



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

Contribución del citocromo P450 y de proteínas reguladoras
del pH a la quimiorresistencia de células de meduloblastoma
humano (DAOY) en condiciones de hipoxia

Tesis que presenta

M. en C. Jesús Valencia Cervantes

Para Obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Neurobiología Celular y Molecular

Directores de Tesis:

Dr. José A. Arias Montaña

Dr. Víctor M. Dávila Borja

Ciudad de México

Diciembre, 2018

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría y en el Laboratorio de Neurofarmacología Celular y Molecular del Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav); bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Dávila Borja y del Dr. José Antonio Arias Montaña. El proyecto contó con financiamiento del Cinvestav, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt; proyectos 152919 y 220448), y Recursos Fiscales de Presupuesto Federal para Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, con registro 39/2010.

Agradecimientos

- Beca asignada Conacyt CB-2010/152919
- Dr. José Antonio Arias Montaña (Cinvestav-IPN), por el apoyo incondicional, la paciencia y la motivación transmitida en todo momento. Le agradezco la aceptación en su grupo de trabajo y poder aprender de usted en realizar un trabajo excepcional manteniendo siempre su sencillez como persona.
- Dra. Sara Rodríguez Enríquez (Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez), por su valioso tiempo y dedicación a la mejora del proyecto y sus acertados comentarios. Muchas gracias.
- Dr. Daniel Martínez Fong (Cinvestav-IPN) por las observaciones realizadas al trabajo y por ser el responsable de que siguiera y terminara el doctorado, muchas gracias.
- Guillermo Aquino Jarquín (Laboratorio de Investigación en Genómica, Genética Bioinformática, Hospital Infantil de México Federico Gómez), por el apoyo en la realización y complementación del proyecto final.
- Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño (Cinvestav-IPN), por las adecuadas observaciones realizadas al escrito final de tesis. Gracias.
- M. en C. Víctor Hugo Rosales. Coordinación General de Servicios Experimentales, Citometría de Flujo, Cinvestav-IPN.
- Dra. Karla G. Carvajal Aguilera y Dr. Marco A. Martínez Ávila. Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría.
- Dra. Sara Elva Espinosa Padilla y M. en C. Edgar Alejandro Medina Torres. Unidad de Investigaciones en Inmunodeficiencias, Instituto Nacional de Pediatría.
- Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez. Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

| Índice | Página |
|---|---------------|
| • Resumen | I, II |
| • Abstract | III, IV |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Tumores pediátricos del sistema nervioso central | 1 |
| 1.2 Meduloblastomas | 4 |
| 1.3 Estadificación, pronóstico y tratamiento de meduloblastoma | 7 |
| 1.4 Hipoxia tumoral | 8 |
| 1.5 Hipoxia y resistencia tumoral | 11 |
| 1.6 Metabolismo de fármacos por las enzimas del citocromo P450 (CYP) | 12 |
| 2. Planteamiento del problema | 16 |
| 3. Hipótesis | 17 |
| 4. Objetivo general | 18 |
| 4.1 Objetivos particulares | 18 |
| 5. Materiales y métodos | 19 |
| 5.1 Reactivos | 19 |
| 5.2 Identificación <i>in silico</i> de elementos de respuesta a hipoxia (HRE) | 19 |
| 5.3 Cultivo de células y establecimiento de las condiciones de hipoxia | 20 |
| 5.4 Inmunodetección por Western blot | 20 |
| 5.5 Inmunocitoquímica | 22 |
| 5.6 Extracción de RNA total y qRT-PCR | 22 |
| 5.7 Ensayo de exclusión de azul de tripán | 23 |
| 5.8 Preparación de soluciones de fármacos | 24 |
| 5.9 Ensayo de viabilidad celular (MMT) | 24 |
| 5.10 Análisis del ciclo celular | 24 |
| 5.11 Ensayo de apoptosis | 25 |
| 5.12 Determinación del pH en el medio extracelular | 25 |
| 5.13 Efecto de la combinación de fármacos | 26 |
| 5.14 Análisis estadístico | 26 |
| 6. Resultados | 27 |
| 6.1 Predicción de elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en genes de CYP | 27 |
| 6.2 Hipoxia y respuesta celular: activación de HIF-1 α | 27 |
| 6.3 Efecto de la hipoxia en el pH extracelular en cultivos de células DAOY | 31 |
| 6.4 Efecto de la hipoxia en la expresión de CA-IX, MCT-4 y NHE-1 | 32 |

| | | |
|------|--|----|
| 6.5 | Efecto de la hipoxia en la citotoxicidad de ciclofosfamida (CPA) e ifosfamida (IFA) | 35 |
| 6.6 | Metabolismo de CPA e IFA por enzimas CYP | 37 |
| 6.7 | Efecto de la hipoxia en la expresión del RNAm de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 | 38 |
| 6.8 | Efecto de la hipoxia en la expresión proteica de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 | 40 |
| 6.9 | Efecto de la hipoxia en la proliferación celular | 42 |
| 6.10 | Efecto de 2-metoxiestradiol (2-ME) en la expresión de HIF-1 α | 46 |
| 6.12 | Efecto de 2-ME en la expresión de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 | 49 |
| 6.12 | Efecto citotóxico de CPA o IFA en combinación con 2-ME | 53 |
| 6.13 | Efecto del tratamiento con CPA, IFA y 2-ME en la apoptosis celular | 56 |
| 7. | Discusión | 59 |
| 8. | Conclusiones | 68 |
| 9. | Perspectivas | 69 |
| 10. | Referencias | 70 |
| 11. | Anexos | 90 |
| 11.1 | Anexo 1. Características de células DAOY de meduloblastoma humano | 90 |
| 11.2 | Anexo 2. Curva de proliferación de las células DAOY | 91 |
| 11.3 | Anexo 3. Detección de micoplasma en células DAOY | 92 |
| 11.4 | Anexo 4. Establecimiento de las condiciones de hipoxia | 94 |
| 11.5 | Anexo 5. Curvas estándar de genes endógenos (<i>house-keeping</i>) | 95 |
| 11.6 | Anexo 6. Curva estándar y validación de la eficiencia de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 | 96 |
| 11.7 | Anexo 7. Concentración y pureza del RNA total de células DAOY expuestas a normoxia o hipoxia | 97 |
| 11.8 | Anexo 8. Integridad del RNA total en geles de agarosa | 98 |

| Índice de figuras | Página |
|---|---------------|
| ➤ Figura 1. Frecuencia por edad y prevalencia de cáncer infantil en México | 1 |
| ➤ Figura 2. Incidencia del cáncer en niños pacientes del Seguro Popular | 2 |
| ➤ Figura 3. Distribución de los Tumores del Sistema Nervioso Central | 3 |
| ➤ Figura 4. Representación de los grupos, subtipos, datos clínicos, número de copias de cromosomas, y otras características | 5 |
| ➤ Figura 5. Distribución de nutrientes, fármacos y presión parcial de O ₂ (ppO ₂ , mm Hg) en células de tumores sólidos | 8 |
| ➤ Figura 6. Regulación del Factor Inducible por Hipoxia 1 α (HIF-1 α) | 10 |
| ➤ Figura 7. Metabolismo de sustratos por isoformas de CYP | 21 |
| ➤ Figura 8. Efecto de la hipoxia en la expresión de HIF-1 α en células de meduloblastoma humano DAOY | 29 |
| ➤ Figura 9. Inmunorreactividad a HIF-1 α | 30 |
| ➤ Figura 10. Análisis de la inmunoreactividad a HIF-1 α en respuesta a la hipoxia | 31 |
| ➤ Figura 11. Efecto de la hipoxia en el pH extracelular | 32 |
| ➤ Figura 12. Efecto de la hipoxia en la expresión de CA-IX, MCT-4 y NHE-1 en células DAOY | 34 |
| ➤ Figura 13. Efecto de la hipoxia en el efecto citotóxico de CPA e IFA en células DAOY | 36 |
| ➤ Figura 14. Metabolismo de CPA e IFA por enzimas CYP | 38 |
| ➤ Figura 15. Efecto de la hipoxia en la expresión de RNAm de <i>CYP2B6</i> , <i>CYP3A4</i> y <i>CYP3A5</i> en células DAOY | 39 |
| ➤ Figura 16. Efecto de la hipoxia en la expresión de <i>CYP2B6</i> , <i>CYP3A4</i> y <i>CYP3A5</i> en células DAOY | 41 |
| ➤ Figura 17. Efecto de la hipoxia en la proliferación de las células DAOY | 42 |
| ➤ Figura 18. Efecto de la hipoxia en el ciclo celular | 44 |
| ➤ Figura 19. Efecto de la hipoxia en la expresión de CDKN1B en células DAOY | 45 |
| ➤ Figura 20. Efecto del 2-Metoxiestradiol (2-ME) en la expresión nuclear de HIF-1 α inducida por la hipoxia en células DAOY | 46 |
| ➤ Figura 21. Efecto del 2-Metoxiestradiol (2-ME) en la viabilidad celular | 47 |
| ➤ Figura 22. Efecto del 2-Metoxiestradiol (2-ME) en el pH extracelular en condiciones de normoxia e hipoxia | 48 |
| ➤ Figura 23. Efecto del 2-Metoxiestradiol (2-ME) en la expresión de | |

| | |
|--|----|
| CA-IX y MCT-4 inducida por la hipoxia en células DAOY | 49 |
| ➤ Figura 24. Efecto del 2-Metoxiestradiol (2-ME) y la hipoxia en la expresión de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 en células DAOY | 50 |
| ➤ Figura 25. Efecto del 2-ME en la disminución de la proliferación celular inducida por la hipoxia | 52 |
| ➤ Figura 26. Efecto del 2-ME en la expresión de CDKN1B inducida por la hipoxia | 53 |
| ➤ Figura 27. Efecto del tratamiento con CPA e IFA en combinación con 2-ME en la apoptosis celular | 56 |

Índice de cuadros

Página

| | |
|---|----|
| ➤ Cuadro 1. Características histopatológicas y moleculares del meduloblastoma | 6 |
| ➤ Cuadro 2. Resistencia al tratamiento dependiente de la expresión de HIF-1 α en tumores | 13 |
| ➤ Cuadro 3. Expresión de CYP en tumores cerebrales | 14 |
| ➤ Cuadro 4. Expresión de CYP asociada a la quimiorresistencia | 15 |
| ➤ Cuadro 5. Predicción de HRE en genes de CYP | 28 |
| ➤ Cuadro 6. Efecto de la hipoxia en el efecto citotóxico de CPA e IFA | 37 |
| ➤ Cuadro 7. Distribución del ciclo celular en células DAOY en condiciones de hipoxia | 45 |
| ➤ Cuadro 8. Efecto del 2-ME en la citotoxicidad de CPA e IFA | 55 |
| ➤ Cuadro 9. Apoptosis inducida por CPA e IFA en combinación con 2-ME | 57 |

Resumen

Los meduloblastomas se encuentran entre los tumores sólidos más comunes en la infancia, y la quimiorresistencia persiste como la causa principal del fracaso del tratamiento convencional. La hipoxia y la subsecuente activación del factor transcripcional inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) se consideran factores clave en la modulación de la eficacia de los fármacos antineoplásicos, pero los mecanismos subyacentes a la quimiorresistencia no se conocen de manera completa.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la hipoxia induce la resistencia al tratamiento con ciclofosfamida (CPA) e ifosfamida (IFA) en células DAOY de meduloblastoma humano, y si este posible efecto depende de la expresión de HIF- 1α , y de la regulación por la hipoxia y HIF- 1α de la expresión de las enzimas de citocromo P450 CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5, y de la proliferación celular.

Los cultivos en monocapa de células DAOY de meduloblastoma humano se expusieron por 24 h a hipoxia moderada (1% O_2) o severa (0.1% O_2) y se evaluó la expresión de proteínas mediante la determinación del RNAm y por inmunodetección. La citotoxicidad se evaluó con el ensayo MTT y mediante tinción con Anexina V/PI y citometría de flujo. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo de exclusión con azul de tripán, y el ciclo celular por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo.

Los resultados indicaron que la hipoxia disminuyó la citotoxicidad de CPA e IFA, lo que se correlacionó con una reducción en los niveles de proteína de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5, y la inhibición de la proliferación celular inducida por el arresto celular en la fase G1. Estas respuestas dependieron de la activación de HIF- 1α inducida por hipoxia, como lo muestra la inhibición farmacológica de su actividad transcripcional con 2-metoxiestradiol (2-ME). El 2-ME favoreció el efecto citotóxico de CPA e IFA, y el aumento en la apoptosis al combinar estos antineoplásicos con 2-ME.

En conjunto, estos datos indican que mediante la estimulación de la actividad de HIF-1 α , la hipoxia regula negativamente la expresión de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5, conduciendo a disminución de los metabolitos activos (hidroxilados) de CPA e IFA, reduciendo así su actividad citotóxica. En consecuencia, la inhibición farmacológica de HIF-1 α aumenta el efecto antineoplásico de CPA e IFA.

Estos resultados sustentan que la combinación de la inhibición de HIF-1 α y agentes antineoplásicos canónicos constituye una posible alternativa terapéutica para los pacientes con meduloblastoma.

Abstract

Medulloblastomas are amongst the most frequent solid tumors in childhood, and drug resistance remains as the principal cause of conventional treatment failure. Hypoxia and the subsequent activation of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) are considered key factors in modulating drug antitumor effectiveness, but the underlying mechanisms in medulloblastomas have not yet been clearly understood.

The aim of the present work was to determine whether hypoxia induced resistance to cyclophosphamide (CPA) and ifosfamide (IFA) in DAOY medulloblastoma cells, if this mechanism was dependent on HIF-1 α , and involved the modulation of CYP2B6, CYP3A4 and CYP3A5 expression and the control of cell proliferation.

Monolayer cultures of DAOY medulloblastoma cells were exposed for 24 h to moderate (1% O₂) or severe (0.1% O₂) hypoxia, and protein expression was evaluated by mRNA or immunoblotting. Cytotoxicity was studied with the MTT assay and by annexin V/PI staining and flow cytometry. Cell proliferation was determined by the trypan-blue exclusion assay, and cell cycle distribution by propidium iodide staining and flow cytometry.

Our results showed that hypoxia decreased CPA and IFA cytotoxicity in medulloblastoma cells, which correlated with a reduction in the protein levels of CYP2B6, CYP3A4 and CYP3A5, and inhibition of cell proliferation and arrest of the cell cycle in the G1 phase. These responses depended on hypoxia-induced activation of HIF-1 α , as evidenced by chemical inhibition of its transcriptional activity with 2-methoxyestradiol (2-ME), which restored the cytotoxic activity of CPA and IFA and increased apoptosis.

It is concluded that by stimulating HIF-1 α activity, hypoxia down-regulates the expression of CYP2B6, CYP3A4 and CYP3A5, that would in turn lead to decreased conversion of CPA and IFA into their active, hydroxylated, metabolites and thus to diminished cytotoxicity. Accordingly, the pharmacological inhibition of HIF-1 α enhanced CPA and IFA cytotoxic actions.

These results support that the combination of HIF-1 α inhibitors and canonical antineoplastic agents provides a potential therapeutic alternative against medulloblastoma.

1. Introducción

1.1 Tumores pediátricos del sistema nervioso central

En México, el cáncer es la segunda causa de mortalidad en la población infantil entre los 4 y 15 años de edad, estadísticamente solo precedido por los accidentes; representando por lo tanto un problema de salud pública de altas dimensiones en costos y gasto gubernamental (Rivera-Luna et al., 2014; Fajardo-Gutiérrez et al., 2016). La incidencia promedio anual reportada es de 157 casos por cada 1'000,000 habitantes, con un pico máximo entre los 0 y los 4 años, y la menor incidencia entre los 15 y los 18 años. La distribución por género tiene un índice hombres:mujeres de 1.2:1, como se muestra en la Figura 1 (Rivera-Luna et al., 2013, 2014, 2015).

En cuanto a los tipos de tumores, en primer lugar se ubican las leucemias con un 78% del total de los casos; en segundo lugar los linfomas con un 15%, y en tercer lugar, con un 16.2%, los tumores del sistema nervioso central (TSNC), por lo que estas son consideradas los tres principales tipos de neoplasias que afectan a la población pediátrica, como se ilustra en la Figura 2 (Rivera-Luna et al., 2013; Fajardo-Gutiérrez et al., 2016).

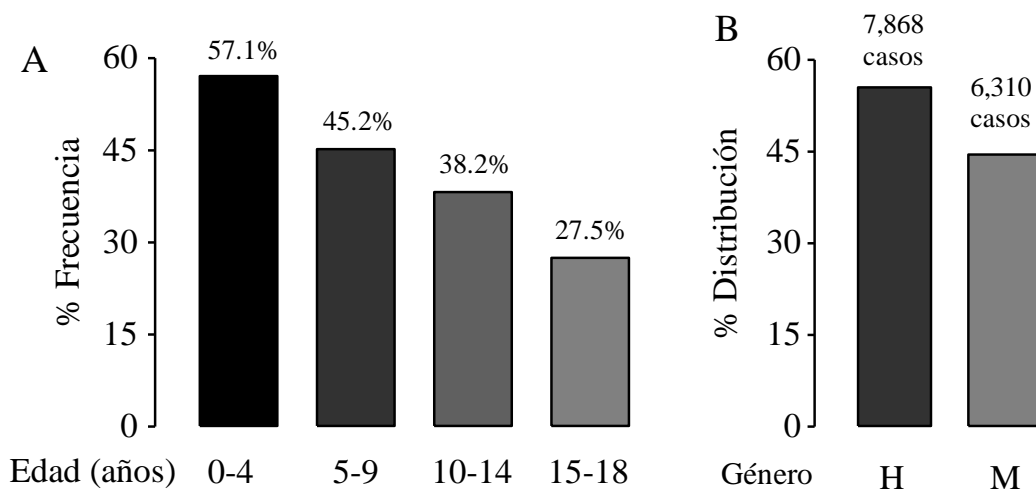


Figura 1. Frecuencia por edad (A) y prevalencia por género (B) de cáncer infantil en México. Adaptado de Rivera-Luna et al., 2015.

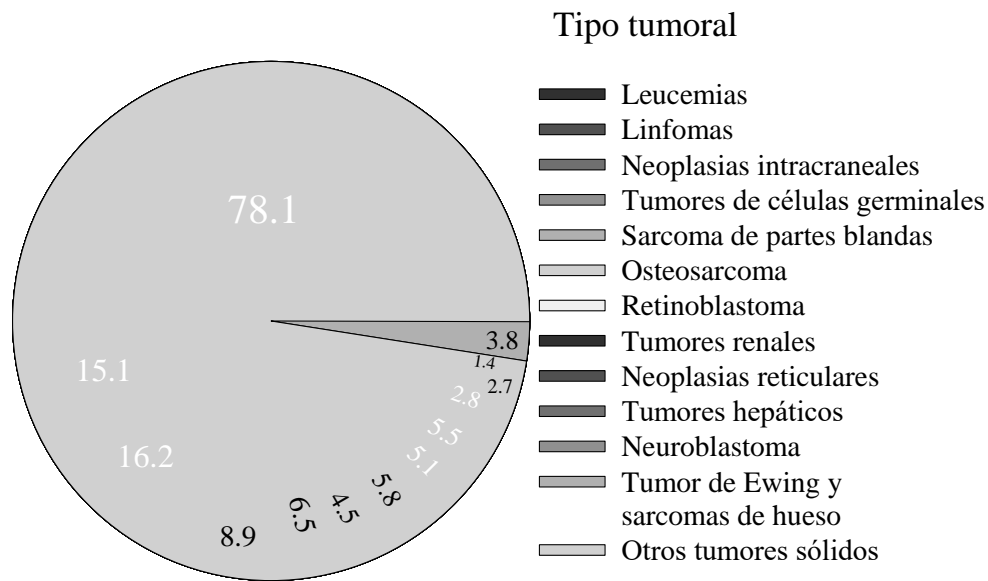


Figura 2. Incidencia del cáncer en niños pacientes del Seguro Popular. La incidencia se expresa por 1,000,000 habitantes por año, agrupada de acuerdo a la Clasificación Internacional de Cáncer Infantil. Adaptado de Rivera-Luna et al., 2015.

Los TSNC intracraneales pediátricos son las neoplasias sólidas más frecuentes en niños de 0 a 18 años, de acuerdo a la información de tres instituciones de salud pública, el Instituto Nacional de Pediatría, el Hospital Infantil de México Federico Gómez y el *Hospital for Sick Children of Toronto*, que considera un total de 2,505 pacientes (Ponce de León et al., 2006). La Figura 3 muestra la distribución de tumores craneales infantiles diagnosticados en estas instituciones. Dentro de los TSNC pediátricos, los astrocitomas, meduloblastomas y craneofaringiomas son los que se reportan en México como más frecuentes. Además, existen diferencias significativas en la tasa de supervivencia a 5 años, siendo de 84% y 29% para los astrocitomas de bajo y alto grado, respectivamente, mientras que para los meduloblastomas se reportan datos muy variados, que van de 40% a 80% (Rutkowski et al. 2005; Araujo et al., 2011).

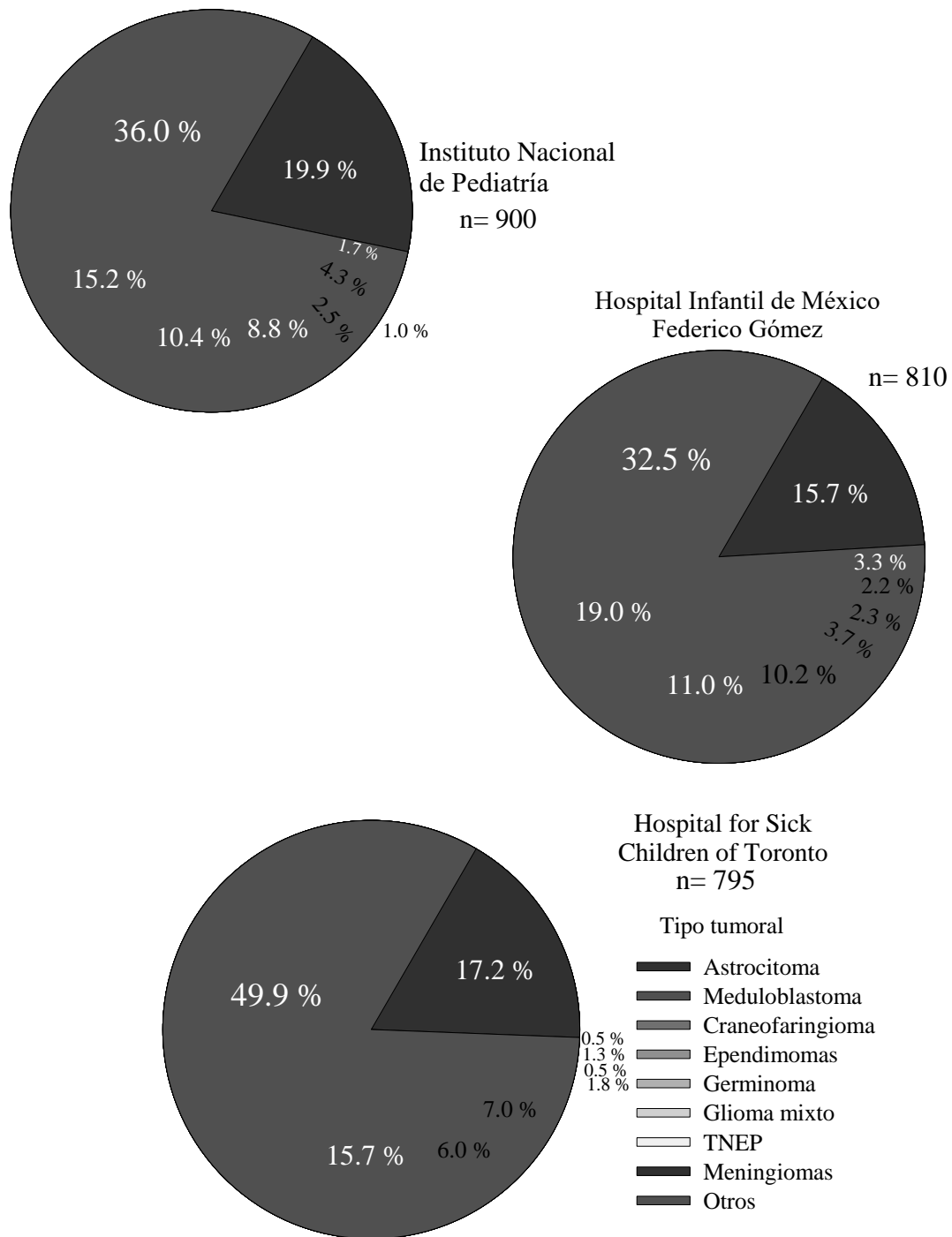


Figura 3. Distribución de los Tumores del Sistema Nervioso Central en el Instituto Nacional Pediatría (A), el Hospital Infantil de México Federico Gómez (B) y *Hospital for Sick Children of Toronto* (C); TNEP, Tumores neuro-ectodérmicos primitivos. Adaptado de Ponce de León et al., 2006.

El tratamiento para la mayoría de estos tumores, incluye combinaciones de cirugía, radioterapia y quimioterapia (Palmer et al., 2007; 2008; Rutkowski et al., 2005; Massimino et al., 2011; 2016). La radioterapia se ha asociado con secuelas a largo plazo como alteraciones motoras, sensoriales endocrinas, cognitivas, déficits neuropsicológicos y conductuales en pacientes menores de 3 años (Mitby et al., 2003; Aarsen et al., 2006; Hazin et al., 2010; Holland, 2013). La eficacia del tratamiento del meduloblastoma es modesta, sobre todo en pacientes de alto riesgo debido a las secuelas a largo plazo, por lo que es importante definir nuevos esquemas de tratamiento que consideren los marcadores moleculares descritos.

1.2 Meduloblastomas

La Organización Mundial de la Salud considera al meduloblastoma dentro de los tumores de tipo embrionario, y de acuerdo a su histopatología incluye las variantes desmoplásico/nodular, meduloblastoma con nodularidad extensa, clásico y anaplásico de células grandes (Taylor et al., 2012; Louis et al. 2016). Actualmente, se han integrado a la clasificación las características moleculares, identificándose 4 subgrupos: 1) WNT (*Wingless signaling pathway*); 2) SHH (*Sonic Hedgehog signaling pathway*); 3) Grupo 3; y 4) Grupo 4. Para cada uno de estos subgrupos se han identificado marcadores transcripcionales y epigenéticos que definen clínicamente a cada paciente. Lo anterior resulta en una gran heterogeneidad de estos tumores no solo en cuanto a su origen, sino también en su progresión, alteraciones genéticas, perfiles de expresión génica y evolución clínica, como se ilustra en la Figura 4 y el Cuadro 1 (Taylor et al., 2012; DeSouza et al., 2014; Cavalli et al., 2017; Northcott et al., 2017).

| Subgroup | | WNT | | SHH | | | | Group 3 | | | Group 4 | | | |
|----------------------|---------------------|----------------|-------|---|--------------|----------------------|--------------|--|----------|--------------------------------|--|----------|--------------------------------|--|
| Subtype | | WNT α | WNT β | SHH α | SHH β | SHH γ | SHH δ | Group 3α | Group 3β | Group 3γ | Group 4α | Group 4β | Group 4γ | |
| Subtype proportion | | | | | | | | | | | | | | |
| Subtype relationship | | | | | | | | | | | | | | |
| Clinical data | Age | | | | | | | | | | | | | |
| | Histology | | | LCA Desmoplastic | Desmoplastic | MBEN Desmoplastic | Desmoplastic | | | | | | | |
| | Metastases | 8.6% | 21.4% | 20% | 33% | 8.9% | 9.4% | 43.4% | 20% | 39.4% | 40% | 40.7% | 38.7% | |
| | Survival at 5 years | 97% | 100% | 69.8% | 67.3% | 88% | 88.5% | 66.2% | 55.8% | 41.9% | 66.8% | 75.4% | 82.5% | |
| Copy number | Broad | 6 ⁻ | | 9q ⁺ , 10q ⁺ , 17p ⁻ | | Balanced genome | | 7 ⁺ , 8 ⁺ , 10 ⁺ , 11 ⁺ , 117q | | | 7q ⁺ , 8p ⁻ , 117q | | | |
| | Focal | | | MYCN amp, GLI2 amp, YAP1 amp | | PTEN loss | | 10q22 ⁻ , 11q23.3 ⁻ | | OTX2 gain, DDX31 loss, MYC amp | | | MYCN amp, CDK6 amp, SNCAIP dup | |
| Other events | | | | TP53 mutations | | | | High GF1/1B expression | | | | | | |

Age (years): 0-3 >3-10 >10-17 >17

Figura 4. Representación de los grupos, subtipos, datos clínicos, número de copias de cromosomas, y otras características meduloblastoma. La edad se clasificó en los grupos: infantil, 0-3 años; niñez, >3-10 años; adolescencia, >10-17 años; y adultos, >17 años. Tomado de Cavalli et al., 2017.

En cuanto a la incidencia de cada uno de los sub-tipos moleculares, el más frecuente es la variante del Grupo 4 desmoplásico (~35%), seguido por la variante SHH (~30%) y del Grupo 3 (~25%), y por último a la variante WNT con ~10% (Kool et al., 2012; Leary y Olson, 2012; Northcott et al., 2012; Zhao et al., 2016; Schwalbe et al., 2017). La vía de señalización SHH contribuye al incremento en la proliferación celular y el crecimiento tumoral del meduloblastoma en distintos modelos celulares (Kieran, 2014; Drozdowicz et al., 2017), y la sobrevivencia a 5 años de este grupo es <50% (Ramaswamy et al., 2016). La clasificación del subtipo y las características moleculares de meduloblastoma han permitido establecer 40 líneas celulares, entre las que se encuentran las del grupo SHH, como las células DAOY y las células UW-228 (Ivanov et al., 2016). Las células DAOY muestran resistencia al etopósido (von Bueren et al., 2011; Othman et al., 2014), la 4-hidroperoxiciclofosfamida (Friedman et al., 1992), el cisplatino (von Bueren et al., 2011; Guerreiro et al., 2011; Wilk et al., 2012; Suryo et al., 2016), la vincristina y la lomustina

(Shinwari et al., 2011), así como a la radiación (Ingram et al., 2013; von Bueren et al., 2011). Por lo anterior, se considera que estas células son un modelo adecuado para evaluar la quimiorresistencia de los meduloblastomas.

Cuadro 1. Características histopatológicas y moleculares del meduloblastoma.

| Características | WNT | SHH | Grupo 3 | Grupo 4 |
|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------|
| Histología | C/raro LCA | D/Nodular | C/LCA | C/LCA |
| Metástasis | Raro M+ | No común M+ | Muy frecuente M+ | Frecuente M+ |
| Diagnóstico | Bueno | Bueno/Intermedio | Pobre | Intermedio |
| Expresión | Vía WNT | Vía SHH | Fotorreceptor/ GABAérgico | Neuronal/ Glut |
| Copias somáticas | - | MYCN (12%) | MYC (17%) | SNCAIP (10%) |
| (6%) | | GLI2 (8%) | PVT1 (12%) | MYCN |
| (5%) | | | OTX2 (8%) | CDK6 |
| SNP | CTNNB1 (91%) | TERT (60%) | SMARCA4 (11%) | KDM6A (13%) |
| | DDX3X (50%) | PTCH1 (46%) | MLL2 (4%) | MLL (5%) |
| | SMARCA4 (26%) | SUFU (24%) | | |
| | MLL2 (13%) | MLL2 (16%) | | |
| | TPS3 (13%) | SMQ (14%) TP53 (13%) | | |
| Eventos | | | | |
| Ganancia | - | 3q | 1q, 7, 17q, 18q | 7, 17q, 18q |
| Pérdida | 6 | 9q, 10q, 14q | 8, 10q, 11, 16p, 17p | 8, 11p, X |

C; Clásico, LCA; anaplásico de células grandes, D; desmoplásico, M+; metástasis, Glut; Glutamatérgico; SNP; polimorfismo de un único nucleótido. Adaptado de Massimino et al., 2016.

1.3 Estadificación, pronóstico y tratamiento de meduloblastoma

El sistema de Chang es utilizado para la estadificación clínico-quirúrgica, siendo la condición de metástasis la que se considera como factor crítico de pronóstico y de tratamiento, incluyendo además otros parámetros como la edad, tamaño de tumor residual post-quirúrgico, variedad histopatológica y porcentaje de células en proliferación (Rivera-Luna et al., 2007; Massimino et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente, los pacientes con meduloblastoma presentan limitada sobrevivencia (~50% a los 5 años), lo que representa un desafío para la terapia actual. Además, la respuesta al tratamiento se ha asociado con el estado nutricional de los pacientes, que determina la tolerancia al esquema completo de quimioterapia (Rutkowski et al., 2005; Ponce de León et al., 2006; Araujo et al., 2011).

En la quimioterapia del meduloblastoma se utilizan diversos fármacos, entre los que se encuentran ciclofosfamida (CPA), ifosfamida (IFA), vincristina, carmustina, metotrexato, procarbazona, arabinósido A, etopósido, lomustina, cisplatino y carboplatino (Packer y Finlay, 1996; Rutkowski et al., 2005; Rossi et al., 2008; Massimino et al., 2011; 2016). Identificar qué mecanismos de resistencia al tratamiento podrían asociarse con una baja sobrevivencia es muy relevante, y entre dichos mecanismos se ubican los relacionados con el transporte celular de fármacos, mutaciones que afectan la función o expresión de genes que codifican proteínas con esta función, así como cambios epigenéticos, por mencionar sólo algunos (Gillies et al., 1999; Höckel y Vaupel, 2001; Trédan et al., 2007). Para los meduloblastomas, una limitada respuesta al tratamiento asociada a resistencia a fármacos como etopósido o temozolomida se ha asociado con altos niveles de expresión de ABCB1 (*ATP-Binding Cassette, Sub-Family B (MDR/TAP), Member 1*), MGMT (*O⁶-metilguanina-DNA-metil-transferasa*) y la proteína anti-apoptótica BCL2 (Othman et al., 2014). La resistencia a topotecán se ha relacionado con un aumento de la expresión de ABCG2 (Morfouace et al., 2015), y la resistencia al tratamiento con vincristina y lomustina se ha asociado con el aumento de la expresión de CTNNB1 (proteína β 1 asociada a cadherina), STK15 (aurora cinasa A) y TRKC (receptor neurotrófico con actividad de cinasa de tirosina

tipo 3) (Shinwari et al., 2011). No obstante, se conoce poco sobre los mecanismos que subyacen la regulación y la manifestación de quimiorresistencia en estos y otros tumores.

1.4 Hipoxia tumoral

Uno de los principales factores que se han asociado con resistencia a fármacos en distintos tipos de tumores sólidos, es la hipoxia. Esta condición se produce en un tumor como resultado del crecimiento en la masa tumoral y una perfusión vascular deficiente y heterogénea, lo que genera un suministro insuficiente de O_2 que compromete las funciones biológicas de las células neoplásicas y las del estroma, generando áreas con bajas presiones parciales de O_2 (ppO_2) en las regiones más alejadas de los vasos sanguíneos, como se ilustra en la Figura 5 ($> 150 \mu m$) (Höckel y Vaupel, 2001; Vaupel, 2004).

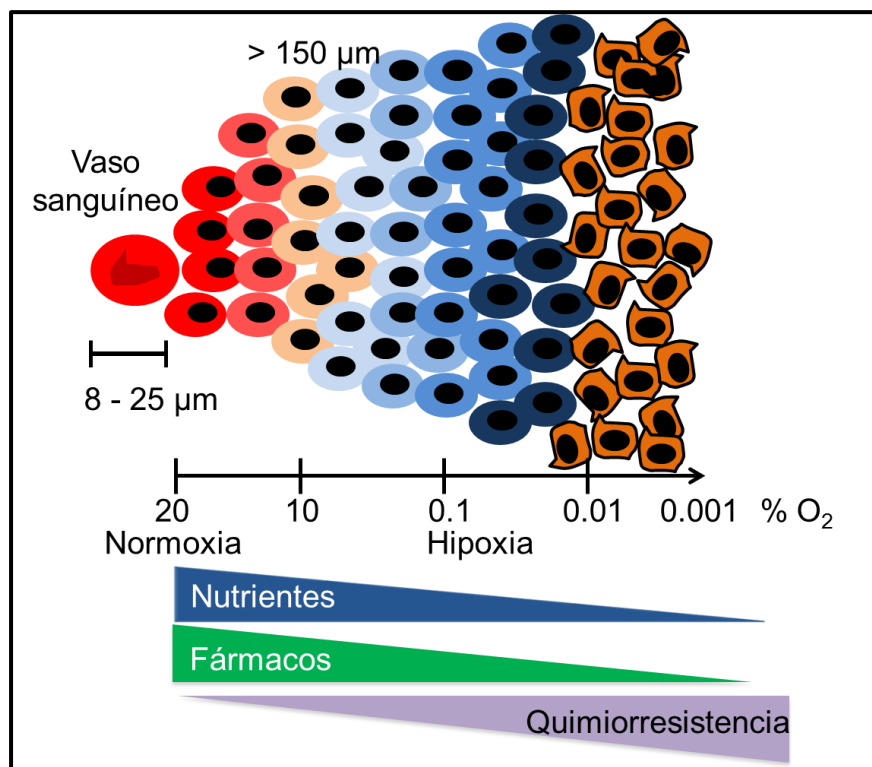


Figura 5. Distribución de nutrientes, fármacos y presión parcial de O_2 (ppO_2 , mm Hg) en células de tumores sólidos. Adaptado de Vaupel, 2004.

Varios tipos de tumores sólidos, como los meduloblastomas y los gliomas, han sido reportados como hipóxicos (Evans et al., 2004; Warnke et al., 2006; McKeown, 2014), y se ha propuesto que la hipoxia induce adaptación de las células tumorales, promoviendo inestabilidad genómica (elevada frecuencia de mutaciones e inhibición de la reparación del daño al DNA, entre otros fenómenos), amplificación génica y reordenamiento cromosómico, inactivación de genes supresores de tumores, regulación de la expresión de diversos genes (entre ellos varios oncogenes), la selección clonal y cambios proteómicos (Höckel y Vaupel, 2001; Vaupel, 2004; Luoto et al., 2013).

Uno de los principales promotores de la adaptación de las células tumorales a la hipoxia es el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), un factor transcripcional heterodimérico formado por dos subunidades: la subunidad α (HIF-1 α), regulada por los niveles de O₂, y la subunidad β , localizada constitutivamente en el núcleo y que no depende de la concentración de O₂ (HIF-1 β ; también conocida como translocador nuclear del receptor de hidrocarburos arilo, ARNT). Ambas subunidades pertenecen a la familia de proteínas bHLH-PAS (Per/Arnt/Sim) (Wang et al., 1995; Jiang et al., 1996).

En condiciones de normoxia, HIF-1 α es degradado por ubiquitinación vía proteosoma 26S por el complejo de von Hippel-Lindau (pVHL)-E3 ligasa (Salceda y Caro, 1997; Kallio et al., 1999; Tanimoto et al., 2000). La unión de HIF-1 α con pVHL se induce por la hidroxilación de las prolinas Pro⁴⁰² y Pro⁵⁶⁴, localizadas en el dominio de degradación dependiente del O₂ (ODD), proceso mediado por las prolil-hidroxilasas (PHD) 1, 2, y 3 (Masson et al., 2001; Appelhoff et al., 2004). Otro mecanismo que controla la actividad de HIF-1 α es la modulación por los dominios de transactivación amino y carboxilo (TAD-N y TAD-C) que reclutan a co-activadores como la proteína de unión p300 al adenovirus E1A (p300), CBP (proteína de unión a CREB, elemento de respuesta a AMPc), las proteínas de la familia de 160 kDa, receptores de hormonas esteroideas (SRC-1/p160) y el factor intermediario 2 (TIF2/p160) (Arany et al., 1996; Carrero et al., 2000; Sang et al., 2002). Cuando el O₂ es limitante, la inhibición de la hidroxilación conduce a la estabilización de HIF-1 α , su acumulación en el citoplasma y posterior translocación al núcleo (Huang et al., 1998; 2002). La activación transcripcional de HIF-1 α depende de la dimerización con HIF-1 β ; posteriormente el complejo HIF-1 α /HIF-1 β se une a los elementos de respuesta a

hipoxia (HRE, 5'-TACGTGCT-3'; Figura 6) en genes blanco, regulando su expresión (Semenza y Wang, 1992). En las células tumorales, HIF-1 α regula la expresión de genes que participan en el control de la angiogénesis, la eritropoyesis, el tono vascular, la matriz extracelular, el metabolismo de glucosa, la proliferación/sobrevivencia, y la apoptosis, entre otros (Semenza, 2003; Ke y Costa, 2006).

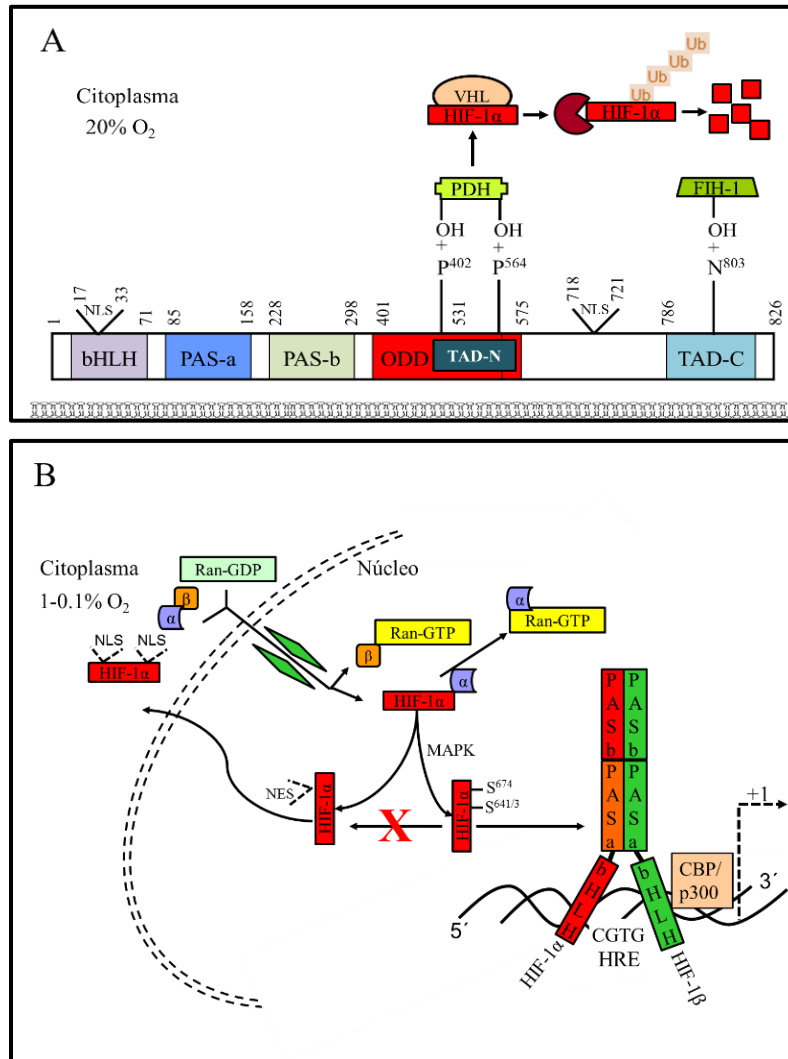


Figura 6. Regulación del Factor Inducible por Hipoxia 1 α (HIF-1 α) por la concentración de O₂. En condiciones de normoxia (20% de O₂, **A**) HIF-1 α es hidroxilado y posteriormente es degradado en el proteasoma, mientras que en condiciones de hipoxia ($\leq 1\%$ de O₂, **B**) mediante la unión a importinas HIF-1 α se trasloca al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 β . El complejo HIF-1 α /HIF-1 β se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE, 5'-TACGTGCT-3') que regulan la transcripción de diferentes genes asociados con la progresión tumoral. Elaborado a partir de Wang et al., 1995; Jiang et al., 1996; Salceda y Caro, 1997; Kallio et al., 1999; y Tanimoto et al., 2000.

1.5 Hipoxia y resistencia tumoral

Se considera que las células de los tumores sólidos sometidas a hipoxia son las que presentan mayor resistencia a la quimioterapia por varias razones, entre ellas (Primeau et al., 2005; Minchinton y Tannock, 2006): 1) los fármacos ejercen toxicidad selectiva en alguna fase del ciclo celular, por lo que las células no proliferantes o que proliferan lentamente son resistentes; 2) algunos fármacos son menos activos en condiciones de hipoxia o en pH extracelular ácido; 3) las células más distantes están expuestas a concentraciones menores de los fármacos, cuya distribución es heterogénea y depende de sus características fisicoquímicas; y 4) cambios en el metabolismo de fármacos. Se ha determinado que la hipoxia promueve la resistencia a fármacos en diferentes tipos tumorales como el cáncer de ovario, de riñón, de mama y linfoma (Strese et al., 2013). En el Cuadro 2 se indica la resistencia al tratamiento dependiente de la expresión de HIF-1 α y distintas vías de señalización en diferentes tipos tumorales.

Las principales fuentes de la acidez extracelular en los tumores sólidos son la generación de H⁺ y la producción de los ácidos láctico y carbónico. Diversas proteínas participan en la homeostasis del pH, como la isoforma 1 del intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE-1), la H⁺-ATPasa vacuolar, los transportadores de monocarboxilatos (MCTs), los co-transportadores Na⁺/HCO₃⁻ (NBC) y Cl⁻/HCO₃⁻ (AE), y la isoforma IX de la anhidrasa carbónica (CA-IX) (Chiche et al., 2010). Las características del acceso a la célula de los fármacos se ajusta al modelo de captura de iones (*ion-trapping*), que predice que la adaptación de las células tumorales incluye la acidificación extracelular, asociada con la quimiorresistencia (Raghunand y Gillies, 2000; Mahoney et al., 2003; Chiche et al., 2010; Wojtkowiak et al., 2011).

Una vez que los fármacos ingresan a las células, su efecto citotóxico se ejerce sobre distintos blancos moleculares (Luqmani, 2005; Zhou y Giannakakou, 2005; Florea y Büsselberg, 2011; Zitvogel et al., 2013; Kakde et al., 2011; Swift y Golsteyn, 2014). Los mecanismos de acción de los fármacos pueden modificarse dependiendo de su transporte, de la expresión de proteínas blanco, mutaciones en genes, la redistribución sub-celular, la interacción fármaco-fármaco o la distribución del ciclo celular, este último efecto es particularmente importante para acción de agentes alquilantes (Chauffert et al., 1998;

Motwani et al., 1999; Green et al., 2001; Beaumont et al., 2016). Por otra parte, la baja biodisponibilidad de O₂ también puede comprometer el metabolismo de fármacos, ya que las enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P450 (CYP) y que catalizan la oxidación, requieren O₂ para su función (Donovan et al., 2010).

1.6 Metabolismo de fármacos por enzimas del citocromo P450 (CYP)

Las enzimas CYP son hemoproteínas catalíticas en las cuales un grupo tiol del amino ácido Cisteína sirve como quinto ligando del átomo de hierro del grupo hemo y el sexto ligando es una molécula de agua. Se han identificado 57 genes humanos y 58 pseudogenes (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>).

Los CYP presentan marcadas diferencias en la afinidad por sus substratos, y contribuyen a la activación o inactivación metabólica de pro-fármacos y fármacos antineoplásicos, respectivamente; función que depende de los niveles de expresión y de la actividad de una o varias isoformas de CYP en el tumor.

Una vez administrados, los fármacos son también metabolizados en el hígado por enzimas de la familia CYP, que intervienen así en la farmacocinética, la farmacodinámica y el efecto citotóxico. Por lo tanto, para la quimioterapia es importante establecer la contribución del tumor y el hígado al metabolismo de los fármacos, (McFadyen et al., 2004; Michael y Doherty, 2005; Rodriguez Antona y IngelmanSundberg, 2006).

Se estima que 15 isoformas de CYP metabolizan el 95% de los fármacos o xenobióticos, y que presentan alta expresión y amplia selectividad de sustratos (Guengerich 2003). En la Figura 7 se presenta la distribución de las isoformas de CYP que participan en el metabolismo de fármacos, carcinógenos, esteroides, pesticidas y otros productos químicos (Guengerich 2003; Zanger y Schwab, 2013).

Cuadro 2. Resistencia al tratamiento dependiente de la expresión de HIF-1 α en tumores.

| Cáncer | Fármaco | Señalización | Referencia |
|---------------|---|-------------------------------|-----------------------|
| Colon | Etopósido | HIF-1 α /Bid/Bax | Erler et al., 2004 |
| Neuroblastoma | Etopósido, vincristina | HIF-1 α | Hussein et al., 2006 |
| Mama | Daunorrubicina, doxorubicina, etopósido, mitoxantrona | HIF-1 α , Senescencia | Sullivan et al., 2008 |
| Mama | Paclitaxel | HIF-1 α /AP-1 | Flamant et al., 2010 |
| Gástrico | 5-fluorouracil (5-FU) cisplatino | HIF-1 α /p53/NF-kB | Rohwer et al., 2010 |
| Glioma | Doxorrubicina survivina | HIF-1 α /BCL-2/ | Kim et al., 2011 |
| Pulmón | Cisplatino | HIF-1 α / Autofagia | Wu et al., 2015 |

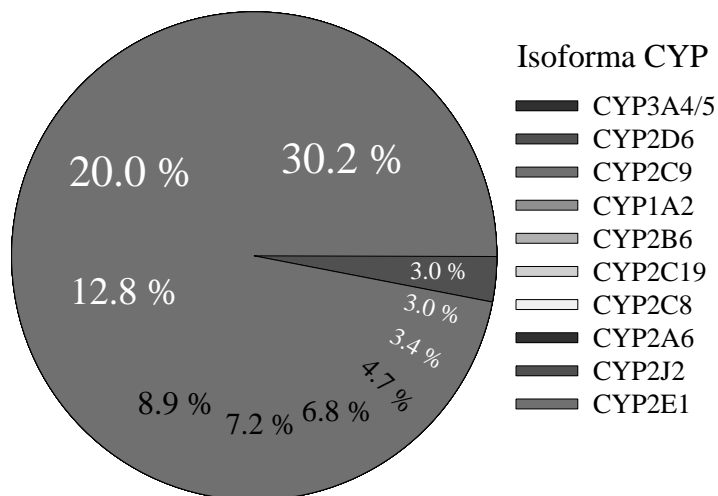


Figura 7. Metabolismo de sustratos por isoformas de CYP. Adaptado de Zanger y Schwab, 2013.

La capacidad de los tumores para metabolizar fármacos es importante para determinar la terapia óptima debido a la activación de pro-fármacos por las células tumorales; sin embargo, un potencial mecanismo de resistencia radica en el aumento de la inactivación de los fármacos por la sobre-expresión de isoformas de CYP (McFadyen et al., 2004; Rodríguez Antona y Ingelman Sundberg, 2006). Ciertas isoformas de CYP se expresan en algunos tumores cerebrales y se ha propuesto que podrían modular la respuesta al tratamiento (Cuadro 3). Sin embargo, no existe información sobre la participación de CYP en la resistencia en meduloblastomas, en particular de las isoformas responsables del metabolismo de fármacos utilizados en su tratamiento.

Cuadro 3. Expresión de CYP en tumores cerebrales.

| | CYP | Referencia |
|--|------------------------------|--|
| Astrocitomas | 1A, 1B1, 2A6, 2C, 2E1, 3A | McFadyen et al., 1997 Murray et al., 1997 |
| Astrocitomas, glioblastomas, oligodendrogliomas | 1B1 | Barnett et al., 2007 |
| Astrocitoma, glioblastoma, meningioma, meningiotelial | 1A1, 1B1 | Stavrinou et al., 2015 |

En modelos *in vitro* e *in vivo* se han evidenciado distintos mecanismos sistémicos o intratumorales posiblemente involucrados en la resistencia a fármacos como la expresión de enzimas de CYP, de la glicoproteína P, y de la difosfato glucuronosiltransferasa, entre otros (Miyoshi et al., 2002; Mathijssen et al., 2004; El-Abaseri et al., 2015). El Cuadro 4 muestra la asociación de la expresión de enzimas de CYP con la resistencia al tratamiento con distintos antineoplásicos. La sobre- o sub-expresión de estas enzimas podrían tener efectos

relevantes en la eficacia de la quimioterapia al favorecer el efecto citotóxico o la resistencia al tratamiento.

Cuadro 4. Expresión de CYP asociada a la quimiorresistencia

| Cáncer | CYP | Antineoplásico | Referencia |
|---|-----------------------|--|--|
| Mama | 3A4, 2C9 2B6 | Docetaxel, Ifosfamida | Miyoshi et al., 2002 Schmidt et al., 2004 |
| Gastrointestinal pulmón, mama, cérvix, cabeza/cuello, adenocarcinoma | 3A4 | Irinotecan | Mathijssen et al., 2004 |
| Hígado | 3A4 | Irinotecan-HCl | Takahata et al., 2008 |
| Mama | 2D6 | Tamoxifen | Rae et al., 2009 |
| Pulmón | 1A1 | Gefitinib | Alfieri et al., 2011 |
| Colon | 2S1, 2W1 | GW-610 | Tan et al., 2011 |
| Hígado | 1A1, 1B1, 2J2, 3A4 | Dasatinib, imatinib, nilotinib, sorafenib, sunitinib | Narjoz et al., 2014 |
| Páncreas | 3A4, 26 | Ácido trans-retinoico | El-Abaseri et al., 2015 |

2. Planteamiento del problema

El meduloblastoma es uno de los principales tumores del sistema nervioso central que afecta la población infantil en México. Actualmente la información sobre los mecanismos de resistencia al tratamiento en este tipo tumoral es escasa. Se ha determinado que la hipoxia es un factor importante en la regulación de la expresión de genes asociado con la resistencia a la quimioterapia; sin embargo, no se ha evaluado el efecto de la hipoxia en el meduloblastoma, en particular en relación a la modulación en el pH extracelular y la expresión de las isoformas de CYP de relevancia para el metabolismo de antineoplásicos.

La expresión de HIF-1 α se ha asociado con la resistencia a la quimioterapia con diferentes antineoplásicos en distintos tipos tumorales, pero no en meduloblastoma. Mediante la activación de HIF-1 α , la hipoxia regula la expresión de genes que favorecen la progresión del tumor. Sin embargo, no se ha determinado el efecto en las proteínas que modulan el pH extracelular, así como en las isoformas de CYP de relevancia para el metabolismo de fármacos como ciclofosfamida e ifosfamida, utilizados en el tratamiento del meduloblastoma. En particular, en esta tesis se planteó analizar el efecto de la hipoxia y HIF-1 α en la expresión de la isoforma IX de la anhidrasa carbónica (CA-IX), la isoforma 4 del transportador de carboxilatos (MCT-4) y la isoforma 1 del intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE-1), proteínas que controlan la acidificación en células tumorales, así como de las isoformas CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 del citocromo P450 que metabolizan a los fármacos alquilantes ciclofosfamida e ifosfamida.

Como modelo experimental se utilizó la línea celular DAOY de meduloblastoma humano, obtenida de un paciente varón de 4 años de edad, y que pertenece al tipo histológico desmoplásico (ver anexo 1).

3. Hipótesis

En condiciones de hipoxia, las isoformas 2B6, 3A4 y 3A5 del citocromo P450, así como los reguladores del pH extracelular CA-IX, MCT-4 y NHE-1 contribuyen a la quimiorresistencia del meduloblastoma al modular el metabolismo y el efecto citotóxico de fármacos antineoplásicos.

4. Objetivo general

Determinar la contribución de las isoformas CYP 2B6, 3A4 y 3A5, y de los reguladores del pH extracelular CA-IX, MCT-4 y NHE-1 a la quimiorresistencia tumoral inducida por hipoxia en células de meduloblastoma humano DAOY.

Objetivos particulares

1. Identificar mediante análisis *in silico* los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en las regiones promotoras de los genes de las isoformas 2B6, 3A4 y 3A5 del citocromo P450.
2. Establecer el efecto de la hipoxia en la citotoxicidad de la ciclofosfamida e ifosfamida en células de meduloblastoma humano DAOY.
3. Determinar el efecto de la hipoxia en la expresión de los reguladores del pH extracelular CA-IX, MCT-4 y NHE-1, y de las isoformas CYP 2B6, 3A4 y 3A5.
4. Determinar si la inhibición farmacológica del HIF-1 α con 2-metoxiestradiol previene el efecto de la hipoxia en la acción citotóxica de la ciclofosfamida y la ifosfamida.

5. Materiales y métodos

5.1 Reactivos

La ciclofosfamida monohidratada (CPA), la ifosfamida (IFA), el MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio bromuro), el yoduro de propidio y la RNAsa-A fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). El 2-Metoxiestradiol (2-ME) fue adquirido de Tocris Bioscience (Abingdon, UK). Los anticuerpos utilizados fueron: policlonal

anti-HIF-1 α de conejo de Novus Biologicals (NB100-449, Littleton, CO, USA); monoclonal

anti-anhidrasa carbónica IX de ratón (CA-IX, sc-365900), policlonal anti-transportador de monocarboxilato 4 de conejo (MCT-4, sc-50329), policlonal anti-intercambiador Na⁺/H⁺ isoforma 1 de cabra (NHE-1, sc-16097), monoclonal anti-antígeno nuclear de células en proliferación de ratón (PCNA, sc-25280), IgG anti-conejo de cabra (sc-2004), e IgG anti-cabra de conejo (sc-2768) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); monoclonal anti-CYP2B6 [(EPR9985(B))]de conejo, policlonal anti-CYP3A4 de conejo (ab1254), policlonal anti-CYP3A5 de conejo (ab22692), monoclonal anti-inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1B de conejo (CDKN1B, ab5456) de Abcam (Cambridge, MA, USA); ratón monoclonal anti- α -actina (GTX80809) y cabra anti ratón IgG (GTX213111-01) de GeneTex (Irvine, CA, USA).

5.2 Identificación *in silico* de elementos de respuesta a hipoxia (HRE)

La secuencia de los genes humanos fue obtenida de la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y fue considerada la región corriente arriba del promotor de+1 hasta -3.5 kb. La predicción de HRE fue realizada con Jaspar Database (<http://jaspar.genereg.net/>) utilizando la matriz de HIF-1 α para vertebrados. Los genes considerados fueron CYP2B6 (ID: 1555), CYP3A4 (ID: 1576), CYP3A5 (ID: 1577), VEGF-A (ID: 7422), y CA-IX (ID: 768), MCT-1 (ID: 6566). La identificación de HRE en VEGF-A y CA-IX fue utilizada como control positivo, y en MCT-1 como control negativo.

5.3 Cultivo de células y establecimiento de las condiciones de hipoxia

Las células DAOY (línea celular de meduloblastoma desmoplásico; HTB-186, ATCC, Manassas, VA, USA) fueron mantenidas en medio de cultivo (*Eagle's Minimal Essential Medium*, EMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS, Biowest; Riverside, CA, USA), 100 U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina (Gibco; Gaithersburg, MD, USA), a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% aire y 5% CO₂.

La condición de normoxia fue considerada como 16.2% debido a que la Ciudad de México está localizada a 2240 m sobre el nivel del mar. La hipoxia fue generada utilizando una cámara hipóxica Bactrox (Shel Labs; Radnor, PA, USA) y la concentración de O₂ fue balanceada con N₂ y CO₂. Al alcanzar una confluencia del 90%, las células fueron incubadas por 24 h en condiciones de hipoxia moderada (1% O₂) o severa (0.1% O₂). Los detalles de los componentes y el funcionamiento de la cámara de hipoxia se presentan en el Anexo 4.

5.4 Inmunodetección por Western blot

Los extractos de proteínas totales, citosólicas y nucleares fueron obtenidos de acuerdo a Jewell et al. (2001), con ligeras modificaciones. Las células DAOY (10⁶ células/botella de 75 cm², T-75) fueron cultivadas en medio EMEM con 10% FBS y antibióticos, y al alcanzar una confluencia de 90% fueron sometidas a condiciones de normoxia e hipoxia por 24 h. Después de la exposición, las células fueron cosechadas con un *cell-scrapper* en 200 µl de solución de lisis (10 mM Tris base, pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl), 0.5% de IGEPAL (Sigma-Aldrich), 1 mM de una mezcla de inhibidores de proteasas (Mini-complete protease inhibitor cocktail; Roche, Mannheim, Germany) y 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich).

Las muestras fueron incubadas por 10 min sobre hielo antes de ser centrifugadas a 20,000 x g por 5 min a 4°C. Las proteínas citosólicas fueron removidas y el botón fue resuspendido

en solución de extracción nuclear (20 mM Hepes, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) e incubadas sobre hielo por 15 min antes de ser agitadas con vórtex y centrifugadas a 20,000 x g por 5 min a 4°C. Los extractos de proteínas totales fueron preparados en 100 µl de solución RIPA (Sigma-Aldrich) y centrifugados a 4,000 x g por 20 min a 4°C. La concentración de proteínas fue determinada por el ensayo de Bradford (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar de referencia.

Las fracciones nucleares (30 µg), citosólicas (30 µg) y extractos totales (30-50 µg) fueron electroforéticamente separadas en geles de acrilamida/bis-acrilamida (8%-12%) con solución concentradora (125mM Tris-HCl, pH 6.8) y de separación (375mM Tris-HCl, pH 8.8). Posteriormente se realizó la transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P, Millipore; Temecula, CA, USA), previamente incubadas por 15 min en metanol. Los geles y las membranas se colocaron antes por 10 min en solución de transferencia (48 mM Tris base, 39 mM glicina, 20% metanol) bajo agitación constante. La transferencia de las membranas se realizó con una cámara semi-húmeda (150 volts, 15 Amperios), con diferentes tiempos de transferencia: 30 min para α -actina, PCNA y CDKN1B; 1 h para las isoformas de CYP, CA-IX y MCT-4; y 2 h para HIF-1 α . La unión inespecífica se bloqueó con leche descremada (5%) en solución TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl y 0.1% Tween-20) a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios: conejo HIF-1 α policlonal (dilución 1:2,000), ratón PCNA monoclonal (1:1,000), ratón CA-IX monoclonal (1:200), conejo MCT-4 monoclonal (1:200), cabra NHE-1 policlonal (1:100), conejo CYP2B6 monoclonal (1:2,000), conejo CYP3A4 policlonal (1:3,000), CYP3A5 policlonal (1:2,000), ratón CDKN1B monoclonal (1:200) y ratón α -actina monoclonal (1:10,000).

Se retiró el primer anticuerpo y las membranas fueron lavadas varias veces con TBS por 5 min para cada lavado con agitación constante, y después incubadas por 1 h con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano: cabra anti ratón IgG (1:3,000), cabra anti conejo IgG (1:3,000) o conejo anti cabra IgG (1:5,000). La señal de las proteínas fue detectada por quimioluminiscencia utilizando ImmobilonTM Western HRP substrate (Millipore; Temecula, CA, USA), las imágenes fueron capturadas con Fluor

S Max MultiImage (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) y el análisis fue realizado con Quantity One 1-D Analysis Software Version 4.4.1 (Bio-Rad). La cantidad de proteína fue expresada como unidades de densidad óptica relativa (R.O.D.), normalizada con la expresión de α -actina como control interno de los extractos citosólicos y totales, y la expresión de PCNA fue utilizada para normalizar la detección de HIF-1 α en extractos nucleares.

5.5 Inmunocitoquímica

Las células DAOY fueron sembradas en placas Lab-Tek (10^4 células/pozo). Después de 24 h el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco y las células fueron incubadas en normoxia o hipoxia por 24 h, antes de ser fijadas con paraformaldehído (4%, v/v, en PBS) por 20 min y después lavadas dos veces más con PBS. La exposición del antígeno se obtuvo incubando en una solución de citrato de sodio (10 mM, pH 6.0) por 15 min a 95°C y después se lavó tres veces con PBS. Las peroxidasas endógenas fueron bloqueadas con H₂O₂ (3%) en metanol por 15 min y luego se lavó con H₂O destilada y PBS por 5 min. La unión inespecífica fue bloqueada con suero normal de cerdo (2%) en PBS a temperatura ambiente por 1 h. Las células fueron incubadas toda la noche en solución de bloqueo con anticuerpo anti-HIF-1 α de conejo (1:1,000 dilución) en una cámara húmeda. Se utilizaron *Biotinylated link universal secondary antibody* (Dako; Carpinteria, CA, USA) y estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano como anticuerpos secundarios.

La reacción colorimétrica fue generada por adición del sustrato diaminobenzidina (1:1,000 dilución) por 1 min y se contrainó con hematoxilina. Finalmente, las células fueron deshidratadas en 70%, 90% y 100% etanol, etanol-xileno (1:1) y xileno (100%), y se cubrieron con resina. Las imágenes fueron obtenidas con Image-Pro Plus (Aperio, San Diego, CA) con un microscopio Olympus BX-40 (Feasterville, PA, USA).

5.6 Extracción de RNA total y qRT-PCR

Las células DAOY (10^6 células/botella T-75) fueron sembradas en medio EMEM con 10% de FBS y antibióticos, y cuando alcanzaron una confluencia de 90% fueron sometidas a condiciones de normoxia e hipoxia por 24 h. La extracción de RNA total se realizó con el método de TriZol (Ambion; Austin, TX, USA) de acuerdo con las instrucciones. La

cantidad y calidad del RNA fueron determinadas espectrofotométricamente por la relación de absorbancia a 260/280 nm, y la integridad fue evaluada por la detección de las subunidades ribosomales de 28S y 18S en geles de agarosa al 1.5%. Se utilizaron 3 µg de RNA total para la síntesis de cDNA utilizando Oligo-(dT)₂₀ en reacción de transcripción reversa con SuperScrip[®] III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones. Las reacciones de tiempo real fueron realizadas a 65°C por 5 min, y posteriormente las muestras fueron incubadas por 1 min sobre hielo, seguido por incubación por 50 min a 50°C y 5 min a 85°C (GeneAmp PCR System 9700 Block Thermal Cycler, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta ser utilizadas.

El ensayo de q-PCR fue realizado con Pre-Developed TaqMan[®] Assay Reagent (Applied Biosystems). La reacción de 15 µl incluyó 3 µl de cDNA, 0.75 µl de TaqMan Gene Expression Assay(20X) de CYP2B6, CYP3A4 o CYP3A5, 7.5 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (2X), ajustando el volumen con agua libre de RNAsas (3.75 µl). El ciclo térmico estándar fue realizado con *StepOne real-time PCR System* (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C y 40 ciclos (15 s a 95°C), y 1 min a 60 C. La expresión de genes fue determinada por el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando el gen TBP (proteína de unión a caja TATA) como gen de expresión constitutiva (*housekeeping*; Livak y Schmittgen, 2001).

5.7 Ensayo de exclusión de azul de tripán

Las células DAOY fueron sembradas en placas de 6 pozos (2×10^5 células/pozo) y después de 24 h el medio de cultivo fue remplazado con medio fresco para ser incubadas en normoxia o hipoxia por 24 h. Al concluir la exposición, las células fueron lavadas 2 veces con 5 ml de PBS. Las células fueron incubadas con 0.25% tripsina/0.53 mM EDTA (400 µl) por 5 min y la acción de la enzima se detuvo con 2 ml de medio EMEM suplementado. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se mezclaron 0.5 ml de una solución de azul de tripán (0.4%), 0.3 ml de PBS y 0.2 ml de la suspensión celular (dilución 1:5), se agitó vigorosamente y se incubó por 10 min antes del conteo celular en una cámara de Neubauer.

5.8 Preparación de las soluciones de fármacos

Los fármacos ciclofosfamida (CPA) e ifosfamida (IFA) fueron disueltos en medio de cultivo EMEM a una concentración final de 100 mM. El 2-metoxiestradiol (2-ME) fue disuelto en DMSO (*stock* de 5 mM) y la solución fue almacenada a -20°C hasta su uso. Todas las diluciones fueron realizadas a las concentraciones deseadas momentos antes de ser utilizadas. La concentración final de DMSO fue de $\leq 0.1\%$ para evitar efectos adversos en las células.

5.9 Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Las células DAOY fueron sembradas en placas de 96 pozos (5×10^3 células/pozo) e incubadas por 24 h a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% aire y 5% CO₂. Los fármacos CPA o IFA fueron adicionados en un volumen final de 200 μ l de medio EMEM suplementado (concentraciones finales 0.1-100 mM) y se incubó bajo condiciones de normoxia e hipoxia por 24 h. Cuando fue requerido, el 2-ME fue adicionado a concentraciones finales de 0-40 μ M. Los grupos control fueron incubados con vehículo (DMSO). Tres h antes de concluir la exposición de 48 h, se adicionaron 10 μ l de solución de MTT (5 mg/ml) a cada pozo. Finalmente, el medio fue retirado y se agregaron 100 μ l de solución de lisis (4 mM HCl, 0.1% IGEPAL en isopropanol) a cada pozo. Las placas fueron agitadas por 15 min a temperatura ambiente antes de determinar la absorbancia a 560 nm (Modulus Microplate Turner Biosystems; Sunnyvale, CA, USA).

5.10 Análisis del ciclo celular

La distribución del ciclo celular fue analizada de acuerdo a Box y Demetrick (2004), con modificaciones menores. Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos (2×10^5 células/pozo) y después de 24 h el medio fue reemplazado con medio fresco antes de ser incubadas en normoxia e hipoxia por 24 h adicionales. El medio fue removido y las células fueron lavadas 2 veces con PBS antes de ser tripsinizadas como se describe arriba. La suspensión celular fue centrifugada (200xg, 5 min, 4°C) y el botón fue resuspendido en 1 ml de PBS con 1 mM EDTA. Etanol absoluto (2.3 ml, -20°C) fue agregado gota a gota y la suspensión de células fue conservada por una noche a -20°C. Las células fueron

centrifugadas (200 x g, 5 min) y el botón resuspendido en 500 µl de solución de extracción de DNA (0.2%, v/v, de Tritón X-100 en PBS) para incubar por 10 min a temperatura ambiente. Las células fueron centrifugadas a 200xg por 5 min a 4°C y el botón fue resuspendido en 200 µl de solución de RNAsa-A (1 mg/ml), incubado por 10 min a temperatura ambiente antes de centrifugar a 200xg por 5 min. Posteriormente, las células se resuspendieron en 500 µl de PBS conteniendo 15 µl de yoduro de propidio (1 mg/ml) y se incubaron por 50 min a temperatura ambiente en la oscuridad. La suspensión se centrifugó a 200xg (5 min, 4°C) y el botón se resuspendió en 400 µl de PBS. La citometría de flujo fue realizada con el equipo BD LSRFortessa (BD Biosciences; San Jose, CA, USA) y el análisis del ciclo celular fue realizada con el programa ModFit LT (Topsham, ME, USA).

5.11 Ensayo de apoptosis

Las células DAOY fueron cultivadas por 24 h en placas de 6 pozos (2x10⁵ células/pozo) antes de ser incubadas por 24 h con CPA e IFA (concentración inhibitorias al 50%, determinadas previamente) en ausencia o en presencia de 2-ME (5 µM). El medio de cultivo fue retirado y las células fueron lavadas 2 veces con 5 ml de PBS antes de ser tripsinizadas. Después, las células se centrifugaron a 200xg (5 min, 4°C) y el botón se resuspendió en 1 ml de PBS con 1 mM de EDTA. La fracción de células en apoptosis fue evaluada por Anexina V/yoduro de propidio de acuerdo al protocolo del estuche Annexin V apoptosis detection Kit FITC (eBiosciences; Carlsbad, CA, USA). Para la citometría de flujo se utilizó el equipo BD LSRFortessa y la apoptosis fue analizada con el programa Cyflogic (Turku, Finland).

5.12 Determinación del pH en el medio extracelular

Las células DAOY se sembraron en placas de 6 pozos (2x10⁵ células/pozo). Después de 24 h el medio de cultivo fue remplazado por 2 ml de medio fresco para incubar en normoxia o hipoxia por 24 h adicionales. Cuando se requirió se adicionó 2-ME o DMSO (vehículo). El medio fue removido, colocado en tubos de vidrio y el pH fue determinado con un potenciómetro (Benchtop pH meter Orion 3-star; Thermo Scientific; Waltham, MA, USA).

5.13 Efecto de la combinación de fármacos

El efecto citotóxico de CPA e IFA en combinación con 2-ME fue determinado por el Índice de Resistencia (RI), calculado con la fórmula: $RI = Se (1*2) / So (1+2)$, donde la sobrevivencia experimental (Se) es el producto de la sobrevivencia observada en presencia del fármaco 1 y la sobrevivencia observada con el fármaco 2, y la sobrevivencia observada (So) corresponde a la sobrevivencia en presencia de la combinación de los fármacos 1 y 2. Un valor de $RI = 1$ indica ausencia de efecto, valores de $RI > 1$ indican aditividad y valores de $RI > 2$ indican un efecto sinérgico (Longley et al. 2004).

5.14 Análisis estadístico

Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar (SEM). El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA). Los datos fueron comparados con análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de Tukey o Dunnett, o con ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni. Los valores de probabilidad (P) < 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

6. Resultados.

6.1 Predicción de elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en genes de CYP.

Las células tumorales necesitan adaptarse a los cambios en el suministro de O₂, lo que requiere la regulación de una batería de genes que favorezcan su progresión por medio de la expresión de HIF-1 α (Semenza, 2003; Ke y Costa, 2006).

En este trabajo se identificaron secuencias HRE en la región del promotor (+1 a -3.5 kb) de los genes VEGF-A y CA-IX, utilizados como controles positivos ya que previamente se han identificado en ellos HREs en la región del promotor, regulados por la expresión del factor transcripcional HIF-1 α en condiciones de hipoxia. Por ejemplo, Kimura et al. (2000) identificó para VEGF-A una secuencia HRE en la posición -975 a -970 pb y Kaluz et al. (2009) identificó para CA-IX una secuencia HRE en la posición -10 a -3 pb. La isoforma 1 del transportador de monocarboxilato (MCT-1) fue utilizada como control negativo, dado que su expresión no es regulada por HIF-1 α en condiciones de hipoxia (Shimoda et al., 2006).

En esta tesis se identificaron HRE en los genes *CYP2B6*, *CYP3A4* y *CYP3A5* (Cuadro 5). Para el gen *CYP2B6* se identificaron dos secuencias HRE en las posiciones -971 a -965 pb y -2905 a -2899 pb; para el gen *CYP3A4* se identificaron dos secuencias HRE en las posiciones -3215 a -3208 pb y -3496 a -3490; y para el gen *CYP3A5* se identificó una secuencia HRE en la posición -3296 a -3290 pb. En todos los casos se consideraron únicamente las secuencias con puntaje > 9, indicativo de una alta probabilidad de funcionalidad *in vitro* o *in vivo*. La predicción de secuencias HRE en la región del promotor de estos genes sugiere que su expresión podría ser regulada por la expresión de HIF-1 α en condiciones de hipoxia.

6.2 Hipoxia y respuesta celular: activación de HIF-1 α

Un tumor sólido presenta gradientes de concentraciones bajas de O₂, y para evaluar las posibles diferencias en la estabilización de la proteína de HIF-1 α en respuesta a las variaciones de O₂, en primera instancia se expusieron a las células DAOY de

meduloblastoma a condiciones de hipoxia y se determinó la expresión de HIF-1 α por *Western blot* e inmunocitoquímica.

Cuadro 5. Predicción de HRE en genes de CYP

| Gen | Secuencia | Posición (pb) | Puntaje ^c |
|--------|----------------|---------------|----------------------|
| VEGF | 5'-agACGTGt-3' | -512 a -505 | 9.6 |
| | 5'-atACGTGc-3' | -977 a -970 | 9.0 |
| CA-IX | 5'-atACGTGc-3' | -10 a -3 | 11.1 |
| MCT-1 | 5'-gAGCGTGa-3' | -1129 a -1122 | 6.6 |
| CYP2B6 | 5'-cACGTGa-3' | -971 a -965 | 9.6 |
| | 5'-gACGTGa-3' | -2905 a -2899 | 9.0 |
| CYP3A4 | 5'-gACGTGt-3' | -3215 a -3208 | 9.6 |
| | 5'-gACGTGt-3' | -3496 a -3490 | 9.6 |
| CYP3A5 | 5'-gACGTCCg-3' | -3296 a -3290 | 9.6 |

Para la predicción de elementos de respuesta a hipoxia (HRE, 5'-CACGTC-3') se utilizó la matriz HIF-1A:ARNT para *Homo sapiens* de Jaspas Database. Los valores de puntaje ≥ 9.0 indican secuencias con alta probabilidad de funcionalidad *in vivo* y con un umbral relativo del 85% de precisión de la secuencia. Código de las proteínas en NCBI: CYP2B6 (ID: 1555), CYP3A4 (ID: 1576), CYP3A5 (ID: 1577), VEGF-A (ID: 7422), CA-IX (ID: 768), MCT-1 (ID: 6566).

La hipoxia favorece la estabilización de HIF-1 α y su posterior translocación al núcleo, por lo que se evaluó la expresión de la proteína de HIF-1 α a nivel citosólico y nuclear por *Western blot* en células expuestas a hipoxia (1% y 0.1% O₂) por 24 h. En la condición de 1% O₂, la expresión de HIF-1 α en el núcleo aumentó significativamente (540 \pm 50%), mientras en la condición de 0.1% O₂ aumentó a 590 \pm 70%. De manera similar, la expresión de la proteína de HIF-1 α en el citosol aumentó a 350 \pm 50% y 320 \pm 70% en las condiciones de 1% y 0.1% O₂, respectivamente, en comparación con la condición de

normoxia (Figura 8). Cabe destacar que el aumento en expresión de HIF-1 α , tanto nuclear como citosólica, no difiere en las dos condiciones de hipoxia.

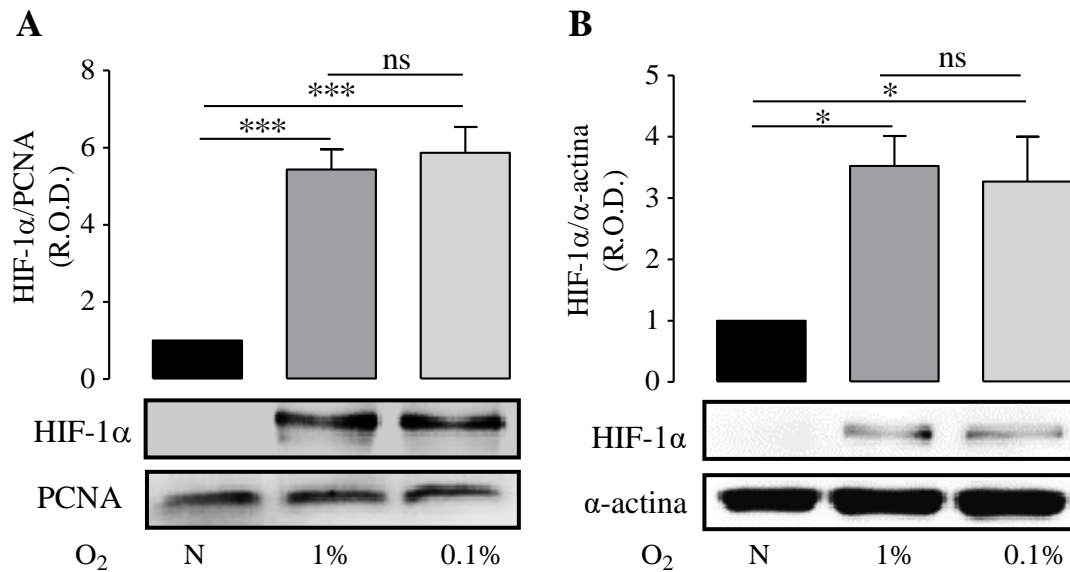


Figura 8. Efecto de la hipoxia en la expresión de HIF-1 α en extractos nucleares y citosólicos en células de meduloblastoma humano DAOY. Las células fueron incubadas en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂) por 24 h. **A.** Extractos nucleares. Se muestra un *blot* representativo. **B.** Extractos citosólicos. Se muestra un *blot* representativo. Para ambos paneles, las gráficas muestran el análisis de la densidad óptica relativa (R.O.D.) de 4 experimentos independientes (promedio \pm SEM). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; ns, sin diferencia estadísticamente significativa; el análisis estadístico fue realizado con ANOVA de una vía y la prueba de Tukey.

La expresión de HIF-1 α en respuesta a la hipoxia fue evaluada también por inmunocitoquímica (Figura 9). El número de células con núcleo inmunorreactivo a HIF-1 α aumentó de $1.9 \pm 1.5\%$ (normoxia) a $61.5 \pm 4.8\%$ y $67.5 \pm 5.2\%$ en las condiciones de 0.1% O₂ y 0.1% O₂, respectivamente, sin diferencia significativa entre ambas condiciones de hipoxia. Para la inmunoreactividad a HIF-1 α citosólica, la condición de 1% O₂ aumentó el número de células positivas de $7.5 \pm 3.7\%$ (normoxia) a $83.9 \pm 5.1\%$ y la condición de 0.1% O₂ a $78.5 \pm 2.9\%$, sin diferencia significativa entre ambas condiciones de hipoxia

(Figura 10). Estos resultados sugieren que la exposición a hipoxia por 24 h induce la expresión de HIF-1 α en células DAOY.

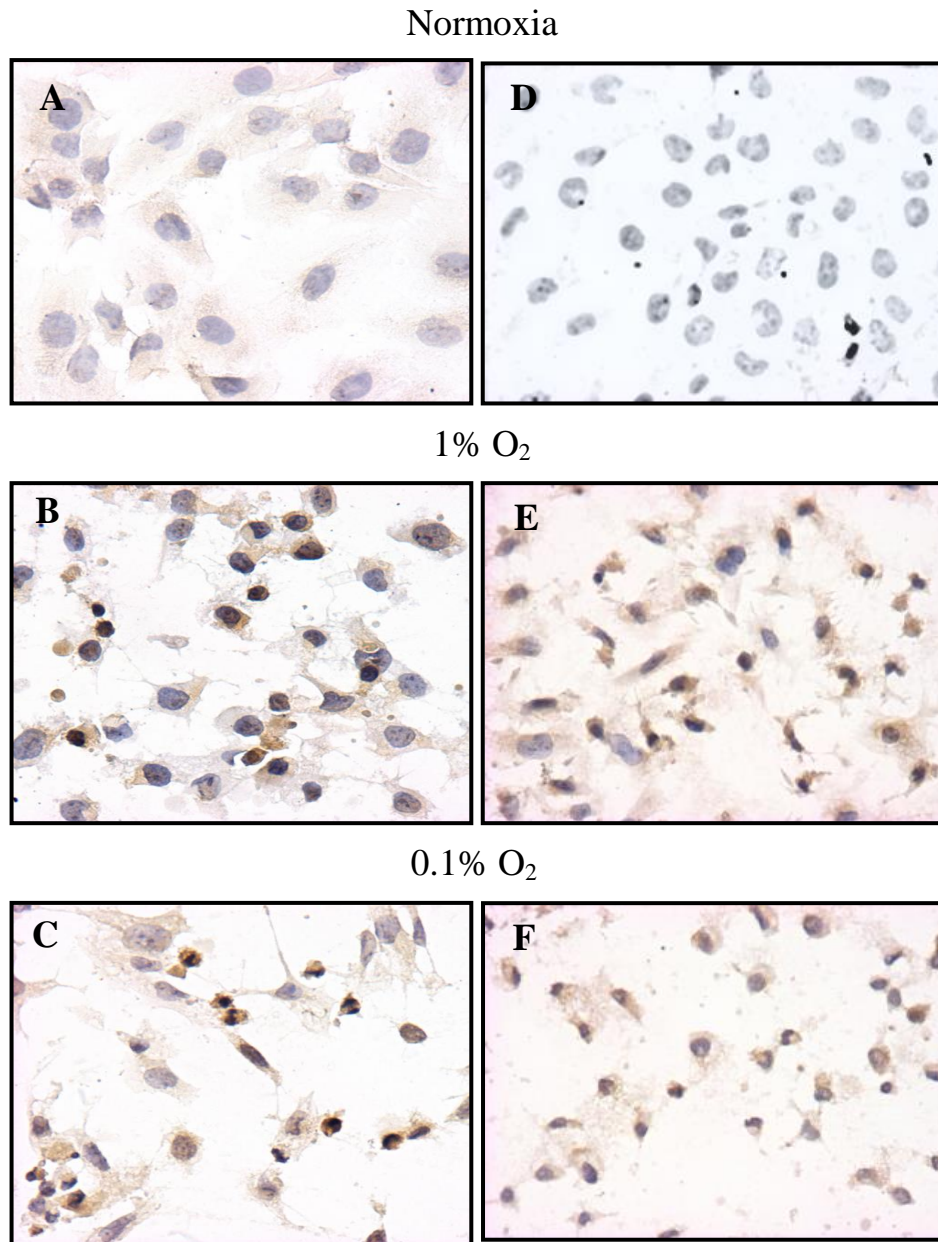


Figura 9. Inmunorreactividad a HIF-1 α en el núcleo de células DAOY (A, B y C) y en el núcleo y citoplasma celulares (D, E, F) en respuesta a la hipoxia. Después de 24 h en normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂), las células fueron incubadas con un anticuerpo contra HIF-1 α . Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

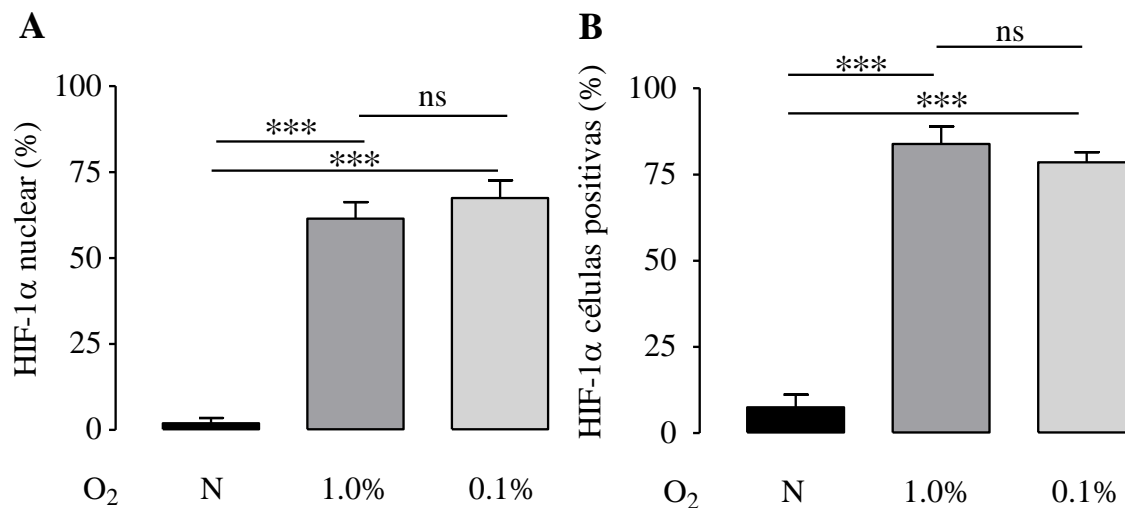


Figura 10. Análisis de la inmunorreactividad a HIF-1 α en respuesta a la hipoxia. **A.** Inmunorreactividad nuclear. **B.** Inmunorreactividad en el núcleo y citoplasma celulares. Después de la incubación por 24 h en normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂), las células fueron incubadas con un anticuerpo contra HIF-1 α . Los valores son el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. *** P < 0.001; ns, sin diferencia estadísticamente significativa; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

6.3 Efecto de la hipoxia en el pH extracelular en cultivos de células DAOY

La activación por hipoxia de la vía de señalización de HIF-1 α mantiene la regulación de distintos genes blanco, incluyendo al gen que codifica la CA-IX, enzima que participa en la modulación del pH extracelular, y es por lo tanto considerada un biomarcador asociado a la baja sobrevivencia de los pacientes con TSNC (Warnke et al., 2006; Chiche et al., 2010; Nordfors et al., 2010).

En consecuencia, se evaluaron los posibles cambios en el pH en condiciones de hipoxia. El pH del medio de cultivo (24 h) de las células en normoxia fue 7.33 ± 0.04 y disminuyó

significativamente en condiciones de 1% y 0.1% de O₂ a 6.8 ± 0.1 y 6.7 ± 0.1 , respectivamente (Figura 11). Los cambios de pH no resultaron diferentes entre ambas condiciones de hipoxia. Estos resultados indican que la hipoxia promueve la acidificación del medio extracelular.

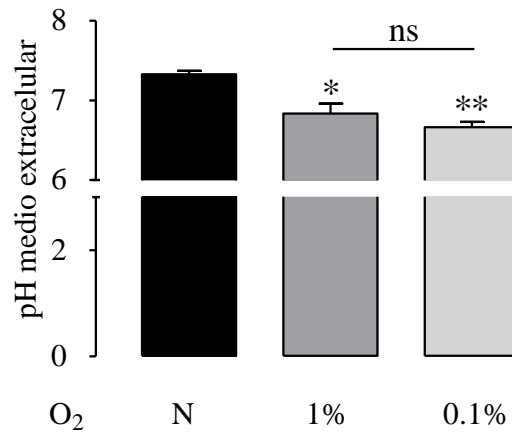


Figura 11. Efecto de la hipoxia en el pH extracelular. Después de 24 h de incubación en normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂), se determinó el pH en el medio de cultivo. Los valores son el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto a normoxia; ns, sin diferencia estadísticamente significativa; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

6.4 Efecto de la hipoxia en la expresión de CA-IX, MCT-4 y NHE-1

Los resultados anteriores indicaron que la hipoxia promueve la acidificación del pH extracelular, posiblemente al modificar la expresión de proteínas reguladoras como CA-IX, MCT-4 y NHE-1. La hipoxia regula la expresión de CA-IX ya que su gen posee una secuencia HRE en la posición -10 a -3 pb (Kaluz et al., 2009). CA-IX es considerada una proteína “gemela” con dos isoformas, una transmembranal con dos bandas de 54 y 58 kDa (reconocida específicamente por el anticuerpo utilizado en este trabajo), y una segunda isoforma soluble, también con dos bandas de 50 y 54 kDa (Závada et al., 2003).

La Figura 12 muestra que la expresión de la CA-IX transmembranal aumentó 18.9 ± 4.7 y 21.9 ± 7.0 veces en las condiciones de 1% y 0.1% de O₂, respectivamente, sin diferencia entre ambas condiciones de hipoxia.

Para MCT-4, en el que se identificaron varias secuencias de HRE en la región del promotor del gen (posiciones -1290 a -1285 pb, -511 a -506 pb, -88 a -83 pb, y -75 a -70 pb) con los dos primeros HRE como responsables de la respuesta a hipoxia (Ullah et al., 2006), su expresión también aumentó de manera significativa en condiciones de hipoxia (1% O₂, $250 \pm 60\%$; 0.1% O₂, $270 \pm 30\%$) con respecto a la condición de normoxia, sin diferencia entre ambas condiciones de hipoxia.

Se ha reportado que la hipoxia induce la expresión de NHE-1 llevando a la alcalinización del pH intracelular en células musculares de la arteria pulmonar (Rios et al., 2005; Shimoda et al., 2006). Sin embargo, en las células DAOY la hipoxia (1% O₂ o 0.1% O₂, 24 h) no modificó la expresión de NHE-1.

En conjunto, los resultados anteriores indican que en las células DAOY la expresión de CA-IX y MCT-4 podrían contribuir a la acidificación del pH extracelular en condiciones de hipoxia, sin participación del NHE-1.

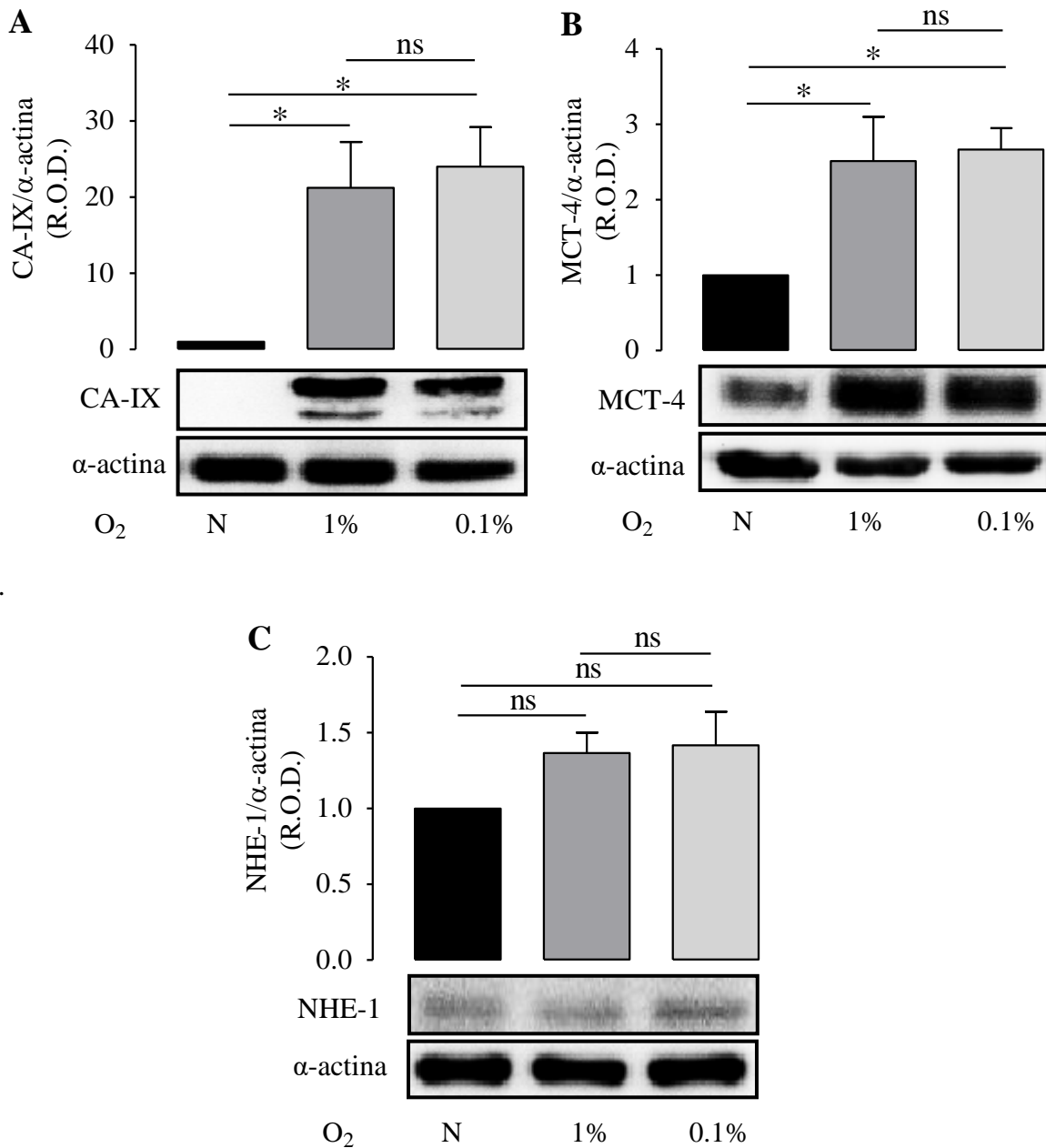


Figura12. Efecto de la hipoxia en la expresión de CA-IX, MCT-4 y NHE-1 por células DAOY. Las células fueron incubadas en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂) por 24 h. Se muestra un *blot* representativo. Las gráficas muestran el análisis de la densidad óptica relativa (R.O.D.) de 4 experimentos independientes

(promedio \pm SEM). * $P < 0.05$; ns, sin diferencia estadísticamente significativa; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

6.5 Efecto de la hipoxia en la citotoxicidad de ciclofosfamida (CPA) e ifosfamida (IFA)

Los resultados previamente mostrados indican que la hipoxia aumenta la expresión de HIF-1 α por células DAOY, y distintos estudios han mostrado que este factor transcripcional está asociado con la quimiorresistencia en distintos tipos de tumores sólidos, en los que HIF-1 α regula la expresión (sub- o sobre-expresión) de genes que participan en vías de señalización que favorecen la progresión de las células tumorales y la evasión de los mecanismos de muerte celular (Primeau et al., 2005; Minchinton y Tannock, 2006; Strese et al., 2013).

En México, el protocolo del tratamiento de meduloblastoma incluye a la CPA, vincristina y cisplatino para pacientes de riesgo estándar (> 3 años) y etopósido, IFA y carboplatino para los pacientes de alto riesgo (≤ 3 años edad, Rivera-Luna et al., 2007). Por lo tanto, se determinó el efecto de la hipoxia en la citotoxicidad de CPA e IFA en células DAOY bajo condiciones de hipoxia. La concentración inhibitoria media (IC_{50}) para CPA e IFA en condiciones de normoxia fue 19 y 15 mM, respectivamente. Para CPA este valor aumentó 1.9 y 2.0 veces en las células incubadas con 1% o 0.1 de O_2 , respectivamente, mientras que para IFA el valor aumentó 1.5 y 3.2 veces (Figura 13 y Cuadro 6). Estos datos indican una disminución en el efecto citotóxico de ambos compuestos antineoplásicos en condiciones de hipoxia.

En células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 el valor de IC_{50} para CPA fue 10 y 12.5 mM, respectivamente (Singh et al., 2009); en células de cáncer de próstata (AHH-1) correspondió a 4.1 mM (Zhou et al., 2000); y en células de cáncer de ovario (OVTOKO) se determinó una IC_{50} de 0.2 mM (Ohta et al., 2001). Para 4-OH-ciclofosfamida se determinó una IC_{50} de 0.007 mM en células de leucemia Jurkat (Pawlak et al., 2014). Por otra parte, para la ifosfamida el valor de IC_{50} para células de cáncer de cérvix (HeLa) fue 6.5 mM (Istomin et al., 2008) y para células de gliosarcoma (9L) 0.5 mM (Storme et al., 2009). Para

4-OH-ifosfamida los valores en células de cáncer de mama MCF-7, MX1 y S117 fueron 0.0004, 0.01 y 0.025 mM, respectivamente (Brüggeman et al., 1997; Ricotti et al., 2000).

Los antineoplásicos CPA e IFA tienen mecanismos de acción semejantes y requieren de activación metabólica para ejercer su efecto citotóxico; sin embargo, presentan diferencias menores en su efecto bajo condiciones de hipoxia. Por ejemplo, para CPA no se observa diferencia entre 1% y 0.1% de O₂, mientras que para IFA el valor de IC₅₀ fue estadísticamente mayor para 0.1% de O₂. En conjunto, los resultados descritos indican que la hipoxia promueve la resistencia al tratamiento con CPA e IFA en células DAOY de meduloblastoma humano.

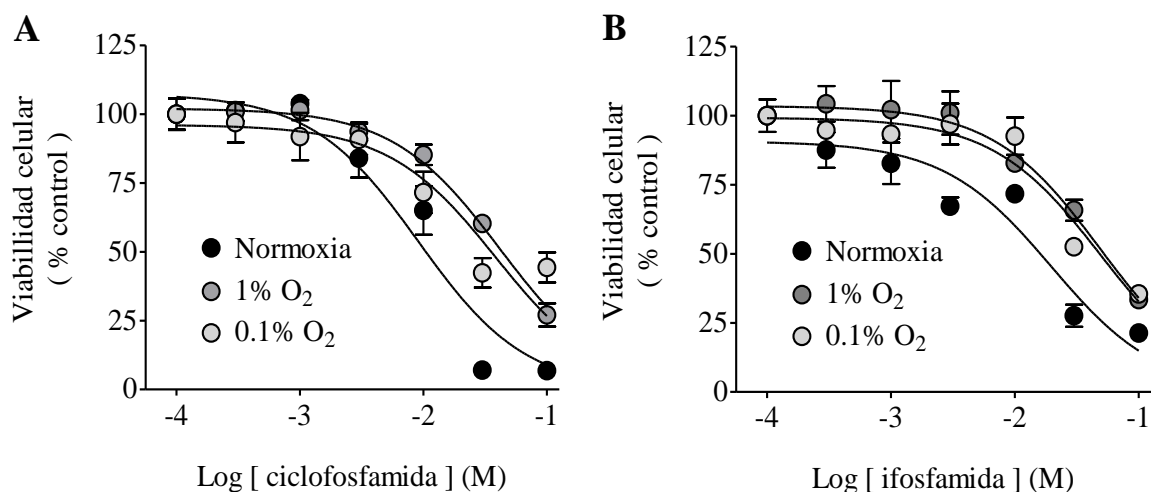


Figura 13. Efecto de la hipoxia en el efecto citotóxico de CPA e IFA en células DAOY. Las células fueron incubadas en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% y 0.1% O₂) por 24 h, en ausencia o presencia de las concentraciones de CPA indicadas, y se determinó la viabilidad celular con el ensayo de MTT. Los valores son expresados como el porcentaje de la viabilidad celular control (vehículo) y representan el promedio ± SEM de triplicados de un experimento representativo, repetido de 5 a 7 veces con resultados similares. Las líneas corresponden al ajuste al modelo de un solo sitio. Los valores de IC₅₀ se comparan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Efecto de la hipoxia en el efecto citotóxico de CPA e IFA.

| [O ₂] | CPA | | | IFA | | |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|----------|----------------------------|--------------------------|----------|
| | pIC ₅₀ | IC ₅₀ (mM) | <i>n</i> | pIC ₅₀ | IC ₅₀ (mM) | <i>n</i> |
| 16.2% | 1.73 ± 0.05 | 18.6 | 7 | 1.83 ± 0.06 | 14.7 | 5 |
| 1% | 1.44 ± 0.06 ^a | 36.1 | 7 | 1.65 ± 0.04 ^a | 22.4 | 5 |
| 0.1% | 1.43 ± 0.05 ^a | 36.8 | 5 | 1.32 ± 0.08 ^{a,b} | 47.5 | 5 |

Las células DAOY fueron incubadas en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% y 0.1% O₂), en ausencia o presencia de CPA o IFA, y la viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT. Los valores de pIC₅₀ (-Log₁₀ de la IC₅₀) se expresan como promedio ± SEM del número de experimentos indicados (*n*).^a*P* < 0.05 comparada con normoxia; ^b*P* < 0.05 comparