EF, et al. Spontaneous transformation to anchorage-independent growth of a xeroderma pigmentosum fibroblast cell strain. *J Invest Dermatol.* 1987; 88:149-153.
18. Azzam EI, Nagasawa H, Yu Y, et al. Cell cycle deregulation and xeroderma pigmentosum group C cell transformation. *J Invest Dermatol.* 2002; 119:1350-1354.
19. Pause A, Lee S, Lonergan KM, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:993-998.
20. Ribar B, Prakash L, Prakash S. ELA1 and CUL3 are required along with ELC1 for RNA polymerase II poly-ubiquitylation and degradation in DNA-damaged yeast cells. *Mol Cell Biol.* 2007; 27:3211-3216.
21. Aune GJ, Takagi K, Sordet O, et al. Von Hippel-Lindau-coupled and transcription-coupled nucleotide excision repair-dependent degradation of RNA polymerase II in response to trabectedin. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:6449-6455.
22. vejstrup JQ. Contending with transcriptional arrest during RNAPII transcript elongation. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32:165-171.
23. Kuznetsova AV, Meller J, Schnell PO, et al. von Hippel-Lindau protein binds hyperphosphorylated large subunit of RNA polymerase II through a proline hydroxylation motif and targets it for ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:2706-2711.
24. Na X, Duan HO, Messing EM, et al. Identification of the RNA polymerase II subunit hsRPB7 as a novel target of the von Hippel-Lindau protein. *EMBO J.* 2003; 22:4249-4259.
25. Tovar-Castillo LE, Cancino-Díaz JC, García-Vázquez F, et al. Under-expression of VHL and over-expression of HDAC-1, HIF-1 α , LL-37, and IAP-2 in affected skin biopsies of patients with psoriasis. *Int J Dermatol.* 2007; 46:239-246.
26. Reynoso-Roldán A, Roldán ML, Cancino-Díaz JC, et al. Vascular endothelial growth factor production is induced by histone deacetylase 1 and suppressed by von Hippel-Lindau protein in HaCaT cells. *Clin Invest Med.* 2012; 35:E340-350.
27. Martínez-Torres I, Tepale-Segura A, Castro-Escamilla O, et al. The Protective Role of pVHL in Imiquimod-Induced Psoriasis-like Skin Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2022; 23:5226.

28. Gómez-Chávez F, Cedillo-Peláez C, Zapi-Colín LA, et al. The Extracellular Vesicles from the Commensal *Staphylococcus Epidermidis* ATCC12228 Strain Regulate Skin Inflammation in the Imiquimod-Induced Psoriasis Murine Model. *Int J Mol Sci.* 2021; 22:13029.

Capítulo VII

VHL y diabetes

1. Diabetes mellitus

La diabetes tipo 2 es una enfermedad que es ahora considerada epidémica, ya que afecta alrededor de 200 millones de personas en todo el mundo, y su prevalencia continua a elevarse a pesar de nuevos avances en el tratamiento. Las dos características distintivas de la diabetes tipo 2 son: la resistencia a la insulina y la disfunción de la célula beta pancreática. Bajo condiciones de resistencia a insulina, las células beta sufren un proceso de compensación que comprende una expansión de la masa de la célula beta y un potenciamiento al máximo de la función celular para producir insulina. Cuando la compensación de la célula beta puede adecuadamente satisfacer la demanda de insulina del cuerpo, el nivel normal de glicemia se mantiene. Sin embargo, en individuos susceptibles, quizás con defectos genéticos y/o insultos ambientales, la célula beta no puede satisfacer la demanda metabólica, resultando en la diabetes tipo 2.

Los niveles de glucosa sanguínea son normalmente controlados por la liberación de la insulina desde las células beta pancreáticas. La secreción de insulina es estimulada por el nivel de glucosa y esta secreción es un proceso metabólico complejo que involucra la toma de glucosa por la vía del transportador GLUT2 y la fosforilación de la glucosa por la glucocinasa para formar glucosa 6-fosfato dentro de la célula beta pancreática; posteriormente, ocurre el metabolismo catabólico de la glucosa 6-fosfato vía la ruta glucolítica y subsecuentemente la activación del metabolismo mitocondrial para producir factores acoplantes tales como ATP. Una elevación en la relación ATP/ADP citoplásmico conduce al cierre de los canales de potasio dependiente de ATP provocando una despolarización de la membrana citoplasmática, y como consecuencia de esto se abren los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, y por consiguiente la activación del mecanismo de exocitosis dependientes de Ca^{2+} para la secreción de vesículas cargadas de insulina al exterior de la célula beta pancreática. Este mecanismo sensor requiere oxígeno molecular para la generación cuantitativa de ATP a partir de la glucosa (**Figura 1**).

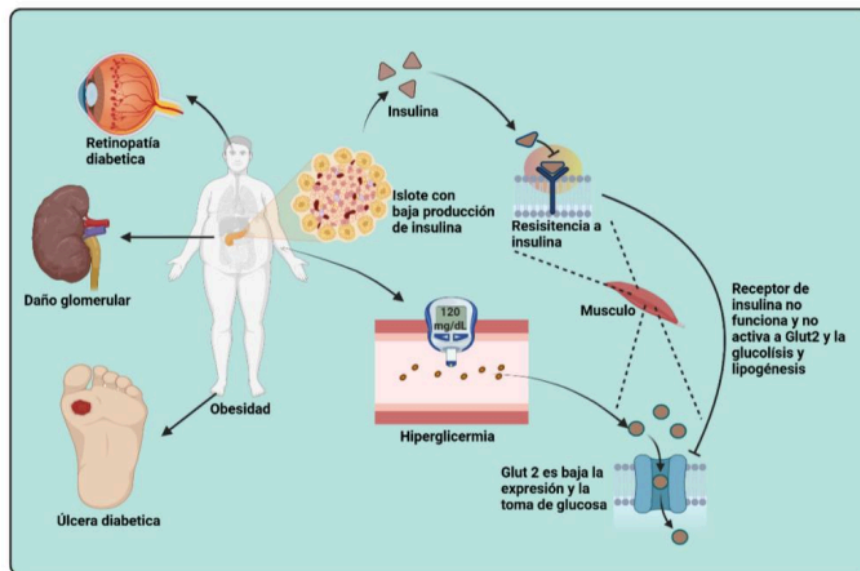


Figura 1. Diabetes. El incremento de glucosa sanguínea puede ser provocada por varios factores entre ellos la obesidad; este incremento de glucosa produce daños en los diferentes órganos como el ojo, riñón y pie. El páncreas produce insulina, sin embargo, el receptor de insulina, presente en diferentes tejidos como el músculo o adiposo, no responde a la insulina (resistencia a la insulina). Esta resistencia de insulina del receptor produce una falta de señalización para la expresión de transportadores de glucosa (Glut2) y alteraciones en las rutas de glucólisis y lipogénesis. La baja expresión de Glut2 no permite la entrada de glucosa sanguínea a la célula de una manera eficiente.

La homeostasis del oxígeno es esencial para la función celular, y una baja presión de oxígeno (hipoxia) tiene un profundo impacto sobre el metabolismo celular y en los procesos fisiológicos. La proteína VHL (pVHL) es un jugador clave en la respuesta celular hacia la condición normal de oxígeno, por el contrario, HIF es un regulador global de homeostasis en condiciones de hipoxia el cual permite la adaptación celular por la inducción de genes blanco que están involucrados en la energía metabólica, angiogénesis, apoptosis y proliferación, entre otros procesos biológicos. HIF sobre regula la expresión del transportador de glucosa de alta afinidad GLUT1 y las enzimas de la vía glucolítica en condiciones de hipoxia, y además HIF disminuye la actividad de la mitocondria dependiente de oxígeno en la célula beta. En la célula beta, la ruta de la glucólisis y la respiración mitocondrial son elementos claves en el sistema sensor de glucosa y la activación de la ruta HIF en condiciones de hipoxia tiene el potencial para proveer una mayor modulación para la secreción de insulina por la glucosa. En capítulos anteriores hemos mencionado que la pVHL regula la actividad de HIF por medio de la ubiquitinación

y su degradación por el proteasoma en condiciones de hipoxia. Por otro lado, la enfermedad de VHL está asociado con tumores pancreáticos lo cual indica que la pVHL tiene un papel sobre el crecimiento y función de células endocrinas de los islotes y posiblemente esto activa el desarrollo de diabetes. En este capítulo abordaremos la relación que existe entre pVHL y la diabetes

2. Relación entre Diabetes mellitus (DM) y enfermedad de VH

En los pacientes con enfermedad de VHL llegan a presentar alteraciones en el páncreas, estas alteraciones corresponden a lesiones pancreáticas que incluyen desde quistes hasta tumores neuroendocrino. Las alteraciones pancreáticas se presentan en aproximadamente el 70% de los pacientes con enfermedad de VHL. Cerca del 90% de las lesiones pancreáticas son quistes únicos o múltiples. Por otro lado, el adenoma microquístico y tumores neuroendocrinos del páncreas también han sido reportado en pacientes afectados con la enfermedad de VHL. La mayoría de las lesiones pancreáticas son asintomáticas y son descubiertas durante el seguimiento o diagnóstico de los miembros de la familia con enfermedad de VHL. Se tiene reportado que la masa anormal de una lesión pancreática puede afectar la función de este órgano y puede provocar una pancreatitis aguda, o una obstrucción biliar o una obstrucción gastrointestinal. Además, la insuficiencia endocrina pancreática también ha sido reportado en los pacientes con enfermedad de VHL lo cual indica una asociación de esta enfermedad con la diabetes. En este sentido, Hammel y cols reportaron que la diabetes mellitus (DM) está presente en una frecuencia de 3 de 158 pacientes con enfermedad de VHL (1), y el riesgo de generar una diabetes es considerado relativamente bajo (1). Mukhopadhyay y cols (2) reportaron que el adenoma microquístico de tipo serio extensivo está asociado con la DM en pacientes con enfermedad de VHL. Además, existe un reporte de un paciente diagnosticado inicialmente con DM gestacional y posteriormente presento un cuadro clínico de la enfermedad de VHL. En esta persona se encontró una nueva mutación (del291C) en el gen *vhl*. Este reporte sugiere que la DM gestacional puede ser una presentación inicial para el diagnóstico de la enfermedad de VHL (3), y además apoya la existencia de una asociación entre la diabetes y la enfermedad de VHL.

Con respecto a los quistes pancreáticos también existe una relación con la diabetes. Los quistes pancreáticos son frecuentes en paciente con enfermedad de VHL, y ellos son considerados clínicamente no importantes. Al evaluar la asociación entre los quistes pancreáticos y la DM en pacientes con enfermedad de VHL se observó que de 66 pacientes con enfermedad de VHL (22 hombres y 14 mujeres, con una edad media de 36.4 años) 7 pacientes tuvieron DM (19.4%) y dos pacientes adicionales tuvieron altos títulos de hemoglobina glicosilada (como posible DM). El área y porcentaje de quistes pancreáticos

es significativamente más alto en pacientes con DM o los pacientes con altos niveles de hemoglobina glicosilada que en los pacientes sin DM o con bajo nivel de hemoglobina glicosilada. Este hallazgo sugiere que los pacientes con enfermedad de VHL que tienen un área grande de quistes pancreáticos son más probables a tener DM que aquellos que no tienen estas características (4). Por otro lado, con respecto al adenoma microquístico, en un estudio se reportó que la DM es más común en pacientes con adenoma microquístico serio extensivo (2), donde la frecuencia es de 27% en estos casos clínicos.

El feocromocitoma es otra alteración clínica presente en los pacientes con enfermedad de VHL y también hay una asociación con la diabetes. En pacientes con feocromocitoma la prevalencia de diabetes es del 16%, mientras que en pacientes con enfermedad de VHL que sufrieron cirugía para hemangioblastoma, la prevalencia es del 10.3%. Los reportes sugieren que las catecolaminas producidas por el feocromocitoma pueden estimular la gluconeogénesis a través de la acción de los receptores beta, reduciendo la liberación de insulina y potenciar la inducción a la resistencia a insulina por falta de sensibilidad de los receptores beta-adrenérgicos (5). Los niveles de glucosa sanguíneo pueden ser normalizado después de la remoción del feocromocitoma en pacientes con enfermedad de VHL, lo cual confirma que la diabetes puede iniciarse en ciertos casos de enfermedad de VHL.

Basado sobre los hallazgos reportados, la relación entre la enfermedad de VHL y diabetes puede ser explicado con base a los siguientes puntos: 1) las manifestaciones de feocromocitoma en la enfermedad de VHL puede conducir a una diabetes secundaria; 2) la diabetes pancreática puede ocurrir cuando la enfermedad de VHL presenta tumores neuroendocrino pancreáticos o quistes múltiples; 3) la DM dependiente de insulina puede ocurrir en combinación con auto-anticuerpos hacia los islotes pancreático; 4) la DM puede ocurrir en individuos con una historia familiar de diabetes o resistencia a insulina, lo cual puede dar inicio a la enfermedad de VHL; 5) hay una posibilidad de desarrollar diabetes después del uso de análogos de somatostatina, con una tasa de incidencia de aproximadamente 5%. A pesar de las lesiones pancreáticas severas observadas en los casos reportados, existe alguna función pancreática residual que puede tener la habilidad compensatoria del tejido pancreático. Los niveles de glucosa sanguínea pueden ser efectivamente controlados usando un régimen simple de insulina combinada con medicaciones orales (6).

3. La señal VHL/HIF en úlcera diabética

La DM es una enfermedad crónica, caracterizada por altas cantidades de azúcar en sangre, causada por la inestabilidad metabólica del cuerpo para producir o usar

apropiadamente la insulina. Un mal manejo de la diabetes puede causar daño a los tejidos y órganos, tales como el riñón, el corazón y los nervios. La úlcera diabética en el pie (UDP) es otra causa común por el mal control de la glucosa sanguínea de los diabéticos. El UDP en los pacientes con diabetes frecuentemente tienen dificultades en la reparación de la úlcera y son susceptibles a infecciones, conduciendo a un riesgo incrementado de amputación del pie. El UDP es una de las complicaciones más comunes de los diabéticos, con una tasa alta de mortalidad y de morbilidad, debido a una reducida circulación sanguínea y una neuropatía diabética (7). Aproximadamente el 19-34 % de la gente con diabetes desarrollan UDP, y en algunos casos cuando la úlcera es tratada exitosamente, aproximadamente el 40% recaen dentro de 1 año, cercanamente el 60% dentro de 3 años y el 65% dentro de 5 años; el tratamiento de la UDP es complicado y un gran reto. Así la UDP es un serio problema de salud.

La úlcera en los pacientes diabéticos llega a recuperarse y sanar muy lentamente. En algunos casos, la úlcera no llega a sanar completamente, y la situación puede llegar a ser complicada cuando la úlcera se infecta. El tratamiento sobre el UDP es aún insatisfecho y la razón importante es que la patogénesis de la diabetes es actualmente no definida con detalle. Acorde a estudios de investigación, la estabilización de HIF-1alpha es un factor crítico en el mejoramiento del proceso de cicatrización de las úlceras diabéticas y existen enfoques de tratamiento con base a HIF-1alfa que a continuación se mencionan.

3.1. Desregulación de la ruta HIF-1alfa en la úlcera diabética

Como se mencionó en el capítulo de piel, HIF-1alfa participa en la cicatrización de las heridas. La ruta de señalización de HIF-1alfa es inducido en respuesta a los niveles de oxígeno reducido, conduciendo a la homeostasis hipóxica. Por el contrario, en la úlcera diabética, aunque el tejido está en condiciones de hipoxia, la ruta de señalización de HIF-1alfa está inhibida, conduciendo a una respuesta adaptativa errónea hacia la hipoxia y así a una desaceleración del proceso de cicatrización (8). Un gran número de estudios han mostrado que HIF-1alfa está afectado por la hiperglicemia bajo condiciones hipóxica diabética (9-10). Aunque el mecanismo específico de HIF-1alfa en UDP se desconoce, la regulación negativa de HIF-1alfa por la hiperglicemia es a través de los siguientes mecanismos.

3.1.1. La hiperglicemia promueve la degradación de HIF-1alfa por PHD-VHL

La célula beta en condiciones de hipoxia y alta concentración de glucosa (hiperglicemia) promueve la hidroxilación de HIF-1alfa en su dominio ODD de forma

dependiente de la enzima prolil-hidroxilasa PHD, esto provoca la inhibición de HIF-1alfa y por consiguiente la unión a pVHL para el marcaje de su degradación al proteasoma (11). Catrina y cols encontraron que la hiperglicemia afecta la estabilización de HIF-1alfa inclusive en condición de hipoxia. Esto se observó en células expuestas a alta glucosa en condiciones de hipoxia donde fueron tratados con un inhibidor de proteasoma (MG132) el cual provoca que el nivel de HIF-1alfa no se alteró, en el caso contrario, cuando las células no fueron expuestas al inhibidor MG132 hubo una degradación de HIF-1alfa; lo cual indica que la degradación de HIF-1alfa es dependiente de la enzima PHD y pVHL por las condiciones de hiperglicemia (**Figura 2**) (11).

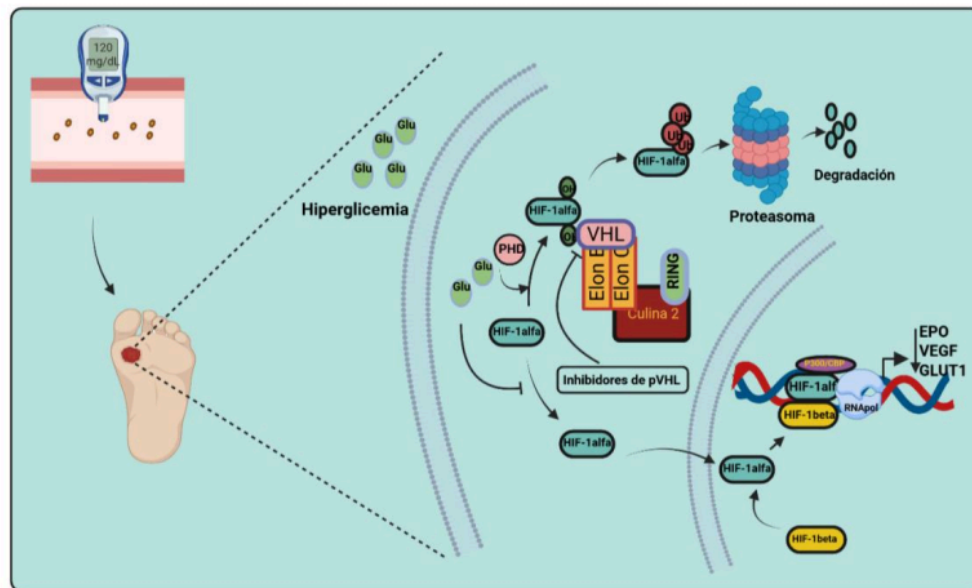


Figura 2. Úlcera diabética. En la úlcera diabética la hiperglicemia provoca la activación de la prolil-hidroxilasa (PHD) para hidroxilar HIF-1alfa. La E3 ubiquitina ligasa VHL reconoce a HIF-1alfa hidroxilado para ubiquitarla y degradarlo. La degradación de HIF-1alfa evita la transcripción de genes que son importantes en la resolución de la úlcera diabética como aquellos que codifican a la eritropoyetina (APO), el factor de crecimiento endotelial (VEGF) y el transportador de glucosa 1 (GLUT1). El uso de inhibidores de pVHL puede ser una alternativa para la resolución de la úlcera diabética por la estabilidad de HIF-1alfa.

3.1.2. Agregación de MGO en el estado de alta glucosa inhibe la expresión de HIF-1alfa

La hiperglicemia conduce hacia una acumulación intracelular del compuesto metilglioxal (MGO), un compuesto oxoaldehído altamente reactivo formado como un producto de la ruta de la glucólisis. El MGO causa inflamación y retraso en la cicatrización de la úlcera diabética. El mecanismo detrás de esto es porque el MGO modifica a HIF-1alfa de forma postraduccional provocando una reducción en la función de HIF-1alfa. Esta reducción de la actividad de HIF-1alfa es independiente de la ruta de degradación de HIF-1alfa por PHD-VHL. Bento y cols descubrieron una ruta nueva para la degradación de HIF-1alfa por MGO, esta consiste en que la hiperglicemia induce la acumulación de MGO y como consecuencia una modificación de HIF-1alfa, esta modificación contribuye a incrementar la unión con las chaperonas moleculares Hsp40 y Hsp70. El HIF-1alfa unido a las chaperonas recluta a la E3 ubiquitina ligasa dependiente de chaperona, conduciendo a la ubiquitinación y degradación dependiente del proteasoma. Este mecanismo es totalmente independiente del reclutamiento de pVHL y no requiere hidroxilación mediada por PHD de HIF-1alfa (12).

Otro mecanismo de la MGO es la inhibición de la activación transcripcional de HIF-1alfa. Este mecanismo es debido a que la modificación de HIF-1alfa por el MGO evita la dimerización de HIF-1alfa con HIF-1beta, y esto inhibe la unión hacia el promotor de los genes blancos. Adicionalmente, MGO reduce la unión del coactivador p300 a HIF-1alfa resultando en una reducción de la actividad transcripcional. El efecto regulatorio negativo de la hiperglicemia no solamente está restringido a la estabilidad de HIF-1alfa, también altera la actividad de los dominios de transactivación NTAD y CTAD de HIF-1alfa, que son esenciales para la función HIF.

3.1.3. Daño de HIF-1 conduce a una baja regulación de sus genes blanco

La hiperglicemia conduce a una regulación negativa sobre los genes blancos de HIF-1alfa que son esenciales para la reparación de heridas, tales como HSP-90, VEGF-A, VEGF-R1, SDF-1 y SCF. En pacientes diabéticos con tejido isquémico, la hiperglicemia causa un decremento en la actividad transcripcional de HIF-1alfa, provocando una reducción en la producción de VEGF en respuesta a hipoxia. La inhibición de la angiogénesis por VEGF resulta en el retardo o no reparación de la úlcera diabética crónica (13). Además, la inhibición de HIF-1 dependiente de PHD-VHL por alta glucosa ha mostrado a contribuir en la sobre producción de especies oxígeno reactivas (ROS) de tipo mitocondrial en la diabetes. Las ROS dispara una cascada compleja de eventos moleculares que conduce a apoptosis y directamente induce daño endotelial. Las células progenitoras de endotelio

son esenciales en la angiogénesis y en la reparación de heridas, sin embargo, se ha visto que estas células están reducidas en cantidad en la diabetes. Gallagher y cols establecieron un modelo de diabetes murina y encontraron que las células epiteliales y miofibroblastos en el tejido de la herida de piel expresan muy bajo nivel de SDF-1alfa, que es una quimiocina que media el reclutamiento de células epiteliales durante la isquemia. Además, demostraron que la célula epitelial tiene un comportamiento erróneo en pacientes diabéticos y esto es debido al reducido nivel de SDF-1alfa (14). La disminución en la expresión de genes blancos de HIF-1alfa puede causar daño a la célula endotelial vascular y obstaculizar la formación de un nuevo vaso sanguíneo, retardando el proceso de reparación de heridas.

3.1.4. Inhibidores de la pVHL

Una estrategia para activar a HIF en la úlcera diabética es el uso de inhibidores contra PHD o pVHL. En el caso de inhibidores contra la pVHL, estos tienen una más alta actividad y selectividad, y estos inhibidores representan una alternativa atractiva para estabilizar HIF-1alfa. El inhibidor de la pVHL provoca que esta proteína no funcione y por lo tanto evita su ubiquitinación de HIF-1alfa y su degradación por el proteasoma (Figura 2). Un potente y selectivo inhibidor de la pVHL es el VH298, este inhibidor induce el bloqueo de la pVHL y por lo tanto evita la interacción con HIF-1alfa hidroxilado. El inhibidor VH298 interacciona con la pVHL con alta afinidad y especificidad, haciendo que la pVHL pierda su función. La inhibición de la pVHL resulta en una acumulación de HIF-1alfa hidroxilado en varias líneas celulares, y como consecuencia, hay una sobre regulación de los genes blancos de HIF (15). Por lo tanto, el desarrollo de inhibidores altamente activos y selectivos para la pVHL podría ser una opción prometedora para estabilizar a HIF y mejorar el tratamiento de las úlceras diabéticas.

4. Función de la célula beta pancreática en la diabetes

La función principal de la célula beta pancreática es la producción de insulina y es clave en la homeostasis de la glucosa en el cuerpo, por lo tanto, una disfunción de esta célula contribuye significativamente a la DM. Usando un modelo de ratón “Knock-out” al gen *vhlh*, se observó que la ausencia de la pVHL causa un deterioro en la expresión de los genes canónicos para la función normal de la célula beta, en cambio existe un disparo en la expresión no convencional de una célula beta diferenciada de factores de transcripción que participan en la célula progenitora, es decir en el proceso de diferenciación hacia célula beta, estos factores de diferenciación son Notch, Wnt y Hedgehog, así como

también del factor de transcripción Sox9. Todos estos factores de diferenciación son normalmente excluidos o no presentes en una célula beta diferenciada madura funcional. Sox9 juega un papel importante durante el desarrollo del órgano del páncreas y también en el proceso de diferenciación hacia una célula beta adulta, después de la diferenciación del páncreas o de la célula beta la expresión de Sox9 se apaga, lo cual indica que es un marcador de diferenciación celular. El estudio del ratón con eliminación del gen *vhlh* sugiere fuertemente que la célula beta pierde su función de producir insulina debido a que la célula entra en un retroceso en el estado celular donde una célula diferenciada pasa a una célula des-diferenciada. Se ha observado que la expresión ectópica de Sox9 específicamente en la célula beta puede generar DM (16). Este hallazgo revela que el estado de diferenciación de la célula beta impacta sobre el desarrollo de la DM (**Figura 3**).

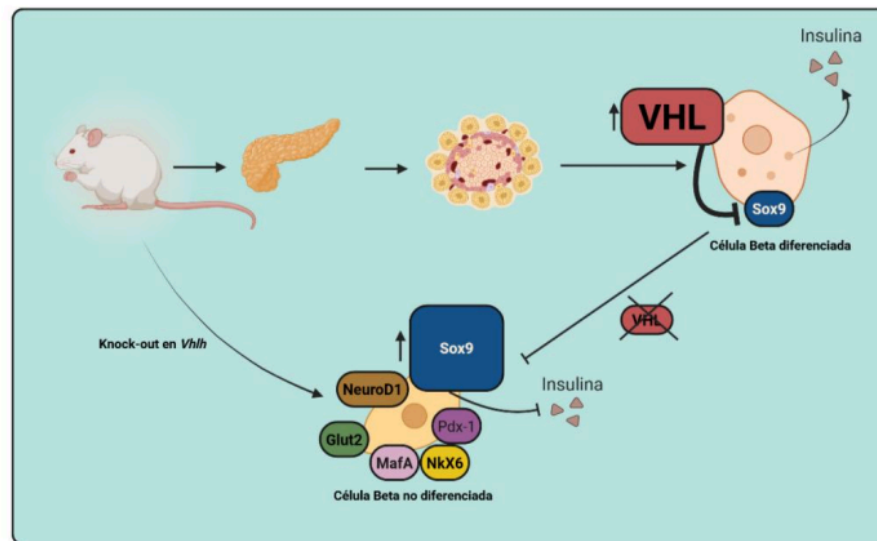


Figura 3. La pVHL participa en la función de la célula beta pancreática. El ratón diabético produce baja insulina y es debido a que las células beta están en estado de des-diferenciación (retroceso). En el ratón knock-out en *Vhlh*, las células beta expresan marcadores de no diferenciación principalmente por la proteína Sox9 y la célula no produce insulina. La célula beta pancreática obtenida del ratón knock-out en *Vhlh* al ser introducida la pVHL provoca inhibición de Sox9 y una producción de insulina normal, además existe un bloqueo del estado de des-diferenciación celular por la pérdida de la expresión de marcadores de no diferenciación.

El concepto de la célula beta alterada o des-diferenciada, como una causa de DM está ganando terreno. La des-diferenciación de la célula beta es una consecuencia de la glucotoxicidad y en el modelo de ratón con eliminación del gen *vhlh* se cree que ocurre

como un evento secundario a la resistencia a la insulina. En el mismo modelo de ratón “knock-out” se observa la activación de la ruta de señalización Hedgehog (Hh) en la célula beta donde esta señalización también contribuye a una des-diferenciación celular, conduciendo a una intolerancia a la glucosa (17).

Sox9 tiene una función importante durante la organogénesis del páncreas y es un marcador de la población progenitora multipotencial para dar origen a la formación del órgano pancreático (18). Sin embargo, no es claro como ocurre el apagado de este factor de transcripción en la célula beta diferenciada adulta. Por otro lado, se ha reportado que la célula beta bajo hipoxia tiene la habilidad a des-diferenciarse en célula no-beta causando una perturbación en la homeostasis de la glucosa. La célula beta tiene un mecanismo sensor del oxígeno reducido para adaptarse y responder por la ruta VHL/HIF. Un ratón sin el gen *vhlh* presentó los islotes poblados con células que expresan insulina en un nivel muy bajo, así como también presentan una reducción de la expresión de Pdx-1, MafA, Nkx6.1, NeuroD1 y Glut-2 (proteínas involucradas en el proceso de diferenciación de la célula beta), lo cual sugiere que las células beta pierden la identidad y la función de esta célula. La eliminación del gen *vhlh* en la célula beta provoca una sobre expresión de Sox9, el cual Sox9 no debe de estar presente en la célula diferenciada. La restauración de la expresión de la pVHL en la célula beta knock-out al gen *vhlh* provoca una disminución de la Sox9 y presenta un comportamiento de célula beta normal con producción de insulina. Estos resultados indican que Sox9 puede conducir a la perturbación de la identidad de las células beta y la pVHL podría tener un efecto de regulación negativa sobre Sox9 para poder controlar la des-diferenciación celular (**Figura 3**) (16). La conclusión principal es que las células beta maduras pueden sufrir un proceso sostenido de des-diferenciación que resulta en la pérdida del control de la glucosa y en este proceso la pVHL puede tener un papel importante.

5. Modelos de ratón VHL en la diabetes

La asociación entre la diabetes y la pVHL fue encontrado en recientes estudios hechos con ratón, donde únicamente la eliminación el gen supresor de tumor *vhlh* en la célula beta del páncreas, el ratón presenta una errónea tolerancia a la glucosa (19), el cual indica el deterioro de la función de la célula beta pancreática y esto podría estar relacionado con la diabetes. A continuación, se menciona las diferentes evidencias de la asociación de la pVHL con la diabetes en los modelos de ratón.

En ratones, la inactivación total del gen *vhlh* resulta en una letalidad en la mitad de la gestación (20) por lo que indica que pVHL es una proteína vital. Una alternativa para el estudio de la pVHL es el uso de ratones con alelo condicional e inducida, esta técnica

proporciona un enfoque potencial para investigar el papel de esta proteína en la función y desarrollo de órganos específicos. La inactivación condicional e inducida del gen *vhlh* ha sido exitosa para algunos órganos como riñón, hígado y hueso y la inactivación del gen en estos estudios han demostrado que la pVHL en el ratón juega un papel fundamental en la supervivencia, proliferación y diferenciación de muchos tipos de célula. Por ejemplo, la inactivación específica del gen *vhlh* en células de riñón resulta en el desarrollo de cavidades rellenas de sangre que asemejan típicamente a la hemangioblastoma visto en los pacientes humanos con enfermedad de VHL (21). La eliminación específica del gen *vhlh* en el hígado da origen a la esteatosis dentro del hígado, posiblemente debido a alteraciones en la maquinaria glucolítica dentro del órgano (22).

En este sentido, el estudio de los ratones VHL-/- en las células beta y la determinación de glucosa en sangre ha sido hecho. Los ratones VHL-/- en las células beta tuvieron un comportamiento de alimentación normal y en ayuno los niveles de glucosa sanguínea fueron normales. Para más vigorosidad de la prueba funcional, la respuesta del ratón hacia un reto de glucosa presentó una tolerancia a la glucosa alterada. Estos ratones mutantes alcanzaron la normalidad de la glicemia hasta las 3 h después del reto de glucosa. Interesantemente, el fenotipo de intolerancia a la glucosa se desarrolló a 6-8 semanas. Así, la función de pVHL en la célula beta pancreática adulta afecta la homeostasis de glucosa en el ratón (**Figura 4**) (23).

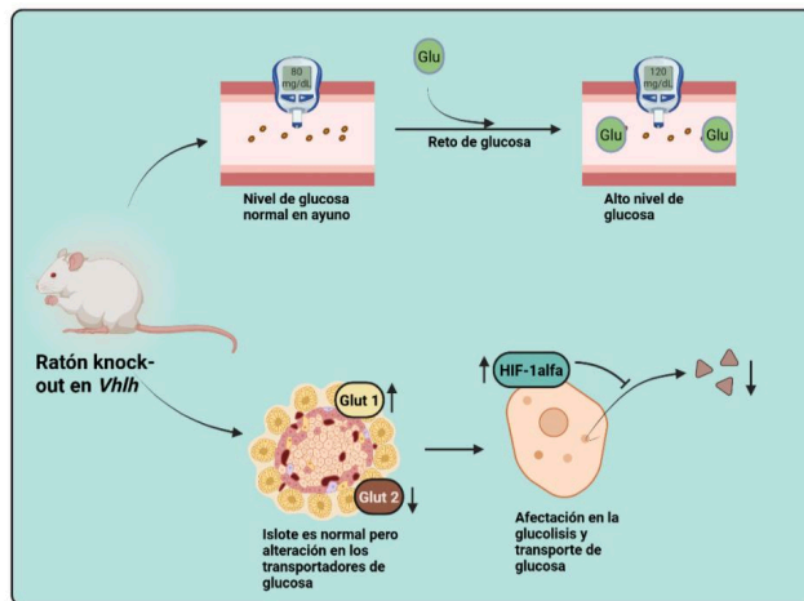


Figura 4. La pVHL en la diabetes. Un ratón knock-out en el gen *vhlh* inducido por tamoxifeno provoca una intolerancia a la glucosa cuando se suministra una toma de glucosa al ratón (glucosa postprandial). El islote

del ratón morfológicamente es normal, pero existe un aumento de expresión del transportador de glucosa Glut1 y una baja expresión de Glut2. En la célula beta proveniente del ratón knock-out en el gen *vhlh* existe un incremento de HIF-1alfa que provoca un bloqueo en la expresión de insulina (baja producción de esta hormona), además la célula beta tiene afectado la glucólisis y el transporte de glucosa.

El análisis histológico del tejido pancreático de los ratones con pérdida de la función de la pVHL no reveló algún cambio morfológico, sin embargo, los islotes se observaron con un aumento dramático en los vasos sanguíneos y alta expresión de VEGF. Los marcadores del desarrollo del páncreas no se observaron alterados, lo cual indica que la pVHL no es esencial para la formación de islotes y diferenciación celular del páncreas (23). Con respecto a la insulina, los ratones VHL -/- presentaron una disminución significativa de la insulina circulante después de 30 minutos del reto de glucosa, lo mismo se observó cuando la célula beta pancreática fue aislada desde los ratones mutantes y al ser tratados con glucosa en condiciones *in vitro*. El resultado indica que la pérdida de la pVHL en la célula beta pancreática genera a una severa inhabilidad para secretar insulina en respuesta a un estado de concentración elevada de glucosa. El análisis metabólico de estas células mostró un metabolismo de la glucosa alterada; la expresión de genes de algunas enzimas involucradas en el metabolismo de glucosa fue significativamente elevado. Además, se observó un incremento en la expresión de Glut-1 en los islotes beta pancreáticos deficientes del gen *vhlh*, pero una disminución de Glut2, el cual es el transportador que capacita la facilidad del transporte de glucosa dentro de la célula. La pérdida de la pVHL en la célula beta pancreática parece tener un efecto de alterar la maquinaria celular tanto para el sistema sensor de glucosa, como el metabólico (23). Estos resultados demuestran de cómo la pérdida de la pVHL afecta la secreción de insulina, lo cual correlaciona con otro trabajo donde se demostró que la condición de hipoxia provoca defectos en la secreción de insulina (24). La inactivación de la pVHL, estabiliza a HIF-1alfa mimetizando ciertos aspectos de la respuesta celular a hipoxia que provoca la expresión de los genes blancos canónicos de HIF (**Figura 4**).

Otros trabajos han observado algunos defectos en la señalización celular debido a hipoxia como una posible causa al desarrollo de la diabetes. Por ejemplo, una sobre regulación de genes relacionados a hipoxia ha sido observado en ratas pre-diabéticas y diabéticas (25). Recientes estudios sugieren que la inhibición de la respuesta hipóxica también afecta la función de la célula beta pancreática. Se ha observado que en los islotes obtenidos de pacientes diabéticos tipo 2 se presenta una fuerte disminución en la actividad de HIF-1beta, esto sugiere que hay una asociación entre los genes de hipoxia y una disfunción de las células beta pancreática (26). Además, los autores mostraron que una célula beta de páncreas con “knock-out” específico a HIF-1beta conduce a una

tolerancia de glucosa anormal y los cambios genéticos en los islotes correlacionan con aquellos encontrados en los islotes desde pacientes diabéticos (26). Todo lo anterior indica que posiblemente una desregulación de la ruta glucolítica (ya sea a la baja o alta) afecta la función de la célula beta pancreática.

Cuando se generó un ratón carente del gen *vhlh* específicamente en la célula beta pancreática y se comparó con otro ratón carente del gen *vhlh* pero en todo el órgano del páncreas se observó que ambas cepas de ratones desarrollaron intolerancia a la glucosa con afectación en la secreción de insulina. Además, se observó que en ambos ratones estaba alterado la expresión de genes involucrados en la función de la célula beta, incluyendo aquellos involucrados en el transporte de glucosa y glucolisis. También se detectó que la homeostasis anormal de la glucosa fue dependiente de la sobre regulación de la expresión de HIF-1alfa, ya que los ratones con doble delección en el gen *hif-1alfa* y *vhlh* en células beta restablece la liberación de insulina dependiente de glucosa. Acorde con esto, se ha reportado que la expresión de HIF-1alfa activado en una línea celular de células beta de ratón afecta considerablemente la liberación de insulina dependiente de glucosa. Estos datos sugieren que el mecanismo sensor de oxígeno VHL/HIF juega un papel crítico en la homeostasis de la glucosa y que la activación de esta ruta en respuesta a una disminución de la oxigenación de los islotes puede contribuir a la disfunción de las células beta (19, 27). En el caso del modelo de rata con diabetes, se ha observado que los genes de respuesta a hipoxia están sobre regulados en los islotes pre-diabéticos de ratas Zucker y diabéticos Goto-Kakizaki (28), así como también un incremento en HIF-1alfa, que soporta la idea de la señalización VHL/HIF.

Aunque los estudios han sido enfocados en la célula beta, no se conoce la función de los otros tipos de células del páncreas (por ejemplo, la célula alfa productora de glucagón) en la regulación de la glucosa. El ratón con pérdida del gen *vhlh* en todo el páncreas presentó intolerancia a la glucosa, similar a aquellos ratones con delección del gen *vhlh* solamente en las células beta. Cuando se eliminó el gen *vhlh* en el páncreas de otras cepas de ratones se observó que algunos presentaron muerte neonatal y en otras cepas se observó que las células pancreáticas mueren perinatalmente debido a hipoglucemia severa, lo cual parece que es debido a un defecto en la secreción de glucagón (la hormona encargada en inducir la síntesis de glucosa). En estudios hechos con células de ratón, la célula productora de glucagón (célula alfa) cultivada bajo una condición de hipoxia falla en secretar glucagón en respuesta a niveles de glucosa reducida. Estos resultados sugieren un papel más general de la ruta VHL/HIF en la función endocrina.

Reforzando lo antes mencionado, la hipoglucemia está relacionada en el ratón deficiente en el gen *vhlh* pero específica en las células endocrinas (células alfa) lo cual provoca una muerte temprana (embrionaria), mientras que el ratón con pérdida del gen

vhlh en el compartimento de las células exocrinas (células beta) sobreviven a la adultez con altos niveles de glucosa. Ratones con hipoglucemia presentan una disminuida liberación de insulina en respuesta a la glucosa elevada. La respuesta a glucagón es significativamente errónea en ambos estadios *in vivo* (niveles de glucagón circulante) así como también en un ensayo de secreción *in vitro* en los islotes aislados. También se observó que la hipoxia provoca un defecto en la secreción de glucagón en una línea celular que expresa normalmente glucagón en cultivo. Estos resultados revelan un papel nuevo para la ruta hipoxia/HIF en la secreción de hormona en los islotes y el mantenimiento del balance fino que permite para establecer los niveles normales de glicemia (29). Por otro lado, un estudio preliminar reportó el perfil de expresión de genes de los islotes de pacientes con diabetes tipo 2 humano, donde se encontró una disminución significativa en la expresión de la subunidad HIF-1beta (30).

5.1. VHL en las alteraciones diabéticas murina

Los islotes del ratón “knock out” para pVHL muestran una expresión elevada de VEGF y un incremento en la vasculatura, lo cual indica el desencadenamiento de una angiogénesis. Dado que la eritropoyetina (EPO) es un gen blanco de la ruta HIF, y esta molécula no es expresado en forma normal en los islotes, en un trabajo se experimentó si la adición de EPO recombinante humana podría sobre llevar los defectos de la célula beta con pérdida de la pVHL. Se observó una mejoría en la tolerancia a la glucosa y restablecimiento de la expresión de Glut2 en la célula beta deficiente de la pVHL en respuesta hacia la EPO recombinante. Esto indica un papel crítico para la pVHL en la función de la célula beta, y que la administración de EPO mejora la función de la célula beta haciéndolo una estrategia potencial para el tratamiento de la diabetes (31).

Por otro lado, el hueso tiene un aporte importante en el metabolismo del humano, por ejemplo, la osteocalcina producida por las células de osteoblasto juega un papel crítico para promover la proliferación de células beta pancreáticas, la estimulación de la secreción de insulina, el incremento a la sensibilidad de insulina y la regulación de la fertilidad del hombre masculino. Los osteocitos pueden regular el fósforo y el metabolismo de grasa circulante por la secreción del factor de crecimiento fibroblástico y la esclerostina. Así, una desregulación de la homeostasis del hueso puede conducir a una disfunción regulatoria sistémica, ya que, si se eliminan los osteoblastos del hueso, se puede generar severas anomalías hematopoyéticas, regulación inmune anormal y hasta una disrupción en el metabolismo de la glucosa.

Las células del hueso, especialmente los osteoblastos, son células sensoras del oxígeno que crecen y se diferencian bajo condiciones de concentración baja de oxígeno. Por lo tanto, VHL, HIF-1alfa son expresados en los osteoblastos. Un estudio preliminar mostró que la activación de la ruta HIF-1alfa en el hueso incrementa la toma de la glucosa por los osteoblastos, el cual reduce los niveles de glucosa en sangre (32). La inactivación de HIF-1alfa en los osteoblastos significativamente reduce el volumen del hueso trabecular, baja la tasa de formación de hueso y modifica la arquitectura del hueso cortical. En el caso contrario cuando aumenta la actividad de HIF-1alfa por la delección de la pVHL, se incrementa la masa del hueso ya que se regula mejor la formación de hueso osteoblástico y resorción del hueso por los osteoclastos. Además, el aumento de la activación de HIF-1alfa por la delección del gen *vhl*, incrementa el nivel de glucosa, la ruta de la glucólisis y la utilización de glucosa en el hueso, el cual conduce a un incremento general en la toma de glucosa a partir de la circulación sanguínea por el sistema esquelético y esto está correlacionado con los niveles de glucosa sanguínea reducida (32).

Además, se ha visto que al incrementar la masa del hueso y reducir los niveles de glucosa sanguínea por la activación de la ruta HIF-1alfa, parcialmente alivia los síntomas de la diabetes mellitus tipo 1 inducida por estreptozotocina (T1DM) y este proceso es llevado a cabo por la condición de hipoxia en el osteoblasto que activa la ruta HIF-1alfa-RegIIIgamam en el esqueleto (33).

La enfermedad del riñón diabético es la causa principal del estado final de la función renal. La hipoxia juega un papel en el desarrollo y progresión del riñón diabético. Un modelo de ratón con eliminación del gen *vhlh* en combinación con diabetes tipo I inducido por estreptozotocina fue realizado y comparado con un ratón diabético control (sin pérdida del gen *vhlh*). El ratón con delección en el gen *vhlh* presento alteraciones morfológicas y metabólicas en el glomérulo y en la parte tubular y el cambio más significativo de alteración fue la tasa de consumo de oxígeno celular y la inhibición de autofagia comparado con el ratón control. La estabilización de HIF-1alfa en el ratón con delección del gen *vhlh* provocó una modificación de histonas y remodelamiento de la cromatina. Estos datos demuestran que la estabilización de HIF-1alfa está asociado con el daño temprano al riñón y que la hipoxia es importante para el inicio de la DM tipo 1 (34).

Por último, la retinopatía diabética es otra alteración importante en la diabetes. Un modelo de ratón con retinopatía diabética fue generado para estudiar la señalización VHL-HIF-alfa. El resultado mostró una elevada expresión de miR-135b-5p y HIF-1alfa, y una baja expresión de la pVHL. Cuando se indujo una baja expresión de miR-135b-3p se observó sobre expresión de la pVHL lo cual provocó una errónea hiperplasia vascular, inflamación y apoptosis y una disminución en la expresión de HIF-1alfa en la retinopatía diabética murina. Esto indica que microRNA miR-135b-3p inhibe la función de la pVHL y cuando la

pVHL es inhibido su función provoca la estabilidad de HIF-1alfa y proliferación celular endotelial y angiogénesis lo cual es posiblemente el problema de la retinopatía diabética murina (35).

En conclusión, estas evidencias demuestran que la pVHL está asociada con la DM y una terapia usando la pVHL podría ayudar a normalizar el metabolismo de la glucosa en la DM. En un estudio preliminar en nuestro grupo de trabajo se ha encontrado que los ratones diabéticos tipo 2 inducidos con una dieta hipercalórica al ser introducidos en el páncreas un adenovirus que expresa el gen *vh1* resulta en el restablecimiento de la glicemia sanguínea. Esta posible terapia de la pVHL contra la DM puede ser prometedora y aliviar las complicaciones de los diferentes órganos por la alta glucosa sanguínea. Es vital que experimentos sean realizados con este objetivo terapéutico para reducir la epidemia de la DM.

Referencias

1. Hammel PR, Vilgrain V, Terris B, et al. Pancreatic involvement in von Hippel-Lindau disease: the Groupe Francophone d'Etude de la Maladie de von Hippel-Lindau. *Gastroenterology*. 2000; 119:1087-1095.
2. Mukhopadhyay B, Sahdev A, Monson JP, et al. Pancreatic lesions in von Hippel-Lindau disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002; 57:603-608.
3. Ku YH, Ahn CH, Jung CH, et al. A novel mutation in the von hippel-lindau tumor suppressor gene identified in a patient presenting with gestational diabetes mellitus. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2013; 28:320-325.
4. Onishi Y, Shimizu H, Koyasu S, et al. Association Between Pancreatic Cysts and Diabetes Mellitus in Von Hippel-Lindau Disease. *Cureus*. 2024; 16:e54781.
5. Ronen JA, Gavin M, Ruppert MD, et al. Glycemic Disturbances in Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cureus*. 2019; 11:e4551.
6. Wang Y, Liu Z, Zhao W, et al. Diversities of Mechanism in Patients with VHL Syndrome and diabetes: A Report of Two Cases and Literature Review. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2024; 17:1611-1619.
7. Bus SA, Armstrong DG, Gooday C, et al. Guidelines on offloading foot ulcers in persons with diabetes (IWGDF 2019 update). *Diabetes Metab Res Rev*. 2020; 36 Suppl 1:e3274.
8. Catrina SB, Zheng X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. *Diabetologia*. 2021; 64:709–716.

9. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2001; 15:2675-2686.
10. Catrina SB, Zheng X. Disturbed hypoxic responses as a pathogenic mechanism of diabetic foot ulcers: HIF-1 and Wound Healing in Diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016; 32:179–185.
11. Catrina SB, Okamoto K, Pereira T, et al. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1 α protein stability and function. *Diabetes.* 2004; 53:3226-3232.
12. Bento CF, Fernandes R, Ramalho J, et al. The chaperone-dependent ubiquitin ligase CHIP targets HIF-1 α for degradation in the presence of methylglyoxal. *PLoS One.* 2010; 5:e15062.
13. Thangarajah H, Yao D, Chang EI, et al. The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:13505-13510.
14. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 α . *J Clin Invest.* 2007; 117:1249-1259.
15. Frost J, Galdeano C, Soares P, et al. Potent and selective chemical probe of hypoxic signalling downstream of HIF- α hydroxylation via VHL inhibition. *Nat Commun.* 2016; 7:13312.
16. Puri S, Akiyama H, Hebrok M. VHL-mediated disruption of Sox9 activity compromises β -cell identity and results in diabetes mellitus. *Genes Dev.* 2013; 27:2563-2575.
17. Landsman L, Parent A, Hebrok M. Elevated Hedgehog/Gli signaling causes b-cell dedifferentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108:17010–17015.
18. Seymour PA, Freude KK, Tran MN, et al. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104:1865–1870.
19. Cantley J, Selman C, Shukla D, et al. Deletion of the von Hippel-Lindau gene in pancreatic beta cells impairs glucose homeostasis in mice. *J Clin Invest.* 2009; 119:125-35.
20. Gnarr JR, Ward JM, Porter FD, et al. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:9102–9107.
21. Rankin EB, Tomaszewski JE, Haase VH. Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res.* 2006; 66:2576–2583.

22. Haase VH, Glickman JN, Socolovsky M, et al. Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:1583–1588.
23. Puri S, Cano DA, Hebrok M. A role for von Hippel-Lindau protein in pancreatic beta-cell function. *Diabetes*. 2009; 58:433–441.
24. Dionne KE, Colton CK, Yarmush ML. Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans. *Diabetes*. 1993; 42:12–21.
25. Li X, Zhang L, Meshinchi S, et al. Islet microvasculature in islet hyperplasia and failure in a model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006; 55:2965–2973.
26. Gunton JE, Kulkarni RN, Yim S, et al. Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell*. 2005; 122:337–349.
27. Santer R, Schneppenheim R, Dombrowski A, et al. Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Nat Genet*. 1997; 17:324–326.
28. Lacraz G, Giroix MH, Kassis N, et al. Islet endothelial activation and oxidative stress gene expression is reduced by IL-1Ra treatment in the type 2 diabetic GK rat. *PLoS One*. 2009; 4:e6963.
29. Puri S, García-Núñez A, Hebrok M, et al. Elimination of von Hippel-Lindau function perturbs pancreas endocrine homeostasis in mice. *PLoS One*. 2013; 8:e72213.
30. Gunton JE, Kulkarni RN, Yim S, et al. Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell*. 2005; 122:337–349.
31. Choi D, Cai EP, Schroer SA, et al. Vhl is required for normal pancreatic β cell function and the maintenance of β cell mass with age in mice. *Lab Invest*. 2011; 91:527–538.
32. Dirckx N, Tower RJ, Mercken EM, et al. Vhl deletion in osteoblasts boosts cellular glycolysis and improves global glucose metabolism. *J Clin Invest*. 2018; 128:1087–1105.
33. Qiu M, Chang L, Tang G, et al. Activation of the osteoblastic HIF-1 α pathway partially alleviates the symptoms of STZ-induced type 1 diabetes mellitus via RegIIy. *Exp Mol Med*. 2024; 56:1574–1590.
34. Kunke M, Knöfler H, Dahlke E, et al. Targeted deletion of von-Hippel-Lindau in the proximal tubule conditions the kidney against early diabetic kidney disease. *Cell Death Dis*. 2023; 14:562.
35. Liu L, Xu H, Zhao H, et al. MicroRNA-135b-5p promotes endothelial cell proliferation and angiogenesis in diabetic retinopathy mice by inhibiting Von Hipp-

el-Lindau and elevating hypoxia inducible factor α expression. J Drug Target. 2021;
29:300-309.

Capítulo VIII

VHL en la articulación y hueso

1. La articulación

La articulación tiene la función de unir los huesos para facilitar el movimiento mecánico, proporciona elasticidad y plasticidad al cuerpo. Existen articulaciones móviles como los brazos, la cadera, y otros son de tipo no móvil como los huesos del cráneo.

En el cuerpo humano se tienen varios tipos de huesos y éstos se enlazan por la articulación, por lo cual existen diferentes tipos de articulaciones, sin embargo, uno de los más importante es la articulación sinovial y la articulación interfalángica de mano y pie, debido a que esta articulación sinovial tiene alta movilidad y está constituido por una cavidad llena de líquido sinovial la cual está recubierta por la membrana sinovial. La punta o parte final del hueso está cubierta de cartílago articular. Con la finalidad de reforzar la articulación una cápsula articular fibrosa recubre todo el conjunto de la articulación.

El líquido sinovial está anatómicamente en el interior de la cápsula articular, en el espacio que existe entre los huesos. Es un líquido lubricante que tiene la función de nutrir el cartílago, además evita el roce de las superficies articulares para facilitar el movimiento. Este líquido es producido por la membrana sinovial y esta constituido de ácido hialurónico y mucina principalmente. La membrana sinovial recubre la superficie interna de la articulación, está formada de varios tipos de células como los sinoviocitos de tipo A que son muy similares a macrófagos con función de limpiar los restos metabólicos y los sinoviocitos de tipo B que sintetizan el ácido hialurónico y la mucina.

El cartílago recubre la superficie final de los huesos para proporcionar amortiguación de la carga y deslizamiento de las superficies articulares. El cartílago no tiene vasos sanguíneos y la nutrición de éste es por medio de difusión que proviene del líquido sinovial. El cartílago está constituido por la célula del condrocito que está embebido en la matriz extracelular y la función es producir diferentes tipos de colágeno y proteoglicanos que son los componentes principales de la matriz extracelular. La capacidad de regeneración del condrocito y a la vez del cartílago es escasa cuando existe un daño.

Las articulaciones pueden sufrir diferentes daños y provocar inflamación que es considerado como una artritis. La forma más común de artritis y afecta a millones de personas en todo el mundo es la osteoartritis que se produce cuando el cartílago se desgasta con el tiempo. En este capítulo hablaremos sobre la relación que existe entre la pVHL y la articulación.

2. Relación Artritis con la enfermedad de VHL

Dentro de los diferentes tipos de artritis un miembro de ellas es la artritis idiopática juvenil que es una inflamación articular presente en los niños menores de 16 años con presencia de dolor y rigidez articular persistente. La artritis idiopática juvenil oligoarticular es el subgrupo clínico mas prevalente de este tipo de artritis, el cual involucra al menos 5 articulaciones dañadas. La artritis idiopática juvenil tiene un estimado anual de incidencia de 5-20 casos por 100,000 niños. La edad pico de inicio es de 1 a 3 años y el sexo femenino está más afectada por un nivel de dos veces de riesgo comparado con el sexo masculino. El tratamiento involucra glucocorticoides intra-articular, drogas anti-inflamatorias no esteroideas y drogas anti-reumáticos como el metotrexate. Los agentes biológicos (ejemplo infliximab) son usualmente reservados para aquellos casos de niños con uveítis o involucramiento de articulaciones extensivas (1).

Hay muy pocos reportes de pacientes con enfermedad de VHL y concomitante con enfermedad autoinmune. En un trabajo se describe el primer caso reportado de artritis inflamatoria en una niña de 19 meses de edad con enfermedad de VHL. La niña de 19 meses mostró, en imágenes de radiografía, una fractura supracondilar tipo 1 no desplazado. El artrograma (equipo que determina articulaciones) reveló no fracturas, cuerpos sueltos o inestabilidad del codo, sin embargo, después de tres meses mostró una efusión de la articulación con proliferación sinovial de artritis inflamatoria. La aspiración de la articulación mostró fluido sinovial inflamatorio principalmente con linfocitos y no presencia de cristales; este diagnóstico fue clasificado como una artritis idiopática juvenil. El tratamiento fue con metotrexate. Su historia familiar manifestó parientes con enfermedad de VHL, los miembros familiares con la enfermedad de VHL no mostraron historia de artritis inflamatoria o enfermedad autoinmune. El análisis genético mostró que la paciente tiene las mutaciones comunes descritas como patogénicas del gen *vhl* (c.448_449del; p.Asn150Tyrfs*23) el cual confirma su diagnóstico de enfermedad de VHL (1).

Este caso clínico presentado es el primero que demuestra una asociación entre la artritis inflamatoria y la enfermedad de VHL en una niña. Esto puede indicar una coincidencia, sin embargo, por la mutación patológica de VHL hace pensar que la

enfermedad de VHL contribuye al desarrollo de la artritis inflamatoria. Basado sobre la incidencia de artritis juvenil idiopática en mujeres de 5 años de edad (12.2 por 100,000) y la incidencia de la enfermedad de VHL (1 por 36,000), la probabilidad que esta relación entre las dos enfermedades ocurra es de aproximadamente uno en 300 millones, en este sentido puede parecer a una coincidencia, pero la posibilidad es extremadamente baja, pero no es nulo (2).

El mecanismo pato-fisiológico posible puede ser atribuible a una sobre producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que provoca una desregulación de la ruta de señalización del factor de transcripción NF- κ B y una angiogénesis patogénica en el cual estos eventos podría vincularse a la pVHL como una de la causa de la artritis inflamatoria en niños (1).

Con respecto a ERO, éstos son radicales libres derivados del oxígeno que se producen endógenamente en la mitocondria y juegan un papel esencial en el estrés oxidativo. ERO son productos naturales del metabolismo energético y la acumulación de éstos puede causar un daño celular. ERO también induce efectos tumorigénicos tales como incremento en la proliferación celular y metástasis. ERO juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de VHL. En las células que carecen de pVHL, el HIF-1 α es relativamente activo a los cambios en oxígeno, esta proteína activa genes blanco inducible por hipoxia hasta en condiciones de un nivel de oxígeno normal. Adicionalmente pacientes con la enfermedad de VHL muestran una baja regulación en las enzimas antioxidantes que son claves en la homeostasis de ERO por el cual provoca una acumulación de estos radicales. Por otro lado, el papel de ERO en la artritis inflamatoria ha sido estudiado, Lipinska y cols, mostraron que una falta del balance entre la producción de ERO y su neutralización conduce a un estado de estrés oxidativo; los niños con artritis idiopática juvenil tienen altas concentraciones de óxido nítrico (un medidor de estrés oxidativo) en suero, esto sugiere que la sobre producción de óxido nítrico está involucrado en la patogénesis de artritis inflamatoria en niños (3). Por otro lado, HIF-1 α es el blanco terapéutico para tratar el carcinoma de célula renal (CCR) en los pacientes con enfermedad de VHL, muchos estudios muestran que HIF-1 α también juega un papel clave en la patogénesis de la artritis inflamatoria por la inducción de la producción de citocinas inflamatoria y autoanticuerpos (4).

Para el caso del factor de transcripción NF- κ B, se ha visto que aproximadamente el 70% de los pacientes con enfermedad de VHL desarrollan CCR en una edad de 60 años, y la ruta de señalización del NF- κ B ha llegado a ser un blanco excitante para el tratamiento de CCR en estos pacientes. Estudios han mostrado que la célula proveniente de CCR que carece de la pVHL funcional tiene significativamente más alta expresión y actividad de NF- κ B comparada con aquella célula CCR con la pVHL funcional (5). El NF- κ B también es identificado como un regulador clave de la inflamación en la artritis reumatoide. Hay evidencias que muestran el papel importante de la activación de NF- κ B en la iniciación y perpetuación de la inflamación crónica de la artritis inflamatoria (6). De hecho, NF- κ B activo está presente en el tejido sinovial de pacientes en estado temprano de la inflamación articular y también en estado tardío de la enfermedad.

La angiogénesis es el proceso de desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, el cual es esencial para el funcionamiento fisiológico normal, así como también en los procesos patológicos como la inflamación sinovial en la artritis inflamatoria y en la progresión del tumor en la enfermedad de VHL. En artritis idiopática juvenil, existe una fuerte correlación entre la expresión de VEGF y la actividad inflamatoria en las articulaciones afectadas. Adicionalmente, niveles altos de VEGF están presentes en suero de niños con artritis inflamatoria y fuertemente correlaciona con la actividad de la enfermedad (7). En la enfermedad de VHL, la inactivación de la pVHL conduce a la angiogénesis desregulada por la activación de HIF-1alfa el cual sobre regula a VEGF y este VEGF es altamente expresado en varios de los tumores presentes en esta enfermedad.

Por lo tanto, la sobre producción de ERO, el señalamiento de NF-kB activo y la angiogénesis patológica juegan papeles importantes en la pato-fisiología de la enfermedad de VHL y también en la artritis inflamatoria, esto establece la base de la hipótesis de que sí existe una relación estrecha entre estas dos enfermedades. La susceptibilidad genética podría también contribuir a la patogénesis de ambas enfermedades. En este sentido, la genética de la enfermedad de VHL está bien establecida; en contraste, la artritis idiopática juvenil es poligénica con múltiples alelos de antígenos de histocompatibilidad (HLA) y alrededor de más de 25 locis de susceptibilidad no asociados a HLA. Por lo tanto, una asociación con base a la arquitectura genómica entre estas dos enfermedades es posible que ocurra.

3. Condrocito y la pVHL

El condrocito vive en un ambiente libre de vascularización por el cual tiene la habilidad de resistir considerablemente las condiciones de hipoxia dentro del cartílago articular avascular. El factor transcripcional HIF-1alfa tiene la función importante de mantener la célula en condiciones de hipoxia por la regulación de genes que participan en la hipoxia. En el condrocito, HIF-1alfa tiene una función importante para su mantenimiento hipóxico. La inhibición de esta proteína puede causar daño en el condrocito y por lo tanto la progresión de la osteoartritis en la articulación. Con la finalidad de observar la importancia de HIF-1alfa en la articulación murina, la inyección de un inhibidor de HIF-1alfa (2-metoxiestradiol) en la articulación de la rodilla del ratón Balb/C provoca la pérdida de la función de HIF-1alfa. En la articulación del ratón con el inhibidor de HIF-1alfa presenta cambios osteoartíticos como son la formación de osteofitos, una destrucción progresiva del cartílago articular durante el paso del tiempo y reacciones inflamatorias (**Figura 1**). Esto indica la importancia de HIF-1alfa en el mantenimiento de la integridad del cartílago

articular hipóxico (8).

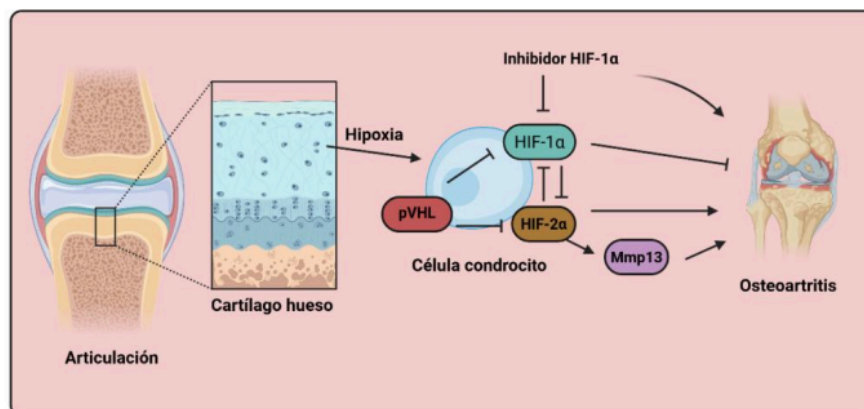


Figura 1. VHL en la articulación. En el cartílago del hueso es un ambiente hipóxico, los condrocitos se adaptan a esta condición mediante HIF. El condrocito expresa HIF-1alfa y HIF-2alfa, para el caso de HIF-1alfa protege la articulación hacia una osteoartritis, sin embargo, HIF-2alfa tiene el efecto contrario (induce la osteoartritis) por la inducción de la expresión de la metaloproteasa 13 (Mmp13) y otros factores. La aplicación de un inhibidor específico para HIF-1alfa provoca la osteoartritis. Ambos HIFs tiene efectos opuestos y pueden regularse entre ellos, sin embargo, pVHL tiene la función de controlar estos factores, pero como el condrocito está en condiciones de hipoxia pVHL no tiene una función adecuada.

La actividad de HIF-1alfa en el condrocito para el mantenimiento adecuado del cartílago sugiere que HIF-1alfa puede ser la causa de enfermedades articulares. Durante el desarrollo de la osteoartritis en ratón muestra una expresión de HIF-1alfa muy baja dando el indicativo de un elemento clave en el progreso de la osteoartritis (OA). El condrocito en cultivo celular muestra que HIF-1alfa suprime los genes catabólicos (involucrados en la destrucción del cartílago) tales como la metaloproteína 13 (Mmp13) y Hif2a. Por otro lado, la OA puede ser inducida por cirugía en la articulación de un ratón. Entonces, en un ratón con eliminación en el gen *hif1a* específicamente en el condrocito y después de la inducción de OA por cirugía, presenta una exacerbación del desarrollo de OA, con un incremento en la expresión de factores catabólicos (Mmp13 y HIF-2alfa) y activación elevada de la señal del factor de transcripción NF-kB. La conclusión es que HIF-1alfa tiene una función anti-catabólica en el mantenimiento del cartílago articular a través de la supresión de la activación de la señal de NF-kB (9).

Contrario a la OA, la osificación endocondrial es un proceso del crecimiento óseo y esto consiste que en la parte del cartílago se transforma en hueso donde se incluyen varios fenómenos como la hipertrofia del condrocito, la degradación de la matriz del cartílago, invasión vascular, expresión del colágeno tipo X (COL10A1), metaloproteína de matriz-13 (MMP-13) y VEGF que son los elementos centrales de esta transformación. Se tiene reportado que el promotor del gen *COL10A1* (que codifica para el colágeno tipo X) tiene

elementos de unión para HIF-2alfa, lo cual indica que HIF-2alfa es el transactivador para la transcripción del gen *COL10A1*; también se ha visto que HIF-2alfa puede potenciar la actividad promotora de los genes que codifica para las proteínas MMP13 y VEGF. Otros estudios mencionan que el condrocito cultivado *in vitro* o en el crecimiento del esqueleto embrionario del ratón, HIF-2alfa es esencial para la osificación endocondrial, así de esta manera indica que HIF-2alfa es un modulador para la generación de hueso nuevo. Sin embargo, se ha visto que en la osteoartritis hay una degeneración de la actividad del condrocito y de la matriz extracelular de la articulación, por lo cual se piensa que HIF-2alfa puede estar involucrado en esta enfermedad. En este sentido, se ha demostrado que la expresión de HIF-2alfa es más alta en el cartílago osteoartítico comparado con el cartílago normal en el ratón, así también esto ocurre en el humano.

Con la finalidad de asociar a HIF2-alfa con la osteoartritis, un grupo de investigación generó un ratón deficiente en el gen *Epas1* (gen que codifica a HIF-2alfa) en el condrocito y observaron que este ratón tiene una resistencia hacia el desarrollo de la osteoartritis, por otro lado, este resultado concuerda con una mutación tipo polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el gen *Epas1* de humano que fue asociado con la osteoartritis de la rodilla en una población de Japón. De esta manera, HIF-2alfa es un transactivador central para la transcripción inducida de algunos genes cruciales para la osificación endocondrial y puede representar un blanco terapéutico para la osteoartritis. (10). En conclusión, se puede decir que las proteínas HIFs están involucrados en la fisiología del condrocito, por un lado HIF-1alfa mantiene la función del condrocito para la formación del cartílago mientras que HIF-2alfa inhibe la actividad de HIF-1alfa, sin embargo, una sobre activación de los HIFs lleva a daño a la estructura del cartílago, por lo tanto es importante mantener regulados las actividades de los HIFs; para tal caso, la pVHL puede ser el elemento clave para la regulación adecuada de la actividad de los HIFs en el condrocito para una homeostasis del cartílago (**Figura 1**). De tal manera la pérdida de la pVHL conlleva a una desregulación del condrocito mediada por HIFs.

4. Osteoartritis y pVHL

La osteoartritis (OA) es un desorden degenerativo crónico de la articulación sinovial, y el tratamiento de OA es muy caro. Actualmente no existen drogas disponibles para la enfermedad OA y el principal problema es el pobre entendimiento del mecanismo patogénico de la OA.

Como se mencionó los HIFs son reguladores importantes en el condrocito. Para el caso de HIF-2alfa, el ratón transgénico para *Epas1* (el gen codificante para HIF-2alfa) en la célula de condrocito desarrolla destrucción del cartílago de una forma espontánea en la rodilla, así como la sobre expresión de HIF-2alfa por una inyección intra-articular de un adenovirus-*Epas1* (10). Por otro lado, el ratón con una eliminación genética heterocigótica de *Epas1* es resistente al desarrollo de OA inducido por cirugía en la articulación de la rodilla (11). Con respecto a HIF-1alfa, la eliminación genética de HIF-1alfa en el condrocito conduce a un efecto de enanismo y un acortamiento bien marcado de las extremidades del ratón, además de una muerte celular masiva en la articulación durante el desarrollo del animal (12). Aunque no hay una evidencia genética para el papel de HIF-1alfa en el desarrollo de la enfermedad OA, la inducción de OA por inhibición de la función de HIF-1alfa (2-metoxiestradiol) demuestra la importancia de HIF-1alfa en el

mantenimiento de la homeostasis del cartílago articular. A pesar de que HIF-1 y 2 alfa tienen una cercanía del 50% de homología en la secuencia de aminoácidos, las proteínas tienen una función diferente y opuesta en el cartílago. HIF-1 alfa es esencial para la supervivencia del condrocito y diferenciación en el desarrollo de la articulación, mientras que HIF-2 alfa actúa como un factor catabólico en el cartílago ya que promueve la diferenciación hipertrófica y el incremento de la apoptosis en esta célula. A pesar del conocimiento de la función de HIF-2 alfa, existen pocos reportes del papel de la pVHL sobre ambos HIFs en el mantenimiento de la homeostasis del cartílago articular en el adulto.

Como ya es sabido, la pVHL es un regulador negativo de HIF-1 alfa y HIF-2 alfa en condiciones de normoxia. El papel fisiológico de la pVHL en el desarrollo del esqueleto ha sido bien establecido. Ratones nulos en el gen *vhlh* mueren en el estado embrionario debido a anomalías de la vasculogénesis de la placenta (13). La delección específica del gen *vhlh* en el osteoblasto de ratón conduce a un incremento de la expresión de HIF-1 alfa y VEGF. El ratón mutante en la pVHL desarrolla huesos extremadamente largos, densos y muy vascularizados (14). Por otro lado, la delección del gen *vhlh* en el condrocito incrementa la deposición de la matriz extracelular y reduce la proliferación celular durante el desarrollo del cartílago en condiciones de crecimiento (15). Sin embargo, poco se conoce acerca del papel fisiológico de la pVHL y HIFs en el mantenimiento de la integridad del cartílago articular. La inactivación de la pVHL en el cartílago postnatal conduce a un desarrollo acelerado de AO inducido por cirugía y asociado a la edad. Esto indica que la pérdida de la pVHL estabiliza a HIFs, principalmente HIF-1 alfa, sin embargo, una falta de control de HIF-1 alfa puede sobre llevar su función de regulación de la articulación que provoca una generación de AO (**Figura 2**).

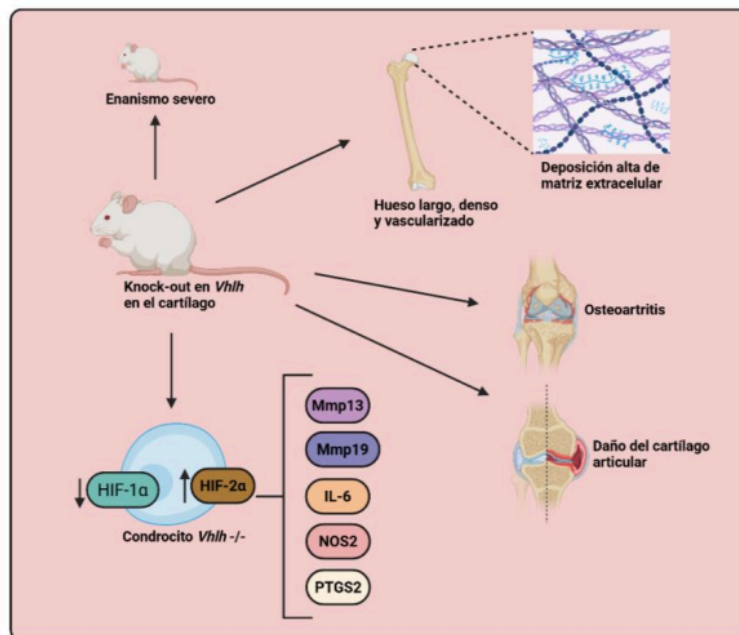


Figura 2. Ratón knock-out en el gen *vhlh* en el cartílago. La eliminación del gen *vhlh* en el ratón produce un enanismo severo, los huesos son largos, densos y vascularizados con alta presencia de matriz extracelular. Es susceptible a osteoartritis inducida por cirugía. El cartílago articular presenta daños y alteraciones morfológicas. El condrocito aislado desde el ratón knock-out en el gen *vhlh* tiene una baja producción de HIF-1alfa y una alta expresión de HIF2-alfa. HIF-2alfa induce la expresión de varios factores catabólicos del cartílago provocando susceptibilidad a la enfermedad articular como la osteoartritis.

Para explorar el papel directo de la pVHL en la articulación adulta sana y evitar potencial efectos confusos asociados al desarrollo anormal, un grupo de investigadores generó un ratón con una disrupción específica del gen *vhlh* en el condrocito inducido a los 2 meses, a los cuatro meses el ratón no mostró anormalidades gruesas en la articulación de la rodilla y tampoco significantes cambios estructurales o pérdida de proteoglicanos en el cartílago articular. Sin embargo, estos ratones sufrieron cambios espontáneos en las características histológicas del cartílago articular a la edad de 12 meses, los cambios evidentes en la articulación de la rodilla son la presencia de erosión del cartílago espontáneamente y una pérdida severa de proteoglicanos en el cartílago articular no calcificado (**Figura 2**). Esto sugiere que la deficiencia de la pVHL acelera la degeneración del cartílago articular relacionado con la edad (16).

Con respecto a la pVHL y la AO inducida por cirugía, el ratón con 12 semanas se indujo la AO por cirugía y presentó una estructura histológica del cartílago articular con evidencias de daños muy grandes en la articulación de la rodilla, esto muestra que la inactivación de la pVHL en la articulación adulta acelera la progresión de AO inducida por cirugía. Para entender mejor el mecanismo de la función de la pVHL, se estudiaron los condrocitos de este ratón, en estas células se observaron una alta tasa de apoptosis con un incremento en la expresión de Fas y Bax (proteínas pro-apoptóticas) y una disminución de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Un mecanismo de recuperación del condrocito en condiciones adversas es la autofagia para evitar la AO, los condrocitos del ratón deficiente en la pVHL mostraron una reducción de la expresión de LC-3, principalmente LC-3II y beclina 1 (proteínas autofágicas), contrario a esto, mTOR fosforilado activo se encontró presente en la articulación. Este hallazgo soporta la hipótesis que la inactivación de la pVHL provoca la apoptosis del condrocito y la inhibición de la autofagia como mecanismo asociado a la AO o a la des-estabilización de la articulación dependiente de la edad (16).

Al analizar la función de HIF-1alfa y HIF-2alfa en las articulaciones con AO, el condrocito deficiente en el gen *vhlh* tiene más alta expresión de HIF-2alfa comparada a la expresión de HIF-1alfa. La enzima catabólica MMP-13 es la principal collagenasa responsable para la degradación del colágeno y esta proteína es un blanco directo de HIF-2alfa, por lo tanto, la expresión de MMP-13 fue observada aumentada en la articulación de la rodilla del ratón deficiente en el gen *vhlh*, así como también en el modelo de AO inducida por cirugía. Otros blancos de HIF-2alfa como IL-6 y MMP-9 también están altamente expresados en las mismas muestras (**Figura 2**). Estos resultados sugieren que la ruta VHL/HIF-2alfa juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del cartílago.

También se sabe que la destrucción del cartílago osteoartítico es causada por un desbalance entre los factores anabólicos y catabólicos. En este sentido HIF-2alfa (codificado por el gen *Epas1*) es un factor de transcripción catabólico que fomenta el

proceso de la osteoartritis. HIF-2alfa directamente induce la expresión de genes que codifican a factores catabólicos en la célula del condrocito que incluyen a las metaloproteinasas de matriz MMP1, MMP3, MMP9, MMP12 y MMP13, agrecanasa-1 (ADAMTS4), “sintasa del óxido nítrico-2” (NOS2) y la “sintasa de endoperóxido prostaglandina -2” (PTGS2). Se ha visto que la expresión de HIF-2alfa está marcadamente aumentada en el cartílago osteoartrítico de ratón y humano, y esta alta expresión de HIF-2alfa dispara la destrucción del cartílago articular en el ratón y en el conejo (**Figura 2**). Además, el ratón transgénico para el gen *Epas1* específico en el condrocito muestra una destrucción del cartílago espontáneamente, mientras la eliminación genética de *Epas1* en el ratón suprime la destrucción del cartílago causado por la falta de estabilización del menisco medial, debido a la modulación de factores catabólicos. Estos hallazgos muestran que HIF-2alfa causa la destrucción del cartílago por la regulación de genes catabólicos cruciales y esto sugiere que la pVHL podría utilizarse en el tratamiento de la OA, ya que la pVHL es un regulador importante de HIF-2alfa (17).

5. Hueso y pVHL

El desarrollo del esqueleto depende de dos mecanismos: la formación del tejido intramembranoso y la formación de hueso endocondrial. Las células involucradas en la formación de hueso son el osteoblasto y el condrocito. La célula mesenquimal se desarrolla directamente en osteoblasto, el osteoblasto se diferencia en osteocito para iniciar el proceso de osificación (formación de hueso). Por otro lado, la célula de condrocito forma un molde de matriz, llamada la placa de crecimiento, situada en la parte final del hueso. La formación del hueso por la vía de hueso endocondrial, el condrocito de la placa de crecimiento sufre una fase de proliferación celular, diferenciación y apoptosis bien ordenada y controlada. En la ronda proliferativa del condrocito sintetiza el colágeno tipo II y forma una capa columnar, que posteriormente el condrocito se diferencia a célula hipertrófica post-mitótica, que, en este estado, se expresa predominantemente colágeno tipo X y el factor VEGF-A. Después de este proceso de diferenciación, ocurre la muerte del condrocito hipertrófico y en esta etapa existe invasión de vasos sanguíneos que finalmente reemplazan la matriz cartilaginosa con hueso trabecular.

La placa de crecimiento del hueso fetal es un tejido avascular, y por lo tanto la hipoxia es un elemento principal en la zona más adentro del hueso comparado con la zona superficial. La adaptación de las células y tejidos al microambiente hipóxico requiere la presencia de HIF-1alfa, el cual es la molécula clave en la respuesta hipóxica para regular la expresión de enzimas glucolítica y algunos factores de crecimiento como VEGF.

Con el objetivo de determinar la función de la pVHL en el desarrollo de hueso endocondrial, se generó un ratón con inactivación condicional del gen *vh1h* en todos los elementos cartilaginosos. El ratón carente en la pVHL en el cartílago es viable, pero el crecimiento es mas bajo que los controles y además este ratón desarrolla un enanismo severo. En las observaciones morfológicas, la placa de crecimiento de un ratón con eliminación en la pVHL se puede observar una reducción significativa en la tasa de proliferación del condrocito, un incremento de la matriz extracelular y la presencia de células largas atípicas dentro de la zona en reposo. Además, se ha observado que cuando se estabiliza HIF-1alfa existe un incremento en el nivel de expresión de los genes blancos de HIF en la placa de crecimiento del hueso con carencia de la función de la pVHL. También se ha visto que en el ratón recién nacido carente de ambos genes *vh1h* y *hif-1alfa* en la placa

de crecimiento, el condrocito despliega esencialmente el mismo fenotipo como los ratones mutantes únicamente en HIF-1alfa. Esto indica que la pVHL tiene un papel crucial en el desarrollo del hueso endocondrial y es necesario para la proliferación del condrocito normal *in vivo* (18).

Otros trabajos muestran que el condrocito que no tiene el gen *hif1alfa* se encuentra muerto en la placa de crecimiento debido a una disminución en la expresión del inhibidor CDK p57, y un aumento en los niveles de incorporación de BrdU (bromo-desoxiuridina) en el DNA genómico, lo cual indica que hay un defecto en el arresto del crecimiento regulado por HIF-1alfa. Además, en la placa de crecimiento en particular en el área donde están los condrocitos muertos hay una expresión de VEGF, lo cual sugiere que la expresión de VEGF es independiente de HIF-1alfa y esto produce una angiogénesis fuera de lo normal. Esto fortalece la evidencia de la importancia de HIF-1alfa en el desarrollo y sobrevivencia celular del condrocito en la placa de crecimiento (19).

Se conoce que el desarrollo y recambio del esqueleto ocurre en asociación temporal y espacial con la angiogénesis y en este sentido el osteoblasto juega un papel importante. El osteoblasto está presente en el hueso y tiene la capacidad de ser un sensor de la tensión de oxígeno y tiene la habilidad de responder a la hipoxia. El HIF-1alfa promueve la angiogénesis y osteogénesis por el incremento del nivel de VEGF en el osteoblasto. En un estudio se encontró que el ratón que sobre expresan HIF-1alfa en el osteoblasto debido a una eliminación selectiva de la pVHL llegan a expresar altos niveles de VEGF y el fenotipo en los huesos largos es que son huesos más densos y muy vascularizados. Por contraste, los ratones carentes del gen *Hif-1alfa*, el osteoblasto tiene un fenotipo de un esqueleto contrario a aquel del ratón mutante en el gen *vhlh*, es decir los huesos largos son significativamente más delgados y menos vascularizados. La pérdida de la pVHL en el osteoblasto incrementa el brote de células endoteliales desde el metatarso. Por otro lado, el ratón carente de ambos genes *vhlh* y *Hif-1alfa* tiene un fenotipo de huesos intermedio comparado con el ratón mutante en un sólo gen. Esto indica una función antagónica entre HIF-1alfa y pVHL en el hueso (20).

Con respecto a la alteración en la articulación y más específicamente en la artritis reumatoide (AR), se ha visto que la sinovia en un microambiente hipóxico significativamente promueve el progreso patológico de la AR. El HIF-1alfa es un blanco prometedor para el desarrollo de un agente terapéutico para el tratamiento de AR, ya que se han probado inhibidores de la ruta de la síntesis de HIF-1alfa como los derivados de “diaryl substituted isoquinolin-1” (2H) representado por el compuesto 17q en la AR y se han obtenido buenos resultados. Por ejemplo, un estudio farmacológico revela que el compuesto 17q bloquea a HIF-1alfa de una manera dosis dependiente y este bloqueo reduce la respuesta inflamatoria ya que inhibe la invasión celular, además, se observó que el compuesto 17q mejora el daño patológico de la articulación, disminuye la angiogénesis y la respuesta inflamatorio en la artritis inducida por adyuvante de un modelo desarrollado en rata. Con base a lo anterior, el compuesto 17q es un elemento potencial terapéutico para la inhibición efectiva de HIF-1 y el mejoramiento de la AR (21). Por lo tanto, esto indica que la pVHL posiblemente también puede ser usado en el tratamiento de la AR.

La pVHL en el hueso es elemental para la regulación de los HIFs y es importante determinar como el pVHL puede controlar de forma específica a HIF-1alfa y también a HIF-2alfa en el condrocito, ya que estos HIFs tiene funciones opuestas en el mantenimiento del condrocito, por el cual conocer el escenario completo de la función de la pVHL en el

condrocito es de vital importancia para posteriormente ser usado como una herramienta terapéutica en la OA o en el AR.

Referencias

1. Bryant MC, Massingham LJ, Yalcindag A. Inflammatory Arthritis in a 19-month-old with Von Hippel-Lindau Disease. *R I Med J.* 2023; 106:30-33.
2. Binderup MLM, Galanakis M, Budtz-Jørgensen E, et al. Prevalence, birth incidence, and penetrance of von Hippel-Lindau disease (vHL) in Denmark. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2017; 25:301-307.
3. Lipińska J, Lipińska S, Stańczyk J, et al. Reactive oxygen species and serum antioxidant defense in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Rheumatol.* 2015; 34:451-456.
4. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9:609-617.
5. Qi H, Ohh M. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein sensitizes renal cell carcinoma cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB-dependent antiapoptotic pathway. *Cancer Res.* 2003; 63:7076-7080.
6. Asahara H, Asanuma M, Ogawa N, et al. High DNA-binding activity of transcription factor NF-kappa B in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Mol Biol Int.* 1995; 37:827-832.
7. Vignola S, Picco P, Falcini F, et al. Serum and synovial fluid concentration of vascular endothelial growth factor in juvenile idiopathic arthritides. *Rheumatol Oxf Engl.* 2002; 41:691-696.
8. Gelse K, Pfander D, Obier S, et al. Role of hypoxia-inducible factor 1 alpha in the integrity of articular cartilage in murine knee joints. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10:R111.
9. Okada K, Mori D, Makii Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha maintains mouse articular cartilage through suppression of NF-κB signaling. *Sci Rep.* 2020; 10:5425.
10. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, et al. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med.* 2010; 16:678-686.
11. Yang S, Kim J, Ryu JH, et al. Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. *Nat Med.* 2010; 16:687e93.
12. Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, et al. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* 2001; 15:2865e76.
13. Gnarr JR, Ward JM, Porter FD, et al. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci US A.* 1997; 94:9102e7.
14. Wang Y, Wan C, Deng L, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest.* 2007; 117:1616e26.
15. Pfander D, Kobayashi T, Knight MC, et al. Deletion of Vhlh in chondrocytes reduces cell proliferation and increases matrix deposition during growth plate development. *Development.* 2004; 131:2497e508.

16. Weng T, Xie Y, Yi L, et al. Loss of Vhl in cartilage accelerated the progression of age-associated and surgically induced murine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014; 22:1197-1205.
17. Yang S, Kim J, Ryu JH, et al. Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. *Nat Med*. 2010; 16:687-93.
18. Pfander D, Kobayashi T, Knight MC, et al. Deletion of Vhlh in chondrocytes reduces cell proliferation and increases matrix deposition during growth plate development. *Development*. 2004; 131:2497-2508.
19. Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, et al. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev*. 2001; 15:2865-2876.
20. Wang Y, Wan C, Deng L, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest*. 2007; 117:1616-1626.
21. Cai L, Xiong PF, Li T, et al. Discovery of novel diaryl substituted isoquinolin-1(2H)-one derivatives as hypoxia-inducible factor-1 signaling inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis. *Eur J Med Chem*. 2024; 271:116417.

Capítulo IX

Neurología y VHL

1. La célula madre neuronal (CMN)

Desde que Santiago Ramón y Cajal, un neuro-anatomista español del siglo 19, propusiera que los nervios centrales dañados no pueden regenerarse, se creó la idea de que la célula madre (célula fuente de regeneración de tejido) no existe en el sistema nervioso central del humano adulto. Sin embargo, en 1965, se demostró que las neuronas pueden ser generadas nuevamente a partir de la zona del hipocampo de ratas adultas. Posteriormente, en 1998, fue demostrado que la célula madre neuronal (CMN) existe en la zona subventricular humana y en las zonas sub-granular del giro dentado del hipocampo, con esto llega a ser claro que la neurona es también producida en el hipocampo humano adulto y que la neurona se puede regenerar.

Con esta premisa de la existencia de CMN en el cerebro, estudios han sido enfocados en descifrar los factores y mecanismos que conllevan a la diferenciación de CMN a una neurona funcional para el desarrollo del sistema nervioso. El entendimiento de la diferenciación facilita nuestra habilidad para inducir la diferenciación de CMN en diferentes tipos celulares deseados a nivel *in vitro*. Un gran número de factores extrínsecos y factores de transcripción contribuyen en el control de la diferenciación de CMN. Por ejemplo, la diferenciación de CMN a una neurona puede ser inducida por el factor de transcripción Neurogenina 1 (Ngn1), seguido por la inducción de la expresión del gen Neuro D (1). Otra ruta de diferenciación de la CMN es por la inducción de la expresión de los genes que codifican a los factores de transcripción tipo “basic hélix-loop-helix” (bHLH), estos factores bHLH son importantes para la diferenciación de CMN hacia células de oligodendrocitos y neuronas (2). Con respecto a la diferenciación de la CMN a oligodendrocitos, la ruta de señalización Sonic Hedgehog (Shh) induce la expresión de los factores Olig1 y Olig2 (factores bHLH) en la CMN para diferenciarse a oligodendrocito (2). Como cualquier proceso tiene que estar regulado, la función de los factores de transcripción tipo bHLH están regulados negativamente por las moléculas de la familia HES y ID y estas moléculas regulatorias son inducidas por las proteínas Notch y la proteína

morfogenética del hueso (BMP). Esto señala que existe una red compleja de factores de regulación del proceso de diferenciación en la CMN.

Otro componente que participa en la diferenciación de la CMN es la familia de citocinas de IL-6 (FC-IL-6), sin embargo, esta familia tiene la función de inducir la diferenciación de CMN al tipo de células neuronales conectivas (3). La simultánea estimulación de CMN con FC-IL-6 y BMP sinérgicamente induce la diferenciación de CMN hacia células de astrocitos y en este proceso la CMN lleva a cabo la diferenciación por la ruta JAK/STAT (3). Además, también se conoce la vía de control de diferenciación del astrocito por FC-IL-6, el control es debido a que FC-IL-6 induce a las “proteínas supresoras de señal citocina” (SOCS), y estas SOCS tiene la función de inhibir la ruta JAK/STAT para provocar un bloqueo en la diferenciación de CMN hacia el astrocito. La participación de la pVHL en la diferenciación de CMN también se ha reportado ya que las proteínas SOCS y pVHL tienen la función de suprimir las rutas JAK/STAT y HIF-VEGF (4), respectivamente. Por lo tanto, SOCS y pVHL están involucrados en suprimir la diferenciación de CMN hacia el astrocito, pero promueven la diferenciación de CMN a células tipo neuronas y oligodendrocitos. De esta manera la CMN puede diferenciarse a oligodendrocito o a astrocito y esto está decidido por la presencia de los factores de diferenciación o el bloqueo de una ruta a la otra.

La pVHL ha sido involucrada en la embriogénesis, una primera evidencia es que el ratón knock-out en el gen *vh/h* no llega a término y hay alteraciones embrionarias, segundo en el caso de la embriogénesis humana, una fuerte expresión del mRNA de VHL está presente y esta expresión está en las tres capas germinales. En particular, la expresión de VHL se observa en el sistema nervioso central, riñón, testículo y pulmón en las semanas 4, 5 y 10 post-concepción. Sin embargo, estudios del patrón de distribución de la expresión de VHL han indicado que VHL es ampliamente expresado en varios tejidos de humano normal y con respecto al tejido neuronal existen altos niveles de expresión de VHL. En particular, la expresión de VHL se observa en células de Purkinje y en células de Golgi tipo II; adicionalmente, VHL también se expresa en el cerebelo, núcleo dentado, núcleo pontino, núcleo olivo inferior de la medula oblonga, ganglio simpático, mesomesio, y plexo submucoso (5). En células nerviosas incluyendo células de Purkinje de cerebelo, en el cerebro de adulto y fetal, VHL también está expresado (6). Además, una fuerte expresión de VHL está presente en CMN que se diferencian a neuronas sobre el día 14 del cultivo *in vitro*. Esto indica que VHL está expresado en varias partes del cerebro y está involucrado en la diferenciación neuronal.

2. Diferenciación neuronal y pVHL

La expresión de pVHL en CMN al parecer es un elemento importante para la diferenciación neuronal. La CMN derivada de la parte del cerebro frontal expresa pVHL predominantemente en el citoplasma de las células en conjunto con la expresión de marcadores neuronales como la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), además, la expresión transgénica de pVHL en CMN obliga la rápida diferenciación hacia neuronas en ensayo *in vitro* (7). Al estudiar las neuronas diferenciadas a partir de CMN transgénicas a pVHL muestran un análisis electrofisiológico de una neurona normal funcional, inclusive estas células son tres veces más altas el promedio de la corriente eléctrica máxima comparada con las células que tuvieron una diferenciación natural en neurona madura, esta diferenciación neuronal que involucra a la pVHL sugiere la posibilidad de una neurona madura funcional *in vitro*. Además, se ha demostrado que más del 50% de las CMN transgénicas a pVHL y trasplantadas dentro del cerebro de modelos de ratas con enfermedad de Parkinson no solamente logran a diferenciarse en células neuronales si no también en células productoras de dopamina positivas a la tirosina hidroxilasa (TH) y los ensayos de comportamiento de los ratones muestran una reducción marcada en el recambio inducido por apomorfina en el análisis de comportamiento, además del 30% de la ratas modelo no muestran rotación inducida (8) (**Figura 1A**). Este hallazgo indica que las CMN que sobre producen la pVHL funcionan como neuronas productoras de dopamina en el cerebro de ratas trasplantadas. Por lo tanto, la terapia de trasplantación neural para enfermedades neurológicas, tal como enfermedad de Parkinson, usando CMN como donadoras es de gran importancia, y la sobre producción de la pVHL potencialmente contribuye al mejoramiento de la enfermedad.

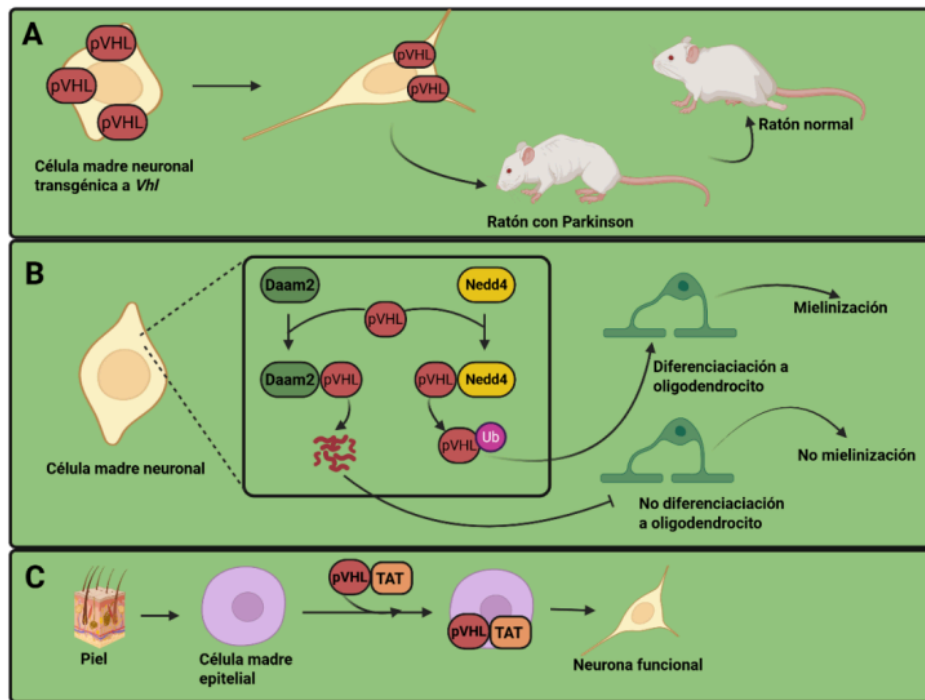


Figura 1. VHL en la diferenciación neuronal. (A) Célula madre neuronal transfectada con el gen *Vhl* produce la proteína VHL (pVHL). Esta célula transgénica al gen *Vhlh* insertada en el cerebro de un ratón con enfermedad de Parkinson produce un efecto benéfico con características de un ratón normal. (B) En la célula madre neuronal la pVHL tiene dos funciones, una es que se une con la proteína Daam2 y esta provoca la degradación de pVHL, por lo tanto, esta célula madre neuronal no se diferencia a oligodendrocito; la otra función, la pVHL puede interaccionar con la proteína Nedd4 (complejo E3 ubiquitina ligasa Nedd4) la cual ubiquitina a la pVHL y de esta forma mantiene su actividad para estabilizarlo y la célula madre neuronal se diferencia en oligodendrocito. El nivel de Daam2 y Nedd4 en la célula madre neuronal es la regulación para la diferenciación celular. (C) A partir de la piel se puede obtener una célula madre epitelial, si esta célula es tratada con la proteína VHL (pVHL) funcionada con el péptido de penetración celular TAT; la célula madre epitelial con la pVHL-TAT se diferencia a una neurona funcional que al ser introducida en el cerebro de un ratón se integra y tiene funcionalidad.

Se ha reportado que la proteína “scaffold Dishevelled associated activator of morphogenesis 2” (Daam2) es un inhibidor del proceso de diferenciación celular hacia las células de oligodendrocitos. Los oligodendrocitos tienen la función de llevar a cabo la mielinización de las neuronas. La actividad de la pVHL en la CMN está regulada de forma

negativa por la proteína Daam2 y de forma positiva por la proteína “neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4” (Nedd4). Se ha comprobado que la Daam2 se une a pVHL y lo degrada, en cambio Nedd4 llega a ubiquitinar a la pVHL pero no se degrada. La función de este sistema de regulación de la pVHL por Nedd4 permite la diferenciación específica a células de oligodendrocitos, ya que Daam2 regula negativamente la diferenciación del oligodendrocito. En modelos de desmielinización en ratón y en pacientes con esclerosis múltiple han demostrado el papel de la ruta Nedd4-VHL en el proceso de recuperación de la mielinización; en particular, Nedd4 es requerido para la diferenciación y mielinización del oligodendrocito. Por otro lado, la relación Daam2-VHL está más asociado con el glioma, ya que Daam2 inactiva a la pVHL (**Figura 1B**) (9).

Otro evento donde participa la pVHL en la diferenciación neuronal es en la formación de células de astrocitos. Como se mencionó arriba, la CMN estimulada por FC-IL-6 y BMP induce su diferenciación a células de astrocitos y la ruta que conduce este proceso es por JAK/STAT. La pVHL, en forma de E3 ubiquitina ligasa con culina2, elongina BC y Rbx1, reconoce a la proteína JAK2 como sustrato para la ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma, el cual la degradación de JAK2 en la CMN provoca la inhibición de la diferenciación de CMN hacia el astrocito.

Para el caso de la formación de células de tipo glía a partir de CMN, se ha demostrado que el nivel de oxígeno es un elemento importante en la diferenciación celular ya que la diferenciación de CMN en condiciones de hipoxia provoca una disminución en el porcentaje de células positivas para el marcador neuronal MAP y un aumento en el porcentaje de células positivas para el marcador astrogliá GFAP, esto indica que la hipoxia puede ser una condición para la diferenciación de CMN en células de tipo glía. En condiciones de hipoxia la pVHL no tiene efecto de degradación a HIF-1alfa y es posible que esta proteína está involucrada en la formación de células glía, en un reporte se demostró que la supresión de la actividad de HIF-1alfa está relacionada con la diferenciación a células de tipo glía (10). Esto establece que la no actividad de la pVHL debido a hipoxia provoca inhibición de la diferenciación neuronal y se prende la diferenciación a la glía, por lo tanto, HIF está involucrado en la diferenciación de CMN hacia células de la glía. Este hallazgo es importante porque esto indica que los tumores del parénquima del sistema nervioso central, tales como los gliomas, pueden generarse desde CMN, y este mecanismo está asociado con el eje VHL-HIF (11).

Recientemente, una atención importante ha sido tomada en cuenta sobre el papel de HIF-1alfa en CMN durante la regeneración del nervio después de un daño cerebral traumático o derrame cerebral. CMN endógenas y células progenitoras neurales son promotoras de la reparación después de un daño o golpe cerebral (12). En el caso de una

isquemia cerebral focal se estimula la proliferación y migración de células progenitoras derivadas de la zona subventricular (SVZ) dentro de la lesión, estas nuevas células progenitoras expresan gran cantidad de HIF-1alfa para mantener un nicho vascular y promover la angiogénesis a través de la inducción de la producción de VEGF, así como también se ha visto que HIF-1alfa está involucrado en la pluripotencialidad y diferenciación de las células progenitoras neurales (12).

Por otro lado, el papel del oxígeno en el desarrollo de CMN es importante, y en muchas regiones del cerebro, los niveles de oxígeno afectan a CMN y la tensión de oxígeno es crítica para el desarrollo del cerebro saludable, ambos un elevado o reducido nivel de oxígeno está vinculado a la alteración del desarrollo neuronal. Por lo tanto, la ruta de HIF-1alfa es sin duda el mecanismo primario adaptativo usado por las células para responder a los cambios del nivel de oxígeno. Por ejemplo, se ha demostrado que el oxígeno controla el inicio de la diferenciación de CMN en una manera por la regulación de la polaridad celular. La ruta de HIF-1alfa controla el inicio de la polarización neuronal ya que activa el represor transcripcional Zeb1, el cual reprime la expresión de los genes de polaridad Pard3 y Pard6a con la finalidad de modular los niveles de integrinas que se unen a la matriz extracelular, lo cual provoca la migración celular (13).

2.1. Diferenciación neuronal a partir de otras estirpes celulares

La piel humana es una fuente atractiva de células madre pluripotenciales somática y a partir de la piel se pueden obtener dos tipos de células madre, una corresponde a las células madre del folículo piloso y la otra a las células madre papilar dermal del folículo. Con respecto a la capa de la epidermis humana de la piel, una población de células específicas produce nestina y estas células residen en el folículo piloso y tienen la capacidad de renovación propia para formar aglomerados tipo esfera. Esta célula productora de nestina tiene el potencial de ser células madre multipotencial que puede diferenciarse a una célula no solamente del linaje epitelial sino también del linaje mesenquimal. Esta célula productora de nestina en la epidermis es referida como una célula madre de cresta neural epidermal y estas células son muy similares a las células madre papilar dermal del folículo piloso, también conocidas como precursoras derivadas de piel (SKPs) (14).

La implantación de células madre folículo piloso positiva a nestina en el cordón espinal promueve la reparación de ésta y también a los nervios periféricos (15). En trabajos previos se demostró que la pVHL puede inducir una diferenciación neuronal desde células progenitoras neuronales de piel (16) y en un nuevo trabajo se reportó que un péptido que funciona como péptido de penetración intracelular (el péptido TAT) el cual

está fusionado a la pVHL (TAT-VHL) provoca en las células precursoras derivado de piel, en las células madre neurales o en las células estromales de medula ósea una diferenciación hacia una célula neuronal (17). El aislamiento de células madre multipotenciales derivadas de la epidermis de humanos ancianos, que tienen las características de formar esferas y de fuerte expresión de nestina, fibronectina y CD34 pero no queratina 15, son identificadas como células del nicho de folículo piloso. Cuando el péptido TAT-VHL es introducido en el citoplasma de estas células se induce la diferenciación de estas células a células neuronales *in vitro* y cuando estas células diferenciadas se implantan dentro de cerebros de ratón se comportan como células neuronales. Esto muestra que la célula madre derivada de la epidermis humano, que son fácilmente accesibles, podrían ser usadas como células donadoras para la terapia celular regenerativa neuronal diferenciando estas células a células neuronales por el simple hecho de la introducción del péptido TAT-VHL en estas células (**Figura 1C**) (18).

Actualmente se tiene detectado que el dominio de la pVHL involucrado en la diferenciación neuronal es el dominio llamado “BC-box”. Como se dijo arriba, también se ha demostrado que la diferenciación neuronal ocurre cuando únicamente el dominio “BC-box” de la pVHL es introducida a la CMN y en otras células madre somáticas como las células madre derivadas de piel, las células de la medula ósea, de adipocitos y células epidermales humana (17). En las proteínas que forman parte de la familia SOCS también se han identificado que tienen el dominio “BC-box” el cual es estructuralmente homólogo a la proteína VHL, y este dominio de las proteínas SOCS también presentan la actividad de inducir la diferenciación neuronal (7).

3. Enfermedades neuronales y pVHL

9 La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo, patológicamente caracterizado por pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas (DA) en la compacta substancia nigra. Mientras la mayoría de los casos son esporádicos, el 5-10% de los casos son familiares y de tipo monogénico. Actualmente se sabe que la pérdida de la proteína DJ-1 (una proteína que protege a las células del estrés oxidativo y la muerte celular y asociada a EP) puede provocar a una forma de inicio temprano de EP. En modelos de animales se ha estudiado que las neuronas DA de ratones deficientes en la proteína DJ-1 tienen una hipersensibilida al estrés oxidativo inducido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, H₂O₂ y 1-metil-4-fenilpiridinina, por otro lado, se ha visto que el nivel de las especies reactivas del oxígeno está aumentado en células de ratones carentes en la proteína DJ-1. Por lo tanto, se concluye que, la proteína DJ-1 es un neuroprotector bajo condiciones oxidativas.

Con respecto al eje VHL-HIF en la EP, al parecer la pVHL tiene una asociación de inducción de la EP y contrario a esto HIF-1alfa tiene un papel de protección. Esto debido a que la pVHL provoca una regulación negativa en HIF-1alfa en la zona compacta de la sustancia nigra de cerebros con EP (19), y de forma contraria, el incremento de HIF-alfa y/o sus genes blancos son de carácter de protección en algunos modelos de EP (20). HIF-1alfa también sobre regula la hidroxilasa de la tirosina para incrementar la liberación de dopamina en células PC12 y en células mesencefálicas ventral de rata (21).

Con esta información, un posible mecanismo de defensa contra la EP puede ser la proteína DJ-1 (Park7), ya que esta proteína puede secuestrar a la pVHL y de esta forma se evita la ubiquitinación de HIF-1alfa y por consiguiente el mantenimiento de esta proteína en la célula (**Figura 2A**). Existe una correlación entre DJ-1 y HIF-1alfa debido a que una deficiencia de DJ-1 provoca niveles más bajos de HIF-1alfa, además, se ha visto que la acumulación de HIF-1alfa rescata a las neuronas deficientes en DJ-1 contra el estrés oxidativo inducido por 1-metil-4-fenilpiridinina. Otro trabajo mostró que las células linfoblásticas extraídas de pacientes con EP y que no expresan DJ-1 muestran una errónea estabilización de HIF-1alfa comparado con las células linfoblásticas de individuos normales, esto indica que la vinculación DJ-1-pVHL puede también ser relevante en el contexto del humano. Estos hallazgos delinean a un modelo por el cual DJ-1 media la sobrevivencia neuronal por la regulación de la ruta VHL-HIF-1alfa (22).

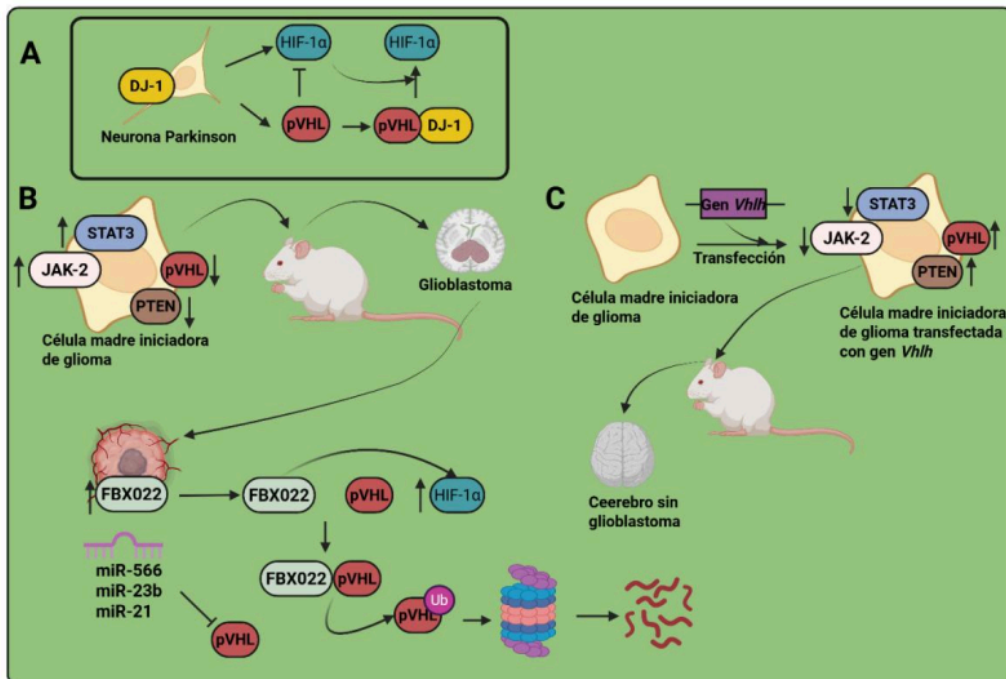


Figura 2. VHL en enfermedades neuronales. (A) En la enfermedad de Parkinson. Las neuronas de origen de Parkinson expresan la proteína DJ-1, estas células también expresan HIF-1alfa y la proteína VHL (pVHL), sin embargo, la pVHL puede ser secuestrada por la proteína DJ-1 para evitar la degradación de HIF-1alfa y mantener el estado de la enfermedad. (B) En el caso del glioblastoma, la célula madre iniciadora de glioma tiene alta expresión de JAK-2 y STAT3 y baja expresión en la pVHL y la proteína PTEN. Esta célula madre precursora de glioma al ser instalada en el cerebro de un ratón sano produce glioblastoma. El tumor del nuevo glioblastoma expresa la proteína FBX022 la cual se une a pVHL para su degradación y por lo tanto se estabiliza HIF-1alfa; por otro lado, el tumor de glioblastoma expresa varios microRNAs (miR) que tiene efecto negativo sobre la función de la pVHL. (C) Cuando una célula madre iniciadora de glioma es transfectada con el gen *Vhlh*, esta célula tiene una expresión baja de JAK-2 y STAT3 y alta expresión de PTEN y pVHL, y cuando esta célula madre iniciadora de glioma transgénica al gen *Vhlh* es introducida en el cerebro de un ratón sano no produce un glioblastoma.

Por otro lado, el oligodendrocito produce y ensambla la mielina sobre los axones de las neuronas del sistema nervioso central, este proceso de mielinización es esencial para transmitir el potencial de acción de membrana y mantener la integridad del axón de la neurona. Cuando existe un daño en la mielina se produce diferentes enfermedades neuronales como la esclerosis múltiple en adulto, así como también la leucomalacia periventricular y la encefalopatía isquémica hipóxica en infantes, estas enfermedades neuronales conducen a un déficit severo en la integridad del axón y función neuronal. Se tiene reportado que la pérdida o disfunción del oligodendrocito provoca una falla en la remielinización y una errónea función neuronal, procesos que son responsables para las consecuencias neurológicas.

Actualmente se tiene visto que la pVHL tiene un efecto en la formación del oligodendrocito, contrario a esto la proteína Daam2 inhibe la formación de esta célula. El mecanismo de Daam2 en la inhibición de la formación del oligodendrocito es por la ruta de señalización Wnt y esta ruta juega un papel crítico en el desarrollo del oligodendrocito y en la reparación de mielina en el sistema nervioso central. Un paso crítico durante la transducción de señal del receptor Wnt es la formación de un agrupamiento proteico complejo del receptor Wnt, este agrupamiento complejo es llamado el sistema de señalosoma de Wnt. La proteína Daam2 tiene la función principal de formar correctamente el señalosoma del receptor Wnt para promover la actividad de la ruta de señalización por el ligando Wnt. La señalización Wnt provoca un paro en el desarrollo del oligodendrocito y como consecuencia una falta de reparación de la mielina, por lo tanto, el efecto de Daam2 es activar la señal Wnt para apagar la función del oligodendrocito y por otro lado degradar la pVHL.

En el oligodendrocito, se ha visto que en esta célula la relación Damm2-pVHL existe y el control de esta relación es por medio de la proteína Nedd4. Nedd4 se une a Daam2 para regular negativamente su actividad durante el desarrollo del oligodendrocito. Nedd4 estabiliza a la pVHL para el desarrollo del oligodendrocito. Un ratón “knock-out” en Nedd4 específico en el oligodendrocito revela importantes actividades en la célula, por ejemplo, atenúa la diferenciación de la célula precursora del oligodendrocito, hay una pérdida de mielinización y no hay reparación de mielina después de un daño neuronal. Esto indica que Nedd4 es un regulador que estabiliza a la pVHL durante el desarrollo del oligodendrocito y es un factor importante en la reparación de mielina. Además, en modelos de desmielinización en ratón y en lesiones de la materia blanca de pacientes con esclerosis múltiple se ha corroborado la función de la ruta Nedd4-pVHL durante la remielinización. Por ejemplo, en condiciones sanas Nedd4 y pVHL son expresado en la célula precursora de oligodendrocito, mientras que Daam2 es expresado en un nivel bajo, además, Nedd4 provoca una ubiquitinación de tipo protección para la pVHL y la pVHL se activa y conlleva a la mielinización por el oligodendrocito. En cambio, en condiciones de daño, la expresión de Nedd4 se pierde y los niveles de Daam2 se incrementa. Esta pérdida de Nedd4 provoca una disminución en la ubiquitinación tipo de protección para la pVHL quedando expuesta para la proteína Daam2 que promueve la degradación de pVHL a través de la vía del sistema ubiquitina-proteasoma (23).

3.1. Gliomas

El glioma es un tumor maligno intracraneal primario que se presenta en los adultos, y dentro de los gliomas, el glioblastoma es el más común con los más altos grados de malignidad y con un pronóstico muy malo. La razón principal para el pronóstico malo es en gran medida por el alto número de anormalidades de los vasos sanguíneos nuevos (angiogénesis) y una fuerte característica de las células cancerosas a ser invasivas. La cirugía combinada con quimioterapia y radioterapia es aún el tratamiento estándar para los pacientes con glioblastoma. Con los últimos tratamientos empleados, la media de sobrevivencia es de 2 años. Por lo tanto, es urgente encontrar blancos terapéuticos nuevos.

El glioblastoma no presenta una remisión completa y es raro poder lograrlo. Comparado desde hace 30 años, el tiempo de sobrevivencia ha sido prolongado solamente por pocos meses. Aunque la quimioterapia, usualmente por la temozolamida oral, puede prolongar la sobrevivencia de pacientes con glioblastoma, éste no afecta a la sobrevivencia del tumor. Bevacizumab, un anticuerpo anti-VEGF, también extiende el tiempo de sobrevivencia por aproximadamente 2 meses, pero no es curativo.

Hasta el momento, la mayoría de los pacientes con glioblastoma mueren dentro de un año de haber iniciado el diagnóstico. La resistencia hacia la terapia del glioblastoma posiblemente resulta desde la presencia de células madre con sello de iniciadoras del

cáncer de glioblastoma. Las células madre iniciadoras de glioblastoma, en teoría no aplica a todos los tipos de cáncer, es considerado un factor importante en el glioblastoma ya que estas células madre o células iniciadoras del cáncer de glioblastoma han sido aisladas y generadas *in vitro* en una línea celular de glioma humano U87.

Con la finalidad de comprobar la existencia de las células madre iniciadoras de cáncer en el glioma, el aislamiento de células madre iniciadoras de glioma implantadas en el ratón SCID llegan a formar un tumor en el tejido subcutáneo, con mucha similitud a aquella de los glioblastomas humanos. Estas células madre iniciadoras de glioma expresan a las proteínas STAT3, JAK2 y Elongina A, pero no expresan a las proteínas PTEN y pVHL, lo cual sugiere que PTEN y pVHL inactivan la ruta de STAT3/JAK2 (**Figura 2B**). Cuando se transfecta el gen *vhl* en la célula madre iniciadora de glioma y estas células recombinantes se trasplantan dentro del ratón SCID, se observa que no genera la formación de un tumor. La capacidad de las células de glioblastoma para formar colonias en agar suave y neuroesferas es significativamente inhibida por la transfección del gen *vhl*, aunque su proliferación es solamente retenida en forma moderada. También se ha visto que la expresión de STAT3, JAK2 y elongina A no está presente en la célula transfectada con el gen *vhl*, contrariamente estas células tienen una sobre expresión de PTEN y de pVHL (**Figura 2C**). Estos hallazgos confirman que la pVHL puede regular la tumorigénesis porque inhibe la ruta de señalización STAT3/JAK2 en la célula madre iniciadora de glioma (24), lo que demuestra que la falta de actividad de la pVHL puede dar inicio al desarrollo del tumor canceroso como son los glioblastomas.

Por otro lado, el factor de transcripción STAT3 tiene una función crítica en la tumorigénesis de la célula madre iniciadora del glioma. La inhibición de la traducción del mRNA de STAT3 resulta en una inhibición de la proliferación celular y renovación de esta célula (25). Estudios indican que la señalización de STAT3/JAK está reprimido por la pVHL activo y por aquellas proteínas que poseen "BC-box". Por otro lado, la expresión sobre regulada de la proteína PTEN inhibe la ruta PI3K/AKT así como también la función de pVHL (26), concertando una red de regulación celular.

Como ya se ha dicho varias veces, las E3 ubiquitina ligasas tienen una función importante en la degradación de proteínas ubiquitinadas. Varios estudios han revelado que la falta de expresión de algunas de las E3 ubiquitina ligasas tiene un gran efecto sobre la tumorigénesis y metástasis del cáncer. Por ejemplo, un reciente reporte demostró que la ubiquitinación de EZH2 por E3 ubiquitina ligasa TRAF6 inhibe la metástasis del cáncer de mama y también inhiben la progresión de cáncer de próstata. La ubiquitinación de HIF-1alfa y SREBF1 por E3 ubiquitina ligasa TRIM21 disminuye la glucólisis celular y el metabolismo de lípidos en las células de cáncer renal (27), por lo tanto, se puede decir que

la actividad de las E3 ubiquitina ligasa tienen una función protectora contra el desarrollo de células cancerosas.

En este sentido la pVHL también está relacionado con el glioma y se ha demostrado una interacción entre la proteína Daam2 y pVHL en cáncer de glioma. Estudios recientes en gliomas identificaron una relación antagonista entre la función de Daam2 y pVHL durante la tumorigénesis (28). Daam2 es un promotor de la formación de glioma y hay una correlación inversa entre la expresión de Daam2 y pVHL en los cánceres humanos incluyendo glioma. Daam2 promueve tumorigénesis por la degradación de pVHL vía ubiquitinación y por la estabilización de HIF (28).

Otro trabajo que apoya la participación de las E3 ubiquitina ligasa, es el caso de la proteína F-box 22 (FBX022), esta proteína es un miembro de una E3 ubiquitina ligasa y es la responsable para el reclutamiento y unión de los miembros de la familia de las proteínas “F-box”, y se ha visto que estas proteínas “F-box” están asociadas en tumores cancerosos porque participan en la iniciación, progresión, recurrencia y metástasis de varios tumores malignos humanos (29). FBX022 regula negativamente la progresión maligna de algunos cánceres mediante la degradación de P21, KLF4, KDM4A y p53 (29). FBX022 también puede prevenir la progresión de cáncer de mama por la directa catálisis de la degradación del HDM2 ubiquitinada. Sin embargo, el efecto protector de FBX022 no funciona contra el cáncer de glioma, en el cual se ha observado que FBX022 favorece la tumoración de este cáncer contrario a lo que ocurre con otros cánceres.

El mecanismo de la regulación de la expresión de la pVHL en glioblastoma no ha sido claro, donde se sabe que la pVHL tiene nula o baja expresión. En un estudio se encontró que la producción de FBX022 tiene una correlación positiva con el grado del glioma y un pronóstico malo en pacientes con glioma. La sobre expresión de FBX022 promueve la proliferación de células de glioma, angiogénesis y migración celular tumoral. Se tiene detectado que el mecanismo de FBX022 es porque esta proteína se une directamente a la pVHL lo cual provoca la ubiquitinación de la pVHL y posterior degradación y todo esto genera la activación de la ruta HIF-1alfa-VEGFA. En los pacientes con glioma se ha detectado una correlación positiva entre la expresión de FBX022, HIF-1alfa y VEGFA. Esto sugiere que FBX022 puede ser un blanco terapéutico prometedor para los pacientes con glioma ya que se ha visto que con silenciar la expresión de FBX022 hay un aumento en la expresión de la pVHL, en el caso contrario, cuando se sobre expresa FBX022 hay una fuerte disminución de la expresión de pVHL. Esto sugiere que FBX022 puede regular la concentración citoplasmática de la pVHL (30). Esta regulación de la concentración de la pVHL por FBX022 es a través de la degradación por el sistema ubiquitina proteasoma (30) y como consecuencia la estabilidad y actividad de HIF-1alfa (**Figura 2B**).

Una restauración de la actividad de la pVHL mediante la sobre expresión de esta proteína en células U87 (células que sobre expresan FBX022) muestra que los niveles de HIF-1alfa, VEGFA, ciclina E2 y ciclina D1 disminuyen, además que estas células presentan una disminución en la proliferación celular y capacidad de migración e invasión, mientras que el caso contrario, una sobre expresión de HIF-1alfa en la célula U373 potencia la expresión de VEGF, la proliferación celular, la migración e invasión. Estos resultados

sugieren que la baja actividad de la pVHL es por FBX022 y esto provoca una proliferación, migración e invasión del glioblastoma dependiente de HIF-1alfa (30). Estos resultados fueron muy semejantes en experimento realizado *in vivo*, al injertar células U373-FBX022 en el cerebro de ratón, confirma la degradación de la pVHL mediado por FBX022 como mecanismo principal para promover el crecimiento del tumor de glioblastoma. En el caso de pacientes se ha observado que la expresión de FBX022, HIF-1alfa y VEGFA en gliomas malignos es mucho más alto que aquellos gliomas poco malignos, mientras que el nivel de expresión de la pVHL en los gliomas malignos es más bajo que aquellos gliomas poco malignos. Por lo tanto, se puede decir que, hay una correlación negativa entre la actividad de FBX022 y la pVHL, mientras que, existe una correlación positiva con HIF-1alfa y VEGF. Estos datos sugieren claramente un vínculo entre el eje FBX022-VHL-HIF-1alfa - VEGFA en la característica clínico-patológica del glioma humano (30).

Los tumores de glioblastoma son muy ricos en vasos sanguíneos debido a que VEGF se encuentra sobre expresado en este tipo de cáncer. Varios blancos angiogénicos han sido considerados con la finalidad de reducir la angiogénesis, por ejemplo, el uso de anticuerpos monoclonales contra VEGF, o el uso de ribozimas, terapia “antisense” de VEGF e inhibidores contra VEGF, y otras estrategias. Otro enfoque es el caso de los microRNAs (miRs), éstos son una clase de RNA cortos no codificantes que controlan la expresión de numerosos genes. Se sabe que los miRs están involucrados en la iniciación y progresión de un tumor (como oncogenes), y pueden funcionar también como supresores de tumor. Algunos miRs tienen funciones importantes en la iniciación y progresión específica de glioblastoma y pueden regular la proliferación, invasión y apoptosis de células de glioblastoma (31). Por ejemplo, la expresión de miR-566 está correlacionado con el pronóstico del glioblastoma (32). En un estudio se demostró que la inhibición de la expresión de miR-566 incrementa los niveles de expresión de la pVHL, decrementa los niveles de expresión de VEGF e inhibe la habilidad invasiva y migratoria del glioblastoma. Entonces miR-566 tiene una función tumorigénica en el glioblastoma y el mecanismo es por la eliminación de la pVHL (**Figura 2B**) (33).

Otro miR involucrado en el desarrollo del glioma es miR-23b. En glioma la expresión de miR-23b es elevado en muestras clínicas de glioma, así como también en células de glioma. Una baja regulación de miR-23b dispara la inhibición del crecimiento, induce apoptosis y suprime la invasión de glioma *in vitro*. Con respecto al eje VHL-HIF, una expresión restablecida de la pVHL inhibe la proliferación e invasión del glioma y por el contrario, la eliminación de miR-23b. Además, la expresión de la pVHL es inversamente correlacionada con miR-23b en muestras clínicas de glioma y es un parámetro predictivo de una falta de sobrevivencia del tumor del paciente. Por lo tanto, se sugiere que la pVHL regula negativamente la expresión de miR-23b para suprimir la sobrevivencia del tumor y la ruta de señal HIF-1alfa/VEGF en el glioma maligno (**Figura 2B**) (34).

Otro miR relacionado con glioblastoma es el miR-21. Varios estudios han demostrado que la expresión de miR-21 está incrementado en tejidos de glioma humano, así como también en otros canceres. El miR-21 tiene como blanco directo a la pVHL y a el “receptor activado-proliferator-peroxisoma alfa” (PPARalfa) eliminando su función en el glioma (**Figura 2B**) (35).

3.2. Hemangioblastoma retinal y pVHL

La hemangioblastoma capilar retinal (HCR) es la lesión típica de la enfermedad de VHL, que en condiciones de hipoxia la angiogénesis es crítica para el desarrollo de este padecimiento. En los ojos de un ratón recién nacido, los vasos hialoides presentes en el vítreo y en la retina se desarrollan para suplementar la sangre a la retina. La vasculatura retinal consiste en 3 plexos paralelos vasculares, que incluye el plexo vascular superficial (SVP) en la capa de la fibra nerviosa, el plexo vascular profundo en la capa plexiforma exterior (OPL) y el plexo vascular intermedio (IVP) en la capa plexiforma interior.

Debido a que la HCR está presente en la enfermedad de VHL, entonces la eliminación de la pVHL en la retina podría producir este padecimiento. Estudios han comprobado que la eliminación de la pVHL en la retina de ratón retarda la regresión de los vasos hialoides e inhibe la angiogénesis retinal, el cual depende sobre la actividad de HIF-1alfa (36) pero no genera HCR. De igual manera, la eliminación de la pVhl en todas las células retinales y en las células endoteliales vasculares (estudiada en un ratón UBC-CreER) también suprime la angiogénesis retinal (37) pero no produce HCR. La eliminación de la pVHL en estos tipos de células retinales específicas, tales como amacrina o interneuronas horizontales, bastones, conos o células de epitelio pigmentario retinal (RPE) (38), también no generan HCR. No obstante, la eliminación de la pVHL en un modelo de hemangioblastoma murino genera algunos de las características del HCR en estado temprano como son vasos tortuosos dilatados, vasos rotos y grupos de células estromales espumosas, sin embargo, la histología muestra que no causa alguna estructura de neovascularización o hemangioblastoma en la retina (39). De esta manera, todavía no se sabe con precisión porque el Vhl-/- en la retina carece de sobre crecimiento vascular y generación de HCR. Una posibilidad es que existan inhibidores que interfieren con la actividad de HIF de forma independiente de la pVHL. En un estudio se demostró que, con el uso de un microarreglo hecho con muestra de hemangioblasto, éste presenta mutaciones de un sólo nucleótido en algunos genes involucrados en el ciclo celular, uno de ellos es el gen “retinoblastoma repressor” (Rb1). Una asociación de la pVHL con Rb1 ha sido demostrado en la inducción de células de carcinoma renal (40), un padecimiento también presente en la enfermedad de VHL. Por lo tanto, es posible que la pVHL y Rb1 están asociados para producir HCR.

El retinoblastoma es el tumor más común intraocular pediátrico. Se sabe que la proteína Rb1 regula el ciclo celular, la muerte celular, y muchos otros procesos celulares en parte por la inhibición del factor de transcripción E2f. La pérdida de Rb1 en la retina causa

retinoblastoma en ratón. En la retina con ausencia de Rb1 provoca que las células neuronales excitatorias (células ganglionares, células bipolares, bastones y conos) sufran apoptosis, mientras que las neuronas inhibitorias (células horizontales y amacrina) y glía Müller sobreviven a este evento. La línea celular amacrina es la célula originaria del retinoblastoma.

Al parecer, el Rb1 puede ser un inhibidor de HIF en aquellos casos donde el pVHL es inactivada su función, ya que Rb1 se puede unir al promotor y reprimir la expresión del gen Bnip3, el cual es un inducido por HIF, además se ha encontrado sitios de unión E2f en el promotor de algunos genes proangiogénicos dependientes de HIF, lo cual aumenta la posibilidad de que Rb1 podría ser el inhibidor desconocido que contrarresta la actividad de HIF en la retina del ratón Vhl-/-.

La eliminación de Rb1 en la retina del ratón Vhl-/- provoca la neovascularización retinal extensivo y la autofagia de la célula fotorreceptora. Estas funciones de Rb1 son vinculadas a una directa unión y represión de los genes blanco de HIF en la retina. Se tiene comprobado que la pérdida de la pVHL suprime el retinoblastoma murina por la inhibición de la división ectópica de las células que originan el retinoblastoma (célula amacrina), esto permite ensayar el efecto de la remoción de ambos Rb1 y Vhl sobre la angiogénesis. La eliminación doble de Rb1/ Vhl específicamente en la retina produce lesiones subretinales que asemejan a una proliferación angiomatosa retinal en un estado tardío humano y la presencia de HCR. La mayoría de las células estromales con lesiones HCR son positivas a los marcadores Sox9 y galectina Lgals3, lo cual indica un origen celular de tipo glía Müller. Este resultado sugiere una nueva función de Rb1 en conjunto con la pVHL para la inducción de angiogénesis retinal y autofagia. La acción inhibitoria de Rb1 sobre los genes inducidos por HIF establece la asociación de Rb y pVHL en la regulación de la neovascularización para la generación del HCR y la relación con la enfermedad de VHL (41).

En este capítulo establece claramente la función de la pVHL en la diferenciación neuronal y en las enfermedades como Parkinson y gliomas. Sobre todo, en el cáncer de glioma es prometedor la función de la pVHL ya que la restauración de la función de esta proteína en los gliomas puede ser una buena alternativa de tratamiento, así como también en las enfermedades causadas por la falta de mielinización. Es importante conducir investigación sobre la pVHL en la neurología para el entendimiento y manejo adecuado de esta proteína en la terapéutica neuronal.

Referencias

1. Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanism. *Cell*. 2001; 104:365–376.
2. Seo S, Lim JW, Yellajoshiyula D, et al. Neurogenin and NeuroD direct transcriptional targets and their regulatory enhancers. *EMBO J*. 2007; 26:5093–5108.
3. Taga T, Fukuda S. Role of IL-6 in the neural stem cell differentiation. *Clin. Rev. Allergy Immunol*. 2005; 28:249–256.
4. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003; 374 Pt 1:1–20.
5. Richards FM, Schofield PN, Fleming S, et al. Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum Mol Genet*. 1996; 5:639–644.
6. Nagashima Y, Miyagi Y, Udagawa K, et al. Von Hippel-Lindau tumour suppressor gene. Localization of expression by in situ hybridization. *J Pathol*. 1996; 180:271–274.
7. Kanno H, Saljooque F, Yamamoto I, et al. Role of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein during neuronal differentiation. *Cancer Res*. 2000; 60:2820–2824.
8. Yamada H, Dezawa M, Shimazu S, et al. Transfer of the von Hippel-Lindau gene to neuronal progenitor cells in treatment for Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003; 54:352–359.
9. Ding X, Jo J, Wang CY, et al. The Daam2-VHL-Nedd4 axis governs developmental and regenerative oligodendrocyte differentiation. *Genes Dev*. 2020; 34:1177–1189.
10. Chen X, Zhou B, Yan T, et al. Peroxynitrite enhances self-renewal, proliferation and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells through activating HIF-1 and Wnt/-catenin signaling pathway. *Free Radic Biol Med*. 2018; 117:158–167.
11. Chen L, Han L, Zhang K, et al. VHL regulates the effects of miR-23b on glioma survival and invasion via suppression of HIF-1/VEGF and -catenin/Tcf-4 signaling. *Neuro Oncol*. 2012; 14:1026–1036.
12. Cunningham LA, Candelario K, Li L. Roles for HIF-1 in neural stem cell function and the regenerative response to stroke. *Behav Brain Res*. 2012; 227:410–417.
13. Kullmann JA, Trivedi N, Howell D, et al. Oxygen Tension and the VHL-Hif1 α Pathway Determine Onset of Neuronal Polarization and Cerebellar Germinal Zone Exit. *Neuron*. 2020; 106:607–623.e5.
14. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 2005; 23:727–737.
15. Amoh Y, Li L, Campillo R, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102:17734–17738.

16. Kanno H, Saljooque F, Yamamoto I, et al. Role of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein during neuronal differentiation. *Cancer Res.* 2000; 60:2820–2824.
17. Kanno H, Nakano S, Kubo A, et al. Neuronal differentiation of neural progenitor cells by intracellular delivery of synthetic oligopeptide derived from von Hippel-Lindau protein. *Protein Pept Lett.* 2009; 16:1291–1296.
18. Kanno H, Kubo A, Yoshizumi T, et al. Isolation of multipotent nestin-expressing stem cells derived from the epidermis of elderly humans and TAT-VHL peptide-mediated neuronal differentiation of these cells. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:9604-9617.
19. Elstner M, Morris CM, Heim K, et al. Expression analysis of dopaminergic neurons in Parkinson's disease and aging links transcriptional dysregulation of energy metabolism to cell death. *Acta Neuropathol.* 2011; 122:75– 86.
20. Genc S, Akhisaroglu M, Kuralay F, et al. Erythropoietin restores glutathione peroxidase activity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in C57BL mice and stimulates murine astroglial glutathione peroxidase production in vitro. *Neurosci Lett.* 2002; 321:73–76.
21. Johansen JL, Sager TN, Lotharius J, et al. HIF prolyl hydroxylase inhibition increases cell viability and potentiates dopamine release in dopaminergic cells. *J Neurochem.* 2010; 115:209–219.
22. Parsanejad M, Zhang Y, Qu D, et al. Regulation of the VHL/HIF-1 pathway by DJ-1. *J Neurosci.* 2014; 34:8043-8050.
23. Ding X, Jo J, Wang CY, et al. The Daam2-VHL-Nedd4 axis governs developmental and regenerative oligodendrocyte differentiation. *Genes Dev.* 2020; 34:1177-1189.
24. Kanno H, Sato H, Yokoyama TA, et al. The VHL tumor suppressor protein regulates tumorigenicity of U87-derived glioma stem-like cells by inhibiting the JAK/STAT signaling pathway. *Int J Oncol.* 2013; 42:881-886.
25. Toda H, Ito M, Kato T et al. The modulation of microRNAs by type I IFN through the activation of signal transducers and activators of transcription 3 in human glioma. *Mol Cancer Res.* 2009; 7:2022-2030.
26. Frew IJ, Thoma CR, Georgiev S, et al. pVHL and PTEN tumour suppressor proteins cooperatively suppress kidney cyst formation. *EMBO J.* 2008; 27:1747-1757.
27. Chen X, Yong H, Chen M, et al. TRIM21 attenuates renal carcinoma lipogenesis and malignancy by regulating SREBF1 protein stability. *J Exp Clin Cancer Res.* 2023; 42:34.
28. Zhu W, Krishna S, Garcia C, et al. Daam2 driven degradation of VHL promotes gliomagenesis. *Elife.* 2017; 6:1–22.
29. Cheng J, Lin M, Chu M, et al. Emerging role of FBXO22 in carcinogenesis. *Cell Death Discov.* 2020; 6:66.

30. Shen Z, Dong T, Yong H, et al. FBXO22 promotes glioblastoma malignant progression by mediating VHL ubiquitination and degradation. *Cell Death Discov.* 2024; 10:151.
31. Chen L, Li H, Han L, et al. Expression and function of miR-27b in human glioma. *Oncol Rep.* 2011; 26:1617-1621.
32. Zhang KL, Zhou X, Han L, et al. MicroRNA-566 activates EGFR signaling and its inhibition sensitizes glioblastoma cells to nimotuzumab. *Mol Cancer.* 2014; 13:63.
33. Xiao B, Zhou X, Ye M, et al. MicroRNA-566 modulates vascular endothelial growth factor by targeting Von Hippel-Landau in human glioblastoma in vitro and in vivo. *Mol Med Rep.* 2016; 13:379-385.
34. Lingchao C, Lei H, Kailiang Z, et al. VHL regulates the effects of miR-23b on glioma survival and invasion via suppression of HIF-1 α /VEGF and β -catenin/Tcf-4 signaling. *Neuro Oncol.* 2012; 14:1026-1036.
35. Kai-liang Z, Lei H, Lu-yue C, et al. Blockage of a miR-21/EGFR regulatory feedback loop augments anti-EGFR therapy in glioblastomas. *Cancer Lett.* 2014; 342:139-149.
36. Kurihara T, Kubota Y, Ozawa Y, et al. von Hippel-Lindau protein regulates transition from the fetal to the adult circulatory system in retina. *Development.* 2010; 137:1563–1571.
37. Arreola A, Payne LB, Julian MH, et al. Von Hippel-Lindau mutations disrupt vascular patterning and maturation via Notch. *JCI Insight.* 2018; 3:92193.
38. Lange CA, Luhmann UF, Mowat FM, et al. Von Hippel-Lindau protein in the RPE is essential for normal ocular growth and vascular development. *Development.* 2012; 139:2340–2350.
39. Wang H, Shepard MJ, Zhang C, et al. Deletion of the von Hippel-Lindau gene in hemangioblasts causes hemangioblastoma-like lesions in murine retina. *Cancer Res.* 2018; 78:1266–1274.
40. Harlander S, Schönenberger D, Toussaint NC, et al. Combined mutation in Vhl, Trp53 and Rb1 causes clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nat Med.* 2017; 23:869–877.
41. Wei R, Ren X, Kong H, et al. Rb1/Rbl1/Vhl loss induces mouse subretinal angiomatous proliferation and hemangioblastoma. *JCI Insight.* 2019; 4:e127889.

Capítulo X

VHL e inmunología

1. El sistema inmune y E3 ubiquitina ligasa VHL

Las células del sistema inmunológico provienen desde las células madre hematopoyéticas de la médula ósea; estas células madre se diferencian en dos grandes grupos las células mieloides y células linfoides. Las células mieloides son las progenitoras para la diferenciación celular a macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastocitos y eritrocitos, en cambio las células linfoides son las progenitoras de los linfocitos T y B, así como también de células “natural killer” y células linfoides innatas. Las células inmunes diferenciadas reciben estímulos del ambiente para despertarse o activarse y producir moléculas efectoras. En el caso de los linfocitos T existen una gran variedad de ellas y después de madurar en el timo se originan dos poblaciones, una correspondiente a linfocitos T CD4 (T “helper”) y la otra a linfocitos T CD8 (T citotóxicas). Las células T CD4 también llamadas “helper” (Th) se pueden subclasificar en linfocitos Th1, Th2, Th17 y linfocito T regulador (Treg), el último tiene la función de regular la actividad de las células Th. Ahora bien, existe el concepto de plasticidad entre los linfocitos y esto significa que un linfocito Th se pueda convertir en una célula Treg y esto depende del ambiente de citocinas que los rodea.

Por otro lado, el sistema inmunológico se activa ante la presencia de un agente invasor (antígeno) y responde a nivel de células inmunes y moléculas bloqueadoras como son los anticuerpos. Este proceso inmunológico está regulado con la finalidad de evitar una sobre respuesta que puede llegar a alterar tejidos u órganos. La respuesta inmune se inicia según el ambiente y el reconocimiento de una molécula del agente invasor es entonces que las células del sistema inmune se activan y se comunican mediante interleucinas (citocinas) entre las diferentes células inmunes. En el interior de estas células se lleva a cabo numerosas vías de señalización celular que repercute en la liberación de otras citocinas. Las vías de señalización celular, por lo regular, empiezan desde un receptor de señal, el cual se adapta a una cascada o vía de activación de proteínas que terminan en el núcleo celular para inducir la expresión de genes de respuesta (transducción de señal). Para lograr la

selectividad de cada vía, la modificación post-traducciona de las proteínas juega un papel importante en la regulación de la función de las proteínas claves durante estas cascadas de transducción de señal.

Una de estas modificaciones post-traduccionales es la ubiquitinación de proteínas, la cual tiene una función importante en los diversos tipos de respuestas celulares, como el ciclo celular, la ruta de transducción de señal, regulación transcripcional, reparación de DNA, apoptosis, entre otros. En las células del sistema inmune, la modificación por ubiquitina ha sido implicado en ambas respuestas inmune como la innata y la adaptativa (1). En particular, la E3 ubiquitina ligasa VHL participa en la regulación del desarrollo, diferenciación y activación de varios linfocitos. En este capítulo se enfocará sobre la participación de la E3 ubiquitina ligasa VHL en el mecanismo molecular y celular del control de la homeostasis inmune y cómo la pérdida de la pVHL puede causar una desregulación inmune bajo condiciones patológicas.

2. Función de la pVHL en las células T

La hipoxia se presenta comúnmente en varios órganos o tejidos en condiciones normales o en un estado patológico. Fisiológicamente, se ha reportado que el único tejido que tiene un nivel de oxígeno aproximadamente de 21% es aquel que está expuesto al aire atmosférico, en este caso son las vías aéreas superiores, los otros tejidos que no están expuestos de forma directa con el oxígeno ambiental, tienen un nivel de oxígeno reducido. La mayoría de los tejidos experimentan grados de hipoxia en un cierto nivel, por ejemplo, el nivel de oxígeno en sangre arterial es alrededor del 14%, y este se reduce a 5-6% en el espacio intersticial de los tejidos. En los tejidos linfoides como el bazo el oxígeno oscila entre 3-4% pero el nivel de oxígeno es más bajo en el centro germinal. En el tracto gastrointestinal, que contiene el 70-80% del total de linfocitos en nuestro cuerpo, el rango de tensión de oxígeno en la mayor parte del tejido es hipóxico con un nivel de oxígeno del 7%. Ahora bien, en condiciones patológicas la hipoxia se eleva, por ejemplo, en el microambiente de un tumor sólido hay solamente un 1% de oxígeno. Una hipoxia severa puede ser encontrado también en los sitios de inflamación, debido al edema, la vasculitis, la vasoconstricción (entrega de oxígeno limitante) y en el reclutamiento de células polimorfonucleares, ya que estas consumen altas cantidades de oxígeno. Por lo tanto, esto indica que las células inmunes están en constante evento de hipoxia y entonces la ruta de VHL-HIF es un elemento primordial para la adaptación de las células inmunes a los cambios del nivel de oxígeno.

Durante el desarrollo de las células T, las células progenitoras hematopoyéticas migran desde la médula ósea hacia el timo donde llegan como timocitos y después estas células se diferencian en células Th CD4⁺ y en células T citotóxicas CD8⁺. En este órgano primario linfoide también es sabido que existe condiciones de hipoxia (2), en este sentido el eje VHL-HIF tiene una función importante. Con la finalidad de estudiar la función de este eje, un ratón knock-out en la pVHL específica en los timocitos fue creado. El resultado mostró que la pérdida de la pVHL en los timocitos tiene un impacto fuerte sobre el desarrollo de ellos, los timocitos no llegan a fase final de su desarrollo debido a que se induce la muerte celular a través de una actividad incrementada en la apoptosis (**Figura 1A**) (3), esto indica que la participación de la pVHL durante la diferenciación de las células T es elemental. También se ha observado que, el calcio ²⁺ (Ca²⁺) es importante para la estimulación del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) en el timocito, la eliminación de la pVHL en el timocito produce la estabilidad y actividad de HIF-1alfa lo cual provoca una negativa respuesta del TCR vía Ca²⁺ evitando así su estimulación durante el desarrollo del timocito (4).

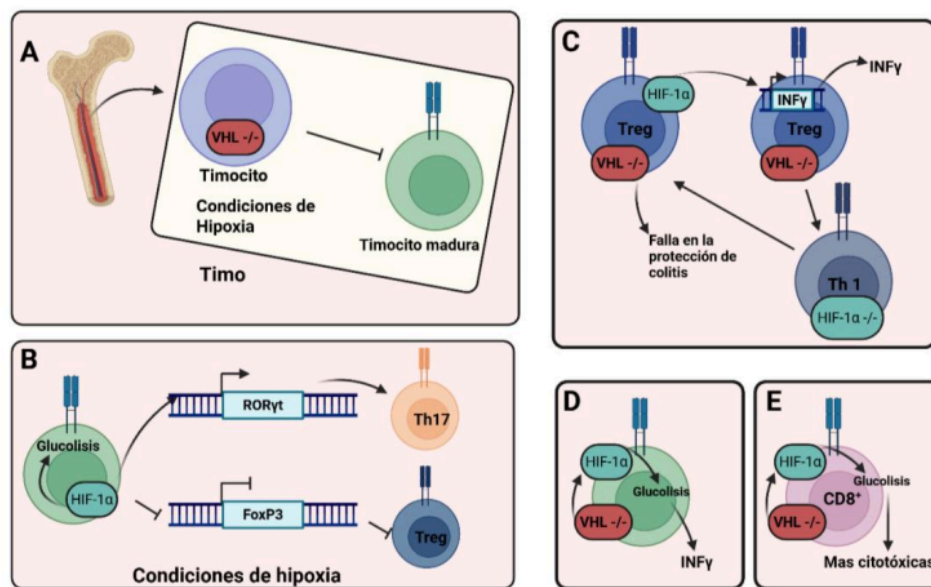


Figura 1. La pVHL en la diferenciación de células T. (A) Las células T precursoras presentes en la médula ósea viajan al órgano del timo, en este órgano las condiciones son hipóxicas. Los timocitos en el timo se diferencian a células T maduros (timocitos maduros), sin embargo, los timocitos carentes de la proteína VHL

no logran diferenciarse a timocitos maduros. **(B)** En otros órganos diferentes del timo, también existe condiciones de hipoxia y los linfocitos T expresan HIF-1alfa para adaptarse a estas condiciones; HIF-1alfa activa la ruta de la glucólisis como una ruta metabólica principal involucrada en la expresión del factor de transcripción RORgammat y la diferenciación de la célula T en Th17. HIF-1alfa inhibe la expresión del factor de transcripción FoxP3 para la diferenciación en células T reguladoras (Treg). **(C)** Las células T reguladoras sin la función de pVHL se transforman en una subpoblación de células Treg productoras de interferón gamma (IFNgamma), la pérdida de pVHL induce la estabilidad de HIF-1alfa y este factor se une al promotor de IFNgamma para la producción de esta citocina. Las células Treg con eliminación de pVHL se comportan como células Th1 inflamatorias ya que la introducción de estas células en el intestino de un ratón produce colitis (en vez de proteger de la colitis), sin embargo, la eliminación de HIF-1alfa en estas células regresan su fenotipo de células Treg. **(D)** En las células T productoras de IFNgamma con carencia en la proteína VHL tienen una alta actividad de HIF-1alfa y la ruta de la glucólisis, esta condición es un factor importante para la producción de esta citocina, ya que el bloqueo de la glucólisis se reduce drásticamente la producción de IFNgamma. **(E)** En las células T citotóxicas (CD8⁺) la eliminación de la proteína VHL tiene un efecto positivo en su función, son más citotóxicas, y este efecto es mediante la estabilidad de HIF-1alfa y la vía de la glucólisis.

Por otro lado, las células T nativas o vírgenes (Th0) reciben varias señales para definir el rumbo de su diferenciación, por lo regular tres señales son importantes para las células T nativas, una de ellas es a través del TCR (señal 1), la otra es la señal del receptor co-estimulación CD28 (señal 2) y por último el efecto de las citocinas (señal 3). Este conjunto de señales que llegan a la célula T nativa provoca la activación y diferenciación en distintos sub-lineajes de células T que incluye a la célula Th1 productora de interferón gamma (IFN-gamma), la célula Th17 productora de interleucina (IL) 17 (IL-17), la célula T regulatoria (Treg) FoxP3 positiva inmunosupresiva, así como también de otros sub-lineajes definidos recientemente.

Las señales antes indicadas no son los únicos eventos importantes para la diferenciación celular, sino también el metabolismo celular es otro elemento relevante para orquestar la diferenciación y activación de las células T, ya que estos procesos requieren de una alta demanda bioenergética y biosintética, por ejemplo, en los procesos metabólicos participan las rutas de la glucólisis, la oxidación de ácidos grasos/piruvato por la vía del ciclo de Krebs, las rutas de la pentosa-fosfato y glutamina. En este sentido, la glucólisis es orquestada por HIF-1alfa en la célula T en condiciones de hipoxia y esta ruta es un punto clave metabólico para la diferenciación de células Th17 o inducción de células Treg.

2.1. Células Th17

Afuera del timo, en los tejidos periféricos en condición de hipoxia el proceso de diferenciación de la célula T es afectada en estas condiciones. Recientes estudios han demostrado que la presencia de HIF-1alfa es un factor clave para la diferenciación de células Th17 y células Treg en las condiciones de hipoxia (5-6). La actividad de HIF-1alfa

en condiciones de hipoxia provoca la expresión del gen del factor de transcripción RORgamat, este factor de transcripción es el elemento maestro para que las células T nativas se diferencien en células Th17, sin embargo, la actividad de HIF-1alfa suprime la expresión del factor de transcripción Foxp3, el cual es clave para la generación de células Treg (5). Esto indica que en un órgano en condiciones de hipoxia y en un proceso de respuesta inmune, la pVHL es no producida y por lo tanto no puede degradar a HIF-1alfa y como consecuencia el HIF-1alfa se activa para inducir la diferenciación de células Th17 (**Figura 1B**).

Por otro lado, la diferenciación y activación de la célula T es un proceso con alta demanda energética y en aquellos casos donde la célula T está en condiciones de hipoxia, el aporte de energía es principalmente por la ruta glucolítica. La actividad de HIF-1alfa mantiene la ruta glucolítica en condición de hipoxia; entonces si se inhibe la ruta glucolítica activada por HIF-1alfa en condición de hipoxia se pierde el balance de la polarización de las células Th17 / Treg (6), lo cual sugiere que la ruta glucolítica dependiente de HIF-1alfa regula la diferenciación de la célula Th17 (**Figura 1B**). La polarización de la célula Th17 por HIF-1alfa, al parecer no está bien definida, debido a que otros grupos de investigación han reportado que la actividad de HIF-1alfa puede promover la expresión de Foxp3 para la diferenciación de Treg (7), esta controversia introduce una falta de claridad sobre el eje VHL/HIF en la regulación del desarrollo y/o función de las Treg.

2.2. Células Treg

Con la finalidad de profundizar sobre la función de la pVHL en las células Treg, un ratón knock-out condicionado para el gen *vhlh* y específico para las células Treg reveló que la actividad de la pVHL es esencial para la estabilidad y función de las células Treg (8). El ratón que no produce la pVHL en las células Treg desarrolla una inflamación masiva con una excesiva producción de IFN-gamma por las células Treg. Las células Treg carentes de pVHL no pueden prevenir la inducción de colitis en el ratón, y en vez de esto existe una inflamación intestinal donde las células Treg son las que producen el IFN-gamma, muy similar a la función de un linfocito Th1. En estos ratones se observa que las células Treg deficientes en pVHL, el HIF-1alfa se encuentra estable y activo, y que el HIF-1alfa se une a la región promotora del gen de INF-gamma para inducir la producción de esta citocina, lo cual promueve la diferenciación de Treg a células Th1 que participan en la inflamación. La inducción de IFN-gamma por la ruta VHL/HIF en las células Treg es también dependiente del metabolismo glucolítico. En un ratón con doble knock-out en pVHL y HIF-1alfa en las células Treg se observó una baja producción de INF-gamma y una recuperación de la función reguladora de las células Treg (**Figura 1C**) (8). Esto sugiere que la falta de función de la pVHL en las Treg convierte estas células a células Th1 productores de INF-gamma por medio de HIF-1alfa, lo cual se conoce como un proceso de plasticidad. Estos hallazgos

sugieren que la ruta HIF/VHL es responsable para la expresión de INF-gamma en las células Th1 a partir de células Treg con deficiencia en la función de la pVHL.

2.3. Células T productoras de IFNgamma

En la hipoxia, la glucolisis anaeróbica está regulado por HIF-1alfa y este evento metabólico es esencial para la inducción de células T productoras de IFN-gamma. Se ha demostrado que la eliminación de HIF-1alfa en células T de ratón, o inhibición de la glucolisis con la molécula 2-desoxi-D-glucosa (2-DG) marcadamente reduce la producción de IFN-gamma en células T expuestas en condiciones de hipoxia. En forma contraria, la eliminación de la pVHL en las células T de ratón provoca la estabilización de HIF-1alfa en células T o el tratamiento de las células T con inhibidores de las prolil-hidroxilasas (PHDs) provoca un incremento en la producción de IFN-gamma en condiciones de hipoxia (**Figura 1D**). La baja producción de IFN-gamma observada en las células T con fenotipo HIF-1alfa -/- es debido por la muerte celular inducida por una activación de la célula de forma errónea. Esta muerte celular de las células T HIF-1alfa -/- es principalmente por la caída metabólica y es atribuido a una disminución intracelular de la poza de acetil-CoA, ya que la suplementación de acetato para restablecer el nivel de acetil-CoA en las células T HIF-1alfa -/- en condiciones de hipoxia se detiene la muerte celular inducida por activación y también hay un restablecimiento en la producción de INF-gamma. Estos resultados sugieren que la ruta de la glucolisis controlada por HIF-1alfa en la célula T es un regulador principal de la inducción de INF-gamma en las células T hipóxicas (**Figura 1D**) (9).

2.4. Células T CD8

En las células T CD8 citotóxicas se tiene demostrado que la ruta VHL-HIF es importante en el desarrollo de estas células. Una de las funciones de las células T CD8 es la eliminación de células infectadas con un virus. En un experimento donde se eliminó la pVHL en la célula T de ratón se observó que la patología letal de la infección con el virus de la coriomeningitis linfocítica disminuyo considerablemente (10), esto es por el hecho de que la pérdida de la función de la pVHL provoca una alta actividad de HIF-1alfa y HIF-2alfa. La alta actividad de los HIFs en los linfocitos T CD8 citotóxicos potencializa la función citotóxica de la célula T CD8 debido a que ambos HIFs promueve la expresión de factores de transcripción claves, así como también de moléculas efectoras (gramcinas y perforinas) y co-estimuladoras/inhibitorias. Con base a esto se puede decir que la pVHL en las células T CD8 tiene un efecto de regulación negativa de la función de estas células (**Figura 1E**).

Por otro lado, también se ha reportado que las células T CD8 citotóxicas deficientes en la pVHL son más potentes y efectivas en la citotoxicidad para las células tumorales. También se ha observado que en las células T CD8 de memoria, la eliminación de la pVHL

no afecta la diferenciación de las células T CD8 de memoria de larga vida y al parecer esto está relacionado con el sostenimiento del metabolismo glucolítico (11). Esto indica que el control metabólico por el eje VHL/HIF es crítico para generar células T CD8 de memoria con características de protección contra una infección. En general se puede decir que la pVHL tiene un efecto negativo en la diferenciación a células T CD8 y que HIF-1alfa tiene el efecto contrario ya que promueve por la vía glucolítica el proceso de diferenciación de las células T CD8 en condiciones de hipoxia.

3. El “factor inhibiting HIF” (FIH) en las células T

Las células T se deben adaptarse a las variaciones del microambiente que se presentan en un tejido, una de ellas es la disponibilidad de oxígeno. Como es sabido, HIF está regulado por dos mecanismos que involucra a las hidroxilasas dependientes de oxígeno, una de ellas son las prolil hidroxilasas (PHDs) que marca a HIF para su degradación dependiente de la pVHL, por otro lado, la asparagil hidroxilasa conocida como el “factor inhibiting HIF” (FIH) que hidroxila el residuo de asparagina de HIF para inhibir la actividad transcripcional de éste. Para determinar el papel de FIH en las células T, se desarrolló un ratón knock-out en FIH específico en la célula T y se encontró que FIH regula el destino y función de la célula T en una manera dependiente de HIF a la concentración de oxígeno fisiológica. El efecto que tiene la pérdida de FIH en las células T es que potencializa a la citotoxicidad de la célula T y se aumenta la expansión de células T *in vivo*. En los ratones sin FIH se observó una mejoría en la inmunoterapia anti-tumor, esto es atractivo ya que podría ser usado como una estrategia prometedora para la inmunoterapia del cáncer (12). En conclusión, FIH inhibe a HIF y esto provoca una regulación negativa en la actividad de las células T.

4. Función de la pVHL en las células B

La médula ósea es conocida como el sitio donde el contenido de oxígeno es limitado (13) y a pesar de esto, es probable que la hipoxia puede regular el desarrollo de las células B. Con esta hipótesis, la eliminación de HIF-1alfa en las células de la medula ósea provoca un desarrollo erróneo de las células B, donde la proliferación de estas células es el principal defecto observado. Por otro lado, en la autoinmunidad las células B tienen la función de regular las células T autoinmunes por medio de la producción de IL-10 (14); la eliminación de HIF-1alfa en la célula B provoca un aumento de la población de células B tipo 1 con características de no producción de IL-10, lo cual causa autoinmunidad por las células T (15). El ratón con eliminación de HIF-1alfa es más susceptible a enfermedades autoinmunes tales como artritis y encefalomiелitis autoinmune experimental comparado con el ratón que posee a HIF-1alfa (16). Las células B knock-out en HIF-1alfa aumenta la

diferenciación de las células Th1 y Th17 y esto es por carencia de producción de IL-10 (17). Estos hallazgos soportan que la regulación de la hipoxia y la actividad de HIF-1alfa en estas condiciones es crítica para la función de la célula B y en la prevención de la autoinmunidad (**Figura 2A**).

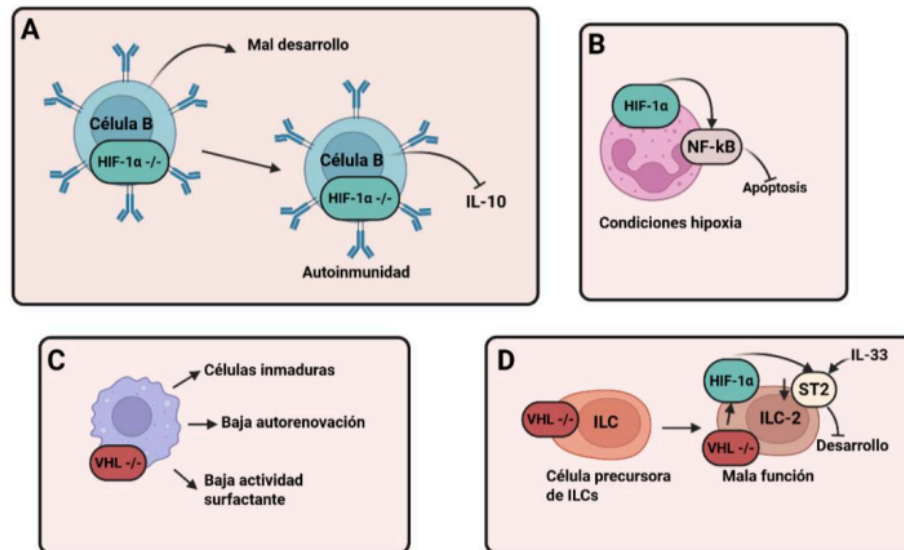


Figura 2. Función de la pVHL y HIF en otras células inmunológicas. (A) En las células B la eliminación de HIF-1alfa provoca un mal desarrollo de las células B y se incrementa la apoptosis. En el caso de la autoinmunidad, las células B con eliminación de HIF-1alfa no producen IL-10 y no llevan a cabo su función de protección. (B) En el macrófago de pulmón, la eliminación de la proteína VHL provoca macrófagos inmaduros, una baja capacidad de autorenovación y baja actividad surfactante. (C) En el neutrófilo en condiciones de hipoxia el HIF-1alfa activa la ruta de señalización del NF-κB para encender el proceso de apoptosis. (D) La carencia de la proteína VHL en las células precursoras de ILCs provoca defectos en las ILCs del grupo 2 que consiste en la estabilidad de HIF-1alfa que provoca una baja expresión del receptor de IL-33 (la proteína ST2) y como consecuencia genera un mal desarrollo y función de estas células.

El eje VHL-HIF también ha sido estudiado en la producción de anticuerpos en las células B, interesantemente se observó que la hipoxia en el centro germinal regula la producción de anticuerpos por las células B. En este sentido, la actividad de HIF-1alfa provoca una limitada proliferación y sobrevivencia de esta célula y HIF-1alfa participa en el cambio del isotipo de los anticuerpos (18). La baja tensión de oxígeno o la eliminación de la pVHL específicamente en las células B detiene la actividad del complejo mTORC1, lo

cual provoca una inhibición de la activación de la célula B, contrario a esto se observó que la eliminación de HIF-1alfa restablece la activación de la célula B. Esto indica que la ruta VHL/HIF juega un papel importante en la producción de anticuerpos en el centro germinal (19). Estos hallazgos sugieren que la ruta VHL/HIF es un sensor del oxígeno esencial para regular la inmunidad humoral en el tejido linfoide.

5. Función de la pVHL en las células mieloides

El eje VHL-HIF también tiene un impacto sobre la inmunidad innata (20) donde participan las células de origen mieloide. La condición de hipoxia provoca la acumulación de HIF-alfa en las células supresoras de origen mieloide y puede promover la función supresora por la sobre expresión de las proteínas arginase-1 e iNOS, y esta expresión es dependiente de HIF-1alfa (21). Otro estudio demostró que la concentración baja de oxígeno apaga la apoptosis en el neutrófilo a través de la señalización dependiente de HIF-1alfa que activa a la ruta NF-kB (22) (**Figura 2B**). Este hallazgo soporta que la ruta VHL/HIF juega un papel importante en el desarrollo y función de las células mieloides.

Un estudio reciente donde se utilizó ratones knock-out en la pVHL en las células tipo macrófagos, se observó que los macrófagos alveolares (MAs) con carencia en la pVHL mostraron un fenotipo inmaduro, con una reducida capacidad de auto-renovación, y un decremento de la actividad de surfactante del AMs en el pulmón (**Figura 2C**). De esta manera la pVHL es requerido para la maduración de los AMs y la función tensoactiva del pulmón (22).

6. La pVHL en las células linfoides innatas

Las células linfoides innatas (ILCs) son un subgrupo de linfocitos, recientemente definido, que reside en el tejido periférico y son particularmente abundantes en la superficie de los órganos con función de barrera. Las ILCs son funcionalmente divididos en tres subtipos: el grupo 1 de ILCs incluyen a las células “natural killer” y las ILC1s productoras de IFN-gamma que depende del factor de transcripción T-bet para su desarrollo; el grupo 2 de ILCs son aquellas que producen citocinas inflamatorias del tipo 2 y requieren de los factores de transcripción GATA3 y RORgammat; y el grupo 3 de ILCs son aquellas que producen IL-17A y/o IL-22 y son dependientes del factor de transcripción RORgammat. Las ILCs son originadas desde células progenitores linfoides que expresan el factor de transcripción PLZF, lo cual tienen la capacidad para diferenciarse en ILCs maduros. Sin embargo, es poco claro si la ruta VHL-HIF está involucrada en la regulación de ILCs.

Para estudiar la función de la pVHL en la generación de ILCs, se obtuvo un ratón knock-out en la pVHL en las células precursoras de ILCs (células que expresan PLZF). En

este ratón se observó que la pérdida de la pVHL produce una alteración en el desarrollo y función de ILCs del grupo 2 (23). Las ILCs del grupo 2 tienen la capacidad de responder a las citocinas tipo alarminas como IL-33, IL-25 y TSLP y como resultado de esta respuesta es la producción de citocinas de tipo 2. Esta respuesta de tipo 2 inmune de las ILCs del grupo 2 es la clave de las enfermedades alérgicas, infección anti-helminos y homeostasis metabólica (24). Por lo tanto, la eliminación condicionada de la pVHL en las células precursoras linfoides innatos afecta mínimamente el estado temprano de diferenciación de las ILCs del grupo 2 en la médula ósea, pero en los tejidos linfoides periféricos tales como el pulmón, intestino y tejido lipídico la ausencia de la actividad de la pVHL causa una disminución importante en el número de ILCs del grupo 2 maduros y provoca una reducida respuesta inmune tipo 2. Como es sabido, la eliminación de la pVHL causa la acumulación de HIF-1alfa y esto provoca las características antes mencionadas en las ILCs del grupo 2. Otro efecto que se observa en la eliminación de la pVHL en las células precursoras linfoides innato es la expresión baja de la proteína ST2 (un componente del receptor IL-33) en las ILCs del grupo 2, y se ha observado que HIF-1alfa altera la epigenética del gen ST2 provocando la baja expresión de este receptor. La expresión baja de ST2 inhibe el desarrollo de ILCs del grupo 2 inducidas por IL-33 (**Figura 2D**) (24). Esto muestra que la actividad de la pVHL regula positivamente el desarrollo de las ILCs del grupo 2.

7. La pVHL en la terapéutica

Con la finalidad de entender el papel de la pVHL en la regulación de la respuesta de las células T CD4 positivas durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, un ratón carente en la pVHL en las células T fue desarrollado. Se observó que este ratón es altamente susceptible a la infección por *M. tuberculosis*, en los tejidos se encontró una baja acumulación de células T específicas a micobacteria en el pulmón y estas células T específicas tienen una reducida capacidad de proliferar, así como una alterada diferenciación y una potenciada expresión de receptores inhibitorios de la respuesta inmune. El ratón knock-out a la pVHL también se observa que tiene una reducida respuesta hacia la vacunación contra *M. tuberculosis* (**Figura 3A**).

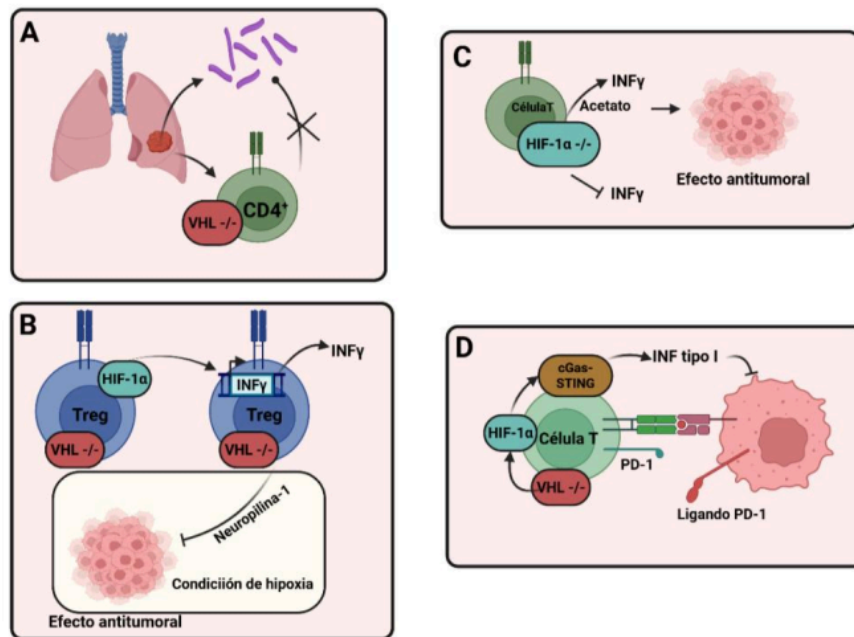


Figura 3. La pVHL en la inmunoterapia. (A) En la tuberculosis murina, las células T CD4+ con eliminación de la proteína VHL no responde contra el bacilo de micobacteria. (B) Las células T reguladoras (Treg) con pérdida de la función de la proteína VHL son productoras de interferón gamma (INFgamma) dependiente de HIF-1alfa, estas células en condiciones de hipoxia y tratadas con neuropilina-1 son muy efectivas contra las células tumorales. (C) Células T deficientes en HIF-1alfa son baja productoras de INFgamma, sin embargo, estas células tratadas con acetato recuperan la producción de la citocina y son efectivas contra células tumorales. (D) La eliminación de la proteína VHL en las células T provoca estabilidad de HIF-1alfa, HIF-1alfa induce una inestabilidad de la mitocondria el cual provoca la activación de la ruta de señalización cGas-STING para la producción de interferón (INF) tipo I que ayuda la capacidad antitumoral y la terapia con anticuerpos Anti-PD-1.

En los ratones normales se ha visto que la función que tiene la pVHL en las células T CD4 positivas después de la activación del TCR es de promover la activación de MYC, generar una respuesta positiva al crecimiento celular, aumento de síntesis de DNA, promover una proliferación y sobrevivencia de la célula. De esta manera indica que la pVHL en la respuesta de la célula T CD4 a la *M. tuberculosis* es elemental para el control de la infección de esta bacteria (25).

Por otro lado, en ratones con células Treg carentes en la pVHL tienden a convertirse en células Treg productoras de INF-gamma. Estas células Treg carentes de la pVHL productoras de INF-gamma al ser estimuladas con neuropilin-1 en condiciones de hipoxia promueven la inmunidad anti-tumoral (**Figura 3B**). En contraste los ratones con células Treg con carencia de HIF-1alfa pierden esta función anti-tumoral (26). Otro estudio mostró que la proteína PHD (prolil-hidroxilasa de HIF) detiene la inmunidad anti-tumor de las

células Th1 (27), ya que se sabe que la proteína PHD realiza la hidroxilación de HIF-1alfa para inducir su degradación. Estos resultados indican que la pVHL puede interferir en la actividad anti-tumoral y que HIF-1alfa actúa como un elemento potenciador anti-tumor en las células Treg productoras de INF-gamma.

Otro estudio con ratones con células T que no tienen HIF-1alfa $-/-$ (knock-out en HIF-1alfa) en condiciones de hipoxia mostró que estas células tienen una baja producción de INF-gamma y la adición de acetato restablece el nivel de producción de esta citocina. También se observó que las células T HIF-1alfa $-/-$ hipóxicas son incapaces para matar células tumorales *in vitro*. En un ensayo *in-vivo*, los ratones knock-out en HIF-1alfa $-/-$ en las células T que se les implanto un tumor fueron resistentes a la terapia combinatoria anti-CTLA-4 y anti-PD-1, una terapia usada para evitar el cansancio de la actividad anti-tumoral de las células T y llegar a tener más éxito en la eliminación del tumor. Importantemente cuando estos ratones con tumor se les administró acetato resolvieron satisfactoriamente la terapia antes mencionada y restablecieron la producción de INF-gamma en las células T infiltrantes de tumor (**Figura 3C**). Por lo tanto, la suplementación de acetato es una estrategia terapéutica efectiva en el caso de las células T con pérdida de función de HIF-1alfa (9).

La vía de activación celular “cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferón genes” (cGAS-STING), también conocida como la ruta sensor de DNA anti-viral, es una ruta que se enciende por la presencia de DNA mitocondrial en el citoplasma celular y esto dispara a la síntesis de cGAMP (dinucleótidos cíclicos), el cual activa a la proteína STING que a su vez activa el factor de transcripción IRF3 para la producción de interferones tipo I como el INFalfa e IFNbeta. Los IFNs tipo I son importantes para mantener activos a las células T y protegen a las células de infecciones virales y tener una mejor respuesta inmune. Sin embargo, se ha observado que la vía cGAS-STING es también una herramienta potente contra la guerra hacia los canceres producidos por deficiencia en la pVHL como es caso del carcinoma de célula renal de células claras (ccRCC por sus siglas en inglés). La activación de la vía cGAS-STING en los tumores deficientes en la pVHL puede potencialmente crear oportunidades terapéuticas ya que se ha visto que estos tumores son más susceptibles hacia la terapia “chimeric antigen receptor T (CAR-T) debido a los niveles elevados de IFNs tipo I en el microambiente tumoral, por ejemplo las células T NKG2D CAR pueden actuar en sinergia con los agonistas de la vía STING para suprimir el crecimiento de tumores pancreáticos, además de que los linfocitos infiltrantes del tumor tienen una mayor penetración a la masa del tumor y permanecen activos debido a la constante activación de la vía cGAS-STING en los tumores deficientes de la pVHL. Esto indica que la pVHL puede estar interfiriendo con la respuesta anti-tumoral por la vía de la producción de IFN tipo I.

En este sentido, un estudio demostró que la pérdida de la pVHL potencia la eficacia del tratamiento “anti-programmed death 1” (PD1) en múltiples modelos de tumor murino donde este tratamiento es dependiente de las células T. El mecanismo molecular del tratamiento anti-PD1 se base en la sobre actividad de HIF-1alfa y HIF-2alfa debido a la pérdida de la pVHL. Las dos moléculas de HIFs disminuyen el potencial de la membrana

externa de la mitocondria y causa la fuga del DNA mitocondrial hacia el citoplasma de la célula, lo cual provoca la activación de la vía cGAS-STING y la producción de INF tipo I en la célula, lo cual potencia la actividad anti-tumoral (**Figura 3D**). Esto demuestra que la pérdida de la función de la pVHL puede ser una ventaja para aquellos tumores con este genotipo ya que los tratamientos anti-tumorales como PDI, CAR-T y en conjunto la activación de la vía cGAS-STING mantienen activa la respuesta inmune contra el tumor por la producción de IFNs tipo I (28).

En conclusión, podemos decir que tomando junto estas evidencias de la asociación de la pVHL con las células inmunes sugiere que la ruta VHL/HIF es crítica para el desarrollo y función de varias células inmunes. Un fenómeno biológico importante es la condición de hipoxia que puede afectar diversas células inmunes y no inmunes simultáneamente en un tejido. La vía de activación VHL-HIF participa en varias funciones biológicas de un mismo sub-tipo celular, como es el caso de las células Tregs, así como también en los tejidos linfoides en estadios estables o inflamado que están constantemente expuestos a los retos hipóxicos. Todo lo anterior indica que, la actividad de la pVHL, que regula la concentración de HIF-1alfa en el citoplasma celular, es primordial en las células inmunes. Ahora es importante recalcar que exista la posibilidad de que las condiciones experimentales empleadas puedan diferir con las condiciones *in vivo*, ya sea en un estado estable o en un proceso de infección. El estado metabólico de las células inmunes también es otro factor importante que determina la decisión final de la célula inmune.

La falta de actividad de la pVHL tiene un impacto profundo en varias enfermedades humanas tales como la formación de un tumor, en consonancia la ausencia de la actividad de la pVHL en las células inmunes hace que la respuesta inmune sea inapropiada y permita el desarrollo de una enfermedad. Esto indica que no solamente es atender la aberrante función de las células no inmunes cuando no tienen la adecuada función de la pVHL en una enfermedad, sino que también hay que tomar en cuenta que las células inmunológicas pueden estar afectadas por la pérdida de la pVHL y por lo tanto el tratamiento debe ser integral con un enfoque para ambos elementos, es decir restaurar la función de la pVHL en las células no inmunes, así como también en las inmunes para llegar a tener éxito cuando se use la pVHL como blanco molecular terapéutico.

Referencias

1. Liu YC. Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:81–127.

2. Hale LP, Braun RD, Gwinn WM, et al. Hypoxia in the thymus: role of oxygen tension in thymocyte survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282:H1467–1477.
3. Biju MP, Neumann AK, Bensinger SJ, et al. Vhlh gene deletion induces Hif-1-mediated cell death in thymocytes. *Mol Cell Biol.* 2004; 24:9038–9047.
4. Neumann AK, Yang J, Biju MP, et al. Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:17071–17076.
5. Dang EV, Barbi J, Yang HY, et al. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell.* 2011; 146:772–784.
6. Shi LZ, Wang R, Huang G, et al. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med.* 2011; 208:1367–1376.
7. Clambey ET, McNamee EN, Westrich JA, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109:E2784–2793.
8. Lee JH, Elly C, Park Y, et al. E3 ubiquitin ligase VHL regulates hypoxia-inducible factor-1alpha to maintain regulatory T Cell stability and suppressive capacity. *Immunity.* 2015; 42:1062–1074.
9. Shen H, Ojo OA, Ding H, et al. HIF1 α -regulated glycolysis promotes activation-induced cell death and IFN- γ induction in hypoxic T cells. *Nat Commun.* 2024; 15:9394.
10. Doedens AL, Phan AT, Stradner MH, et al. Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat Immunol.* 2013; 14:1173–1182.
11. Phan AT, Doedens AL, Palazon A, et al. Constitutive glycolytic metabolism supports CD8(+) T cell effector memory differentiation during viral infection. *Immunity.* 2016; 45:1024–1037.
12. Bargiela D, Cunha PP, Veliça P, et al. The factor inhibiting HIF regulates T cell differentiation and anti-tumour efficacy. *Front Immunol.* 2024; 15:1293723.
13. Eliasson P, Jonsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol.* 2010; 222:17–22.
14. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity.* 2014; 41:1040–1051.
15. Kojima H, Gu H, Nomura S, et al. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 α -deficient chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99:2170–2174.
16. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, et al. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest.* 2008; 118:3420–3430.
17. Meng X, Grottsch B, Luo Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a critical transcription factor for IL-10-producing B cells in autoimmune disease. *Nat Commun.* 2018; 9:251.

18. Abbott RK, Thayer M, Labuda J, et al. Germinal center hypoxia potentiates immunoglobulin class switch recombination. *J Immunol.* 2016; 197:4014–4020.
19. Cho SH, Raybuck AL, Stengel K, et al. Germinal centre hypoxia and regulation of antibody qualities by a hypoxia response system. *Nature.* 2016; 537:234–238.
20. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, et al. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity.* 2014; 41:518–528.
21. Corzo CA, Condamine T, Lu L, et al. HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med.* 2010; 207:2439–2453.
22. Walmsley SR, Print C, Farahi N, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med.* 2005; 201:105–115.
23. Li Q, Li D, Zhang X, et al. E3 ligase VHL promotes group 2 innate lymphoid cell maturation and function via glycolysis inhibition and induction of interleukin-33 receptor. *Immunity.* 2018; 48(258–270):e255.
24. Ebbo M, Crinier A, Vely F, et al. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17:665–678.
25. Liu R, Muliadi V, Mou W, et al. HIF-1 stabilization in T cells hampers the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nat Commun.* 2022; 13:6545.
26. Overacre-Delgoffe AE, Chikina M, Dadey RE, et al. Interferon-gamma drives treg fragility to promote anti-tumor immunity. *Cell.* 2017; 169:e1111.
27. Clever D, Roychoudhuri R, Constantinides MG, et al. Oxygen sensing by T cells establishes an immunologically tolerant metastatic niche. *Cell.* 2016; 166:e1114.
28. Jiao M, Hu M, Pan D, et al. VHL loss enhances antitumor immunity by activating the anti-viral DNA-sensing pathway. *iScience.* 2024; 27:110285.

Capítulo XI

PROTAC y pVHL

1. Terapéutica con la pVHL

En años recientes, el campo sobre el descubrimiento o desarrollo de fármacos o terapias nuevas ha tomado un gran interés, sin embargo, muchos fármacos pierden su efecto benéfico sobre la enfermedad debido a que el organismo, u órgano, o tejido o célula produce resistencia al fármaco. Rutas o metabolismos alternativos se encienden en la célula como respuesta para reducir la actividad del fármaco, ya que el fármaco no es un

componente común para la célula, es un compuesto extraño que tiene que ser metabolizado para su control y eliminación. El enfoque actual sobre el tratamiento de una enfermedad es conocer la proteína clave involucrada en el desarrollo de la enfermedad. Esta proteína clave puede ser una proteína funcional o no funcional (alteradas), que en algunos casos pueda estar expresada inadecuadamente en una etapa del ciclo celular y esto pueda provocar un daño en la biología celular. En este sentido, las terapias génicas o proteicas son la alternativa para evitar el uso de fármacos. La terapia génica consiste en modificar la biología del gen que codifica la proteína clave involucrada en el proceso de la enfermedad, es decir, sustituir el gen alterado por el gen adecuado o adicionar un gen faltante, el otro enfoque génico es la regulación de la expresión del gen blanco.

Con respecto a la terapia donde el blanco es una proteína, ésta consiste en utilizar inhibidores o bloqueadores (ejemplo anticuerpos) contra la proteína clave de la enfermedad o la otra opción es la eliminación de esta proteína. La eliminación de la proteína clave de la enfermedad es una alternativa adecuada para controlar o reducir su efecto en el proceso de la enfermedad. El uso del sistema de ubiquitina proteasoma para eliminar proteínas es una buena opción debido a que este sistema es específico y eficiente para la eliminación proteica. El sistema ubiquitina proteasoma es muy amplio ya que está compuesto de alrededor de 600 tipos de E3 ubiquitina ligasa, esto hace que se pueden tener varias opciones de uso. Con este sistema las proteínas son degradadas por el sistema ubiquitina proteasoma y actualmente se ha diseñado como una herramienta para marcar y unir cualquier proteína de forma específica a un tipo de E3 ubiquitina ligasa para degradarla. Esta herramienta de degradación proteica de forma específica es conocida como PROTAC (PROteolysis Targeting Chimeras, por sus siglas en inglés). En este capítulo abordaremos el PROTAC de VHL específicamente.

2. PROTAC

PROTAC es una herramienta que consiste en un compuesto con característica heterobifuncional. Este compuesto funciona como un puente de unión entre la proteína receptora de sustrato que pertenece a una E3 ubiquitina ligasa y la proteína blanco que se desea degradar (1). Este compuesto heterobifuncional es una molécula de naturaleza proteica o no proteica, por lo regular es un compuesto orgánico sintetizado. El compuesto heterobifuncional (en un extremo de ella) tiene una parte de la molécula un sitio que reconoce y se une específicamente (por un enlace covalente) a la proteína que se desea degradar (una proteína que no es comúnmente degradada por ningún sistema E3 ubiquitina ligasa), y en el otro extremo de la molécula se une específicamente a la proteína componente de la E3 ubiquitina ligasa, que comúnmente es la proteína receptora de

substrato. Entonces, la estructura de la molécula heterobifuncional consiste en tres elementos: un ligando que se une a la proteína de interés, un segundo ligando que recluta una E3 ubiquitina ligasa y un puente que conjuga estos dos ligandos (**Figura 1**).

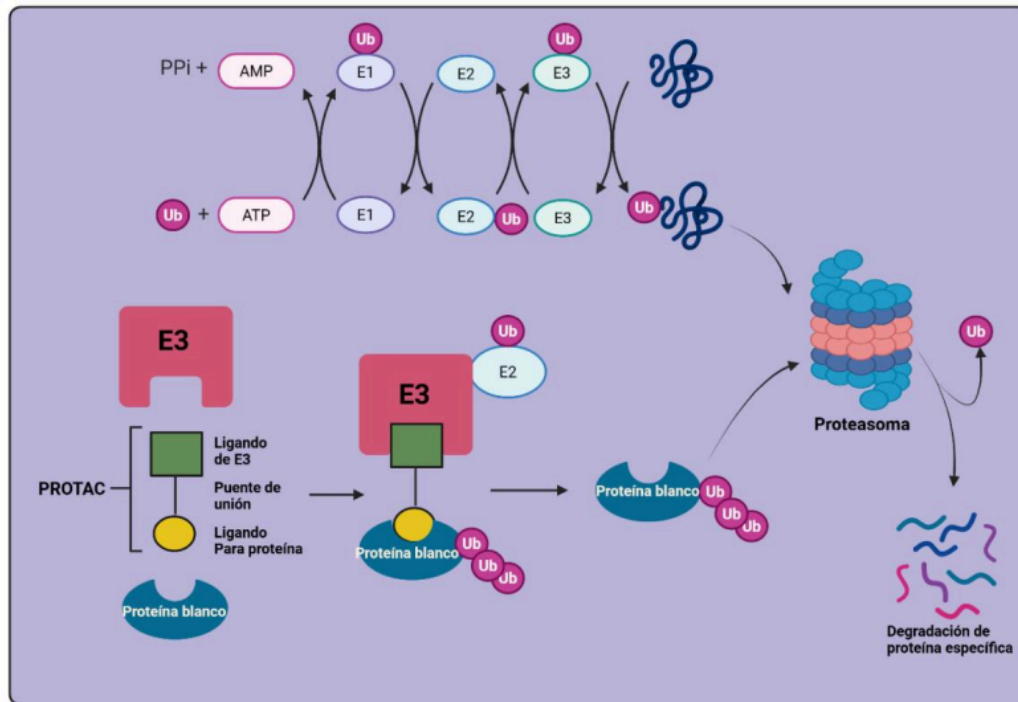


Figura 1. El sistema PROTAC. Semejanza y diferencias entre las reacciones de la cascada del sistema de ubiquitina proteasoma y el PROTAC. El PROTAC interacciona con el complejo E3 ubiquitina ligasa del sistema de ubiquitina proteasoma para marcar la proteína blanco con ubiquitina y degradarla por la vía del proteasoma. El PROTAC consiste en un compuesto bifuncional que en sus extremos tienen sitios de unión específica, en uno de ellos se une a la proteína receptora de sustrato del complejo E3 ubiquitina ligasa (sitio del ligando E3) y en otro extremo está el sitio de unión a la proteína blanco que se desea degradar. La proteína blanco puede ser cualquier proteína que no sea degradada por el sistema ubiquitina ligasa. Los dos sitios de unión mencionados están unidos por un puente de unión. El PROTAC por un lado reconoce la proteína blanco y por el otro lado la E3 ubiquitina ligasa, esta interacción con lleva a la ubiquitinación de la proteína blanco por la E2-ubiquitina del sistema de ubiquitina-proteasoma.

Con respecto al puente que une a los dos ligandos, debe poseer características adecuadas de longitud, hidrofiliidad y rigidez en su diseño para que el PROTAC tenga éxito. En este sentido existe una librería de puentes de unión de ligandos con diferentes características. Por ejemplo, el polietilenglicol o cadenas alquilo con varias longitudes o

grados de flexibilidad son los precursores del puente de unión de los ligandos más comúnmente usados comercialmente y de fácil acceso (2).

Con respecto a las moléculas que actúan como ligandos, tanto para la proteína blanco como para la proteína receptora de sustrato, éstos están sustentados con base a los estudios químicos de la síntesis de inhibidores específicos de la función de estas proteínas, ya que estos inhibidores químicos se unen a la proteína de forma específica y con base a esto los inhibidores químicos han sido modificados para poder ser acoplados al puente de unión. Cuando se usa como proteína receptora de sustrato a la pVHL se utilizan las moléculas químicas inhibidoras de la pVHL descubiertas como el VH032, VH032-LHS, VH101, VH298, las cuales tienen diferentes capacidades de afinidad; éstas son la base para el uso como ligando del PROTAC-VHL. Estos inhibidores han sido modificados químicamente para la unión exitosa y adecuada hacia el puente de unión (2).

El ensamblaje químico del PROTAC consiste en la unión de los dos ligandos (el ligando a la proteína blanco y el ligando a la proteína receptora de sustrato) al puente y es otro elemento de consideración importante para el diseño del PROTAC. En el caso del PROTAC-VHL el ensamblaje puede realizarse de tres maneras: la primera consiste que el ligando que reconoce a la proteína blanco está unido con él y por otro lado, la pVHL-ligando está unido con el puente de unión, posteriormente se juntan y se ensambla el PROTAC-VHL (**Figura 2A**). El segundo caso, el pVHL-ligando no está unido al puente de unión, en cambio la proteína blanco está unido con su ligando y con el puente de unión (**Figura 2B**). El último caso, consiste en que el puente de unión está dividido en dos partes, una parte del puente está unido con el ligando-proteína blanco y la otra parte está unido con el ligando-pVHL, posteriormente estas dos partes del puente se unen por un reconocimiento propio para conformar el puente (**Figura 2C**) (2).

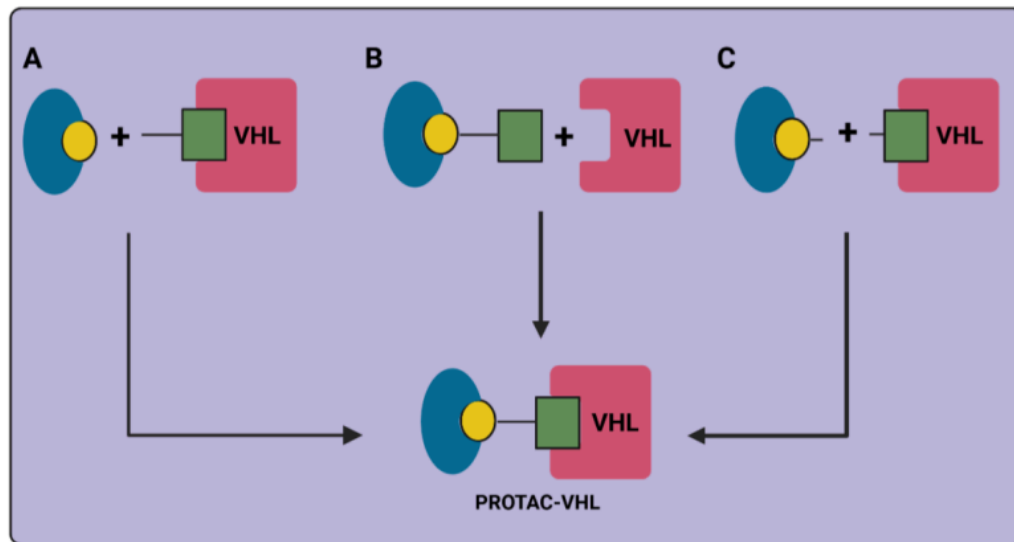


Figura 2. Formación del PROTAC-VHL. Existen tres maneras de la formación del PROTAC-VHL, la primera consiste en que la proteína blanco está unido con su sitio de unión y por separado el E3 ubiquitina ligasa VHL está unida con el resto del PROTAC, posteriormente se unen para formar el sistema (A). El segundo es que el PROTAC está unido con la proteína blanco y posteriormente se une el E3 ubiquitina ligasa VHL (B), por último, el PROTAC está dividido en la parte del puente de unión y ambos sitios están unidos a sus correspondientes ligandos, que interactúan para acoplar el puente de unión (C).

El modo de acción del PROTAC está basado sobre el proceso del sistema ubiquitina-proteasoma, es decir la participación de las enzimas E1, E2 conjugante y la E3 ubiquitina ligasa. El E1 activa la ubiquitina y lo transfiere a la enzima E2, la enzima E2-ubiquitina se une al E3 ubiquitina-ligasa. La E3 ubiquitina ligasa (pVHL) se unirá con el PROTAC y la proteína blanco será el sustrato de ubiquitinación por la E2-ubiquitina. Posteriormente la proteína diana será degradado por el proteasoma (Figura 1).

El campo de acción del PROTAC es de una enorme aplicación. El primer PROTAC diseñado con éxito fue el publicado por Sakamoto en 2001 el cual consistió en el diseño de un fosfopéptido para el ensamblaje del PROTAC Skp1-Culina-F box para la degradación de la proteína aminopeptidasa metionina-2 (MetAp-2) (1). En 2003, el mismo grupo desarrolla el PROTAC que reconoce el receptor de estrógeno alfa o el receptor de andrógeno. Estos primeros desarrollos de PROTAC fueron basados en el uso de péptidos con un peso molecular alto y con limitada permeabilidad celular. Desde este punto de vista, un numero de inhibidores para la proteína Cereblon (CRBN) y pVHL entre otros han sido descubiertas como ligandos para PROTAC. Muchos de estos han sido explorados para

generar permeabilidad y actividad biológica del PROTAC para degradar proteínas seleccionadas en la célula. A pesar de la abundancia de E3 ubiquitina ligasa (más de 600 tipos) en las células humanas, solamente pocos E3 ubiquitina ligasas han sido usados en la tecnología PROTAC para la degradación de proteínas blanco. Hasta el momento, 28 PROTACs están en pruebas clínicas involucrados en cáncer y otras enfermedades. El PROTAC-CRBN y -VHL han sido los más exitosamente utilizados en el sistema de PROTAC por el cual nos enfocaremos al PROTAC-VHL (3).

3. PROTAC-VHL

A diferencia de CRBN el cual está conformada por Culina-4-RING E3 ubiquitina ligasa, la pVHL es el miembro de la Culina2-RING E3 ubiquitina ligasa. Como se ha mencionado, la pVHL es la subunidad que se une específicamente a la proteína blanco y promueve su degradación proteasomal. Entre muchos de los substratos blancos por la pVHL E3 ligasa, el HIF-1alfa es el mejor caracterizado. El desarrollo inicial de PROTAC-VHL fue basado en el uso de un péptido de 5 a 7 aminoácidos de longitud derivado de la proteína HIF-1alfa como plataforma molecular para la E3 ubiquitina ligasa VHL en vez del uso de moléculas pequeñas, este es referido como BioPROTACs (3).

Los ejemplos de PROTAC-VHL son amplios y hasta el momento más de 750 PROTAC-VHL han sido publicados a la fecha, y las proteínas blanco es de alrededor de más de 50 proteínas diferentes que son degradadas por este sistema (**Tabla 1**). Mencionaremos algunos ejemplos de proteínas diana degradados por PROTAC-VHL.

Tabla 1. PROTAC-VHL y proteínas blanco.

Nombre del PROTAC-VHL	Proteínas blanco
MZ1	Brd2, Brd3, Brd4
ARV-771	
AT1	
macroPRO-TAC1	
SIM1	
Compuesto 9	Brd4
VZ185	Brd7, Brd9
ACBI1	SMARCA2, SMARCA4, PRBM1
CM11	VHL
PROTAC 14a	CRBN
CRBN-6-5-5-VHL	CRBN
BI-0319	PTK2
GSK215	PTK2
SGK-POROTAC1	SGK3
ARCC-4	AR
PROTAC 3i	TBK1
PROTAC-3 basado en Gifitinid	EGFR
PROTAC-6	Bcl-xL
MS33	WDR5
Homer	WDR5
XL01126	LRRK2

El descubrimiento de moléculas pequeñas con función similar al péptido HIF-1alfa ha conducido a un mejoramiento significativo en el diseño de PROTACs. Uno de los primeros PROTAC-VHL con el uso de moléculas pequeñas como plataforma de reclutamiento fue el diseño de una molécula para reconocer proteínas con bromodominio (BRDs), esta molécula es el inhibidor de bromodominios JQ1 para el reclutamiento de la proteína BRD4 (4).

Mientras algunos inhibidores de la proteína BCR-ABL como imatinib, dasatinib, bosutinib, nilotinib, asciminib son altamente efectivos contra la enfermedad de leucemia mieloide crónica, muchos pacientes desarrollan resistencia hacia estos inhibidores debido a mutaciones en el gen BCR-ABL. Esfuerzos para sobrellevar la resistencia a los inhibidores en esta enfermedad han conducido en el desarrollo de diversos BCR-ABL PROTACs, algunos de los cuales han mostrado gran actividad y selectividad hacia varias formas de BCR-ABL incluyendo mutantes que confieren resistencia hacia los inhibidores de BCR-ABL. Con respecto a esto, en el año 2016 el grupo Crews reportó el primer degradador de BCR-ABL PROTAC (DAS-6-2-2-6) basado sobre el uso de bosutinib o dasatinib capaces de degradar c-ABL y BCR-ABL usando cualquier plataforma CRBN o VHL E3 ubiquitina ligasa como receptor de sustrato (5).

Un nuevo PROTAC llamado GMB-475 fue desarrollado usando el compuesto GNF5, que corresponde a un inhibidor alostérico de un tamaño pequeño el cual se une con alta afinidad hacia la proteína “myristoyl pocket kinasa ABL”. El PROTAC GMB-475 tiene la capacidad de degradar a ambos el BCR-ABL silvestre y el BCR-ABL que aborda ciertas mutaciones a una concentración nanomolar (6). El GMB-475 fue particularmente efectivo en la degradación de BCR-ABL que posee la mutación en G205E, esta mutación exhibe una marcada actividad proliferativa en la célula. Además, el GMB-475 exhibió una alta selectividad de toxicidad hacia las células CML CD34+ primario (células leucémicas) comparada con las células CD34+ progenitoras de origen hematopoyética normal.

El PROTAC SIAIS178 donde el compuesto dasatinib es el ligando de la pVHL fue eficiente para la degradación de BCR-ABL y como resultado un efecto anti-proliferativo en células leucémicas K562. Estudios *in vivo* mostró una regresión del tumor significativamente por la exposición de este PROTAC, y también fue exitoso para degradar algunas mutaciones de BCR-ABL que confieren resistencia hacia algunos fármacos relevantes (7).

Mutaciones en el gen FLT-3 son los más comunes que se presenta en la leucemia mieloide aguda. Un PROTAC de VHL que recluta FLT-3 empleando el inhibidor FLT-3 exhibe

una alta eficiencia en la degradación de FLT-3 en células de leucemia mieloide aguda, ambos a nivel *in vitro* como en modelos *in vivo* (8).

Un PROTAC basado en ABT-263 que recluta VHL demostró una gran afinidad a BCL-xL (una proteína anti-apoptótica) y con una menor toxicidad para plaquetas comparado al compuesto parental ABT-263. Una variante de este PROTAC, el dual BCL-2/BCL-XL mostró un considerable incremento de potencia en la degradación comparado al BCL-XL (9).

Dos diferentes PROTACs fueron generados usando el sistema proteolítico de la pVHL, con diferentes ligandos de inhibidores de EED y diferentes puentes de unión. El PROTAC2 condujo a una degradación selectiva de las proteínas EED, EZH2 y SUZ12 reduciendo la proliferación de células de tumor dependientes de EZH Karpas422 (10). El UNC6852, otro PROTAC-VHL degradador de EZH2 ha mostrado resultados similares contra el tipo silvestre de EZH2 y también contra la mutante Y641N de EZH2 (11). La proteína “Policomb repressive complex 2” (PRC2) es ampliamente vinculada a enfermedades hematológicas malignas. La PRC2 está conformada de las subunidades EZH2, EED, SUZ12, RBAP46/48 y AEBP2. El EZH2 es la subunidad catalítica de PRC2. Mutaciones que producen la pérdida de la función de EZH2 y SUZ12 son frecuentemente observados en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de células T. El PROTAC-VHL fue efectivo contra esta enfermedad.

La proteína “TANK-binding kinase 1” (TBK1) es un miembro no canónico de la familia de cinasas del inhibidor de kappa B cinasa (IKK), TBK1 funciona en el desarrollo celular y en la respuesta inmune innata, y también ha sido vinculado en tumorigénesis. Un PROTAC-VHL que degrada el TBK1 en un 99% ha sido desarrollado con éxito. Otro PROTAC-VHL con blanco para la proteína “focal adhesión kinase” (FAK) también fue desarrollado; FAK tiene múltiples papeles y actúa como un regulador de transducción de señal intracelular, participa en el crecimiento celular del cáncer y está asociada como una cinasa independiente para varias proteínas de señalización. Un alto nivel de la proteína de FAK ha sido detectado en algunos tipos de tumores sólidos, por el cual FAK es un blanco terapéutico.

Otros PROTAC-VHL han sido desarrollados para las siguientes proteínas ya que éstas tienen funciones importantes en los tumores cancerosos. Por ejemplo, la proteína “WD40 repeat-containing protein 5” (WDR5) es la subunidad funcional del complejo “mixed lineage leukaemia histone metiltransferasa”, la cual contribuye a sostener a los cánceres hematológicos y esta proteína se encuentra sobre expresada en algunos tumores sólidos. Otra proteína blanco para PROTAC-VHL es el “epidermal growth factor receptor” (EGFR) que pertenece a la clase de receptores de tirosina cinasa y es una proteína trans-membranal involucrada en la regulación de procesos celulares esenciales, tales como

proliferación celular, metabolismo y apoptosis. La sobre expresión o mutación de EGFR está asociado con el desarrollo de una variedad de tumores sólidos tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas. “Serum/glucocorticoid-inducible protein kinase” (SGK) es una proteína serina/treonina cinasa que es activada corriente abajo por factores de crecimiento y que contribuye a la regulación de canales de iones, factores de transcripción y actividades enzimáticas; la sobre expresión de SGK3 está vinculada a algunos cánceres sólidos y por eso se ha diseñado un PROTAC-VHL específico para esta proteína.

4. Innovaciones en PROTAC-VHL

El diseño de métodos que permiten un control condicionado de la función del PROTAC ha ganado mucha atención en la comunidad biológica. El control espacio-temporal de la función del PROTAC es altamente deseable para la terapia, ya que el mecanismo del encendido de la actividad del PROTAC hacia un tejido canceroso podría reducir los efectos no deseados por el apagado de la proteína blanco, tales como la citotoxicidad hacia las células sanas, sobre todo en aquellos casos donde el PROTAC puede funcionar sobre ambas células cancerosas y sanas. Actualmente existe el enfoque hacia el control espacio-temporal de la actividad de PROTAC-VHL y está basado sobre el encendido inducible de la actividad del PROTAC por un estímulo externo, tal como la luz.

Un PROTAC-VHL es hecho a base del uso del compuesto orto-tetrafluorobenceno como un encendedor foto-inducible biocompatible. La forma de cómo funciona es por los cambios de conformación del orto-tetrafluorobenceno, la conformación trans de este compuesto induce la unión tripartita con la proteína blanco y la VHL-E3 ubiquitina ligasa, mientras la conformación cis no tiene efectividad para esta unión; la luz induce la forma trans de esta molécula. Una prueba hecha a nivel *in vitro* mostró una degradación exitosa de la proteína Brd2 con el PROTAC-VHL en la conformación trans del orto-tetrafluorobenceno inducida por luz, mientras la conformación cis fue incapaz de inducir la degradación de esta proteína (**Figura 3A**) (13).

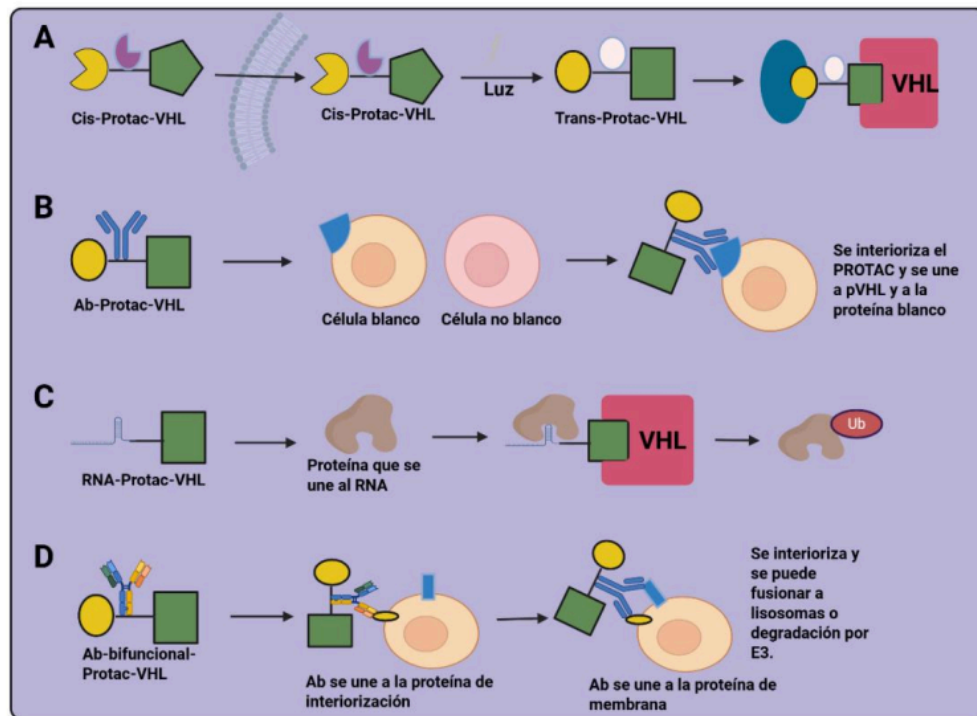


Figura 3. Variantes del PROTAC-VHL. (A) Encendido por luz, el puente de unión es un compuesto isómero (cis/trans) fotosensible que en la forma de cis el PROTAC_VHL no tiene capacidad de unirse sus componentes, al entrar a la célula se aplica luz que provoca al puente de unión en la forma trans activando el PROTAC-VHL para unirse a sus correspondientes componentes. (B) El PROTAC-VHL se adiciona un anticuerpo que va a reconocer su ligando expuesto en la parte de la superficie de una célula, después de la unión específica del anticuerpo el PROTAC-VHL se interioriza a la célula para unirse a los componentes. (C) Al PROTAC-VHL se modifica con una secuencia de ácido nucleico (DNA o RNA) específica para la unión de una proteína, la proteína se une al ácido nucleico del PROTAC-VHL para su degradación. (D) El PROTAC-VHL para la degradación de proteína membranales, que consiste en adicionar un anticuerpo que en una de sus cadenas del anticuerpo reconozca a una proteína membranal que participa en la interiorización (endocitosis, fagocitosis, etc) y en la otra cadena del anticuerpo reconoce la proteína de membrana blanco. El PROTAC-VHL es interiorizada a la célula y por un lado se une los componentes de la E3 ubiquitina ligasa VHL o también puede fusionarse con los lisosomas.

El control espacial de la actividad de PROTAC ha sido dirigido por el uso de anticuerpos conjugados al PROTAC. Usando el análogo metilado 113 de MZ1 y el anticuerpo trastuzumab como anticuerpo dirigido a las células HER2+, la degradación de la proteína Brd4 fue selectiva y únicamente en la línea celular de cáncer de mama HER2+ con

el PROTAC-VHL conjugado al anticuerpo, pero esto no ocurre en la línea celular HER2 negativo. Cuando se comparó la actividad del PROTAC-VHL no conjugado al anticuerpo éste no pudo discriminar entre estas dos líneas celulares (**Figura 3B**) (14).

Expandiendo la tecnología del PROTAC, PROTACs que tienen unido un oligonucleótido corto con una secuencia de reconocimiento para una proteína es un nuevo enfoque introducido recientemente dirigido para proteínas blanco que se unen a RNA o DNA (15). En este sentido, un PROTAC-VHL fue diseñado empleando un oligonucleótido corto de RNA modificado como ligando para la proteína blanco y este oligonucleótido está unido al puente de unión, el cual tiene a un péptido corto derivado de HIF-1alfa como el ligando para VHL; usando esta estrategia se indujo la degradación parcial de proteínas blanco que se unen al RNA, como el factor de células madre LIN28 y un factor de “splicing” RBFOX1 (**Figura 3C**) (15).

Para el caso de las proteínas de membrana es complicado usar el PROTAC-VHL, entonces para abordar este problema se emplea anticuerpos dirigidos contra la proteína de membrana. Las inmunoglobulinas IgG tiene una vida media larga en el suero y son bi-específicas que pueden unirse a dos proteínas simultáneamente, co-localizando a ellas. Por lo tanto, empleando el modelo de PROTACs se puede reclutar E3 ubiquitina ligasa en la membrana para inducir la degradación de la proteína membranal. Esta tecnología es el PROTAC basado con anticuerpos (AbTACs). Otro sistema del AbTACs es generar un anticuerpo con bi-especificidad, es decir que en una cadena del anticuerpo reconozca a una proteína de membrana que participe en la activación del proceso de internalización y fusión de membrana al lisosoma para su degradación (receptores de membrana degradados por lisosoma), y la segunda cadena del anticuerpo es dirigida a la proteína membranal que se desea degradar, de esta manera el anticuerpo recluta a la proteína blanco al proceso de degradación por la vía lisosomal (**Figura 3D**) (12).

5. Ventajas del PROTAC

La herramienta del PROTAC muestra ventajas comparada al uso tradicional de inhibidores químicos a proteínas. Una molécula PROTAC puede catalizar la degradación de proteína blanco por múltiples veces y sus efectos farmacológicos es logrado en muy bajas dosis de concentración (nanomolar) comparado a los inhibidores, así reduciendo la toxicidad. Las proteínas consideradas como no degradables pueden ser potencialmente blancos para PROTACs, como es el caso de factores de transcripción como c-MYC, FOXO1, receptores de hormonas involucrados en la progresión de algunas enfermedades malignas. Adicionalmente, PROTACs puede sobrellevar a las proteínas mutadas con resistencia a los inhibidores químicos.

Las limitaciones de PROTACs son principalmente debido a la propia toxicidad de la proteína blanco que puede generar por su eliminación, es decir algunas proteínas (quinasas) enzimáticas, así como también, proteínas con función de plataformas, llegan a ser esenciales para la función normal de la célula que la pérdida de éstas provoca alteraciones fuertes en la célula. En cambio, los inhibidores bloquean solamente la actividad enzimática de la proteína blanco y la inhibición de la proteína blanco es transiente o reversible que puede recuperar la función cuando el inhibidor se elimina, contrario a la degradación por PROTAC donde ya no es posible la recuperación de la proteína.

En cuanto el diseño de los PROTACs debe tenerse algunas consideraciones para el buen funcionamiento. La longitud del puente de unión de los dos ligandos es crucial para el mejoramiento. Puentes de unión cortos puede causar un efecto estérico que rompe el complejo ternario, así complicando la actividad del PROTACs. Conversamente, puentes de unión muy largos puede dar cambios en la estabilidad molecular, además incrementa el peso molecular del PROTAC el cual reduce la permeabilidad celular. El buen diseño del puente de unión es importante para el éxito del PROTAC y esto puede limitar el uso de esta herramienta.

Finalmente, a pesar de que la pVHL puede tener varias funciones en la célula, como ha sido descrito en este libro, el uso de PROTAC-VHL produce mayor riqueza de proteínas blanco, esto significa que, aunque la pVHL no este involucrada en la enfermedad puede ser utilizada como PROTAC-VHL para la eliminación de las proteínas blanco de estas enfermedades. Esto significa que la pVHL puede ser la proteína revolucionaria de la medicina actual para el tratamiento de varias enfermedades ya sea mediante la introducción del gen que codifica a la pVHL o la introducción de la pVHL por medio del péptido TAT-VHL o por el uso del PROTAC-VHL, por lo tanto, este libro demuestra la versatilidad de la pVHL en el humano y el fomento para una mayor investigación básica, así como aplicativa, de la pVHL en la medicina.

Referencias

1. Sakamoto KM, Kim KB, Kumagai A, et al. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:8554–8559.
2. Zografou-Barredo NA, Hallatt AJ, Goujon-Ricci J, et al. A beginner's guide to current synthetic linker strategies towards VHL-recruiting PROTACs. *Bioorg Med Chem*. 2023; 88-89:117334.

3. Bou Malhab LJ, Alsafar H, Ibrahim S, et al. PROTACs: Walking through hematological malignancies. *Front Pharmacol.* 2023; 14:1086946.
4. Zengerle M, Chan KH, Ciulli A. Selective small molecule induced degradation of the BET bromodomain protein BRD4. *ACS Chem Biol.* 2015; 10:1770–1777.
5. Lai AC, Toure M, Hellerschmied D, et al. Modular PROTAC design for the degradation of oncogenic BCR-ABL. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016; 55:807–810.
6. Burslem GM, Schultz AR, Bondeson DP, et al. Targeting BCR-ABL1 in chronic myeloid leukemia by PROTAC-mediated targeted protein degradation. *Cancer Res.* 2019; 79:4744–4753.
7. Zhao Q, Ren C, Liu L, et al. Discovery of SIAIS178 as an effective BCR-ABL degrader by recruiting von hippel-lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase. *J Med Chem.* 2019; 62:9281–9298.
8. Burslem GM, Song J, Chen X, et al. Enhancing antiproliferative activity and selectivity of a FLT-3 inhibitor by proteolysis targeting chimera conversion. *J Am Chem Soc.* 2018; 140:16428–16432.
9. Khan S, Zhang X, Lv D, et al. A selective BCL- XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity. *Nat. Med.* 2019; 25:1938–1947.
10. Hsu JH, Rasmusson T, Robinson J, et al. EED-targeted PROTACs degrade EED, EZH2, and SUZ12 in the PRC2 complex. *Cell Chem Biol.* 2020; 27:41–46.e17.
11. Potjewyd F, Turner AW, Beri J, et al. Degradation of polycomb repressive complex 2 with an EED-targeted bivalent chemical degrader. *Cell Chem Biol.* 2020; 27:47–56.e15.
12. Diehl CJ, Ciulli A. Discovery of small molecule ligands for the von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligase and their use as inhibitors and PROTAC degraders. *Chem Soc Rev.* 2022; 51:8216-8257.
13. Pfaff P, Samarasinghe KT, Crews CM, et al. Reversible Spatiotemporal Control of Induced Protein Degradation by Bistable PhotoPROTACs. *ACS Cent Sci.* 2019; 5:1682-1690.
14. Maneiro MA, Forte N, Shchepinova MM, et al. Antibody-PROTAC Conjugates Enable HER2-Dependent Targeted Protein Degradation of BRD4. *ACS Chem Biol.* 2020; 15:1306-1312.
15. Ghidini A, Cléry A, Halloy F, et al. RNA-PROTACs: Degradation of RNA-Binding Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2021; 60:3163-3169.

FUNCIONES IMPORTANTES DE LA PROTEÍNA VHL EN LAS DIFERENTES ENFERMEDADES CRÓNICAS DEGENERATIVAS

INFORME DE ORIGINALIDAD

1 %

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	es.wikipedia.org Internet	258 palabras — < 1 %
2	es.m.wikipedia.org Internet	58 palabras — < 1 %
3	es.unionpedia.org Internet	44 palabras — < 1 %
4	M. Zghal, O. Messaoud, M. Mokni. "Xeroderma pigmentoso", EMC - Dermatología, 2021 Crossref	39 palabras — < 1 %
5	Sandra Rodríguez-Martínez. "LL-37 regulates the overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and c-IAP-2 in human keratinocytes", International Journal of Dermatology, 5/2008 Crossref	24 palabras — < 1 %
6	www.tesisenred.net Internet	22 palabras — < 1 %
7	e-archivo.uc3m.es Internet	20 palabras — < 1 %
8	repositorio.uam.es Internet	18 palabras — < 1 %

9	tesisenred.net Internet	18 palabras — < 1 %
10	www.elsevier.es Internet	17 palabras — < 1 %
11	www.coursehero.com Internet	16 palabras — < 1 %
12	www.revibiomedica.sld.cu Internet	16 palabras — < 1 %
13	Hyeonhui Kim, Minki Kim, Sun-Kyoung Im, Sungsoon Fang. "Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes", Laboratory Animal Research, 2018 Crossref	15 palabras — < 1 %
14	patents.google.com Internet	15 palabras — < 1 %
15	prezi.com Internet	15 palabras — < 1 %

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 15 PALABRAS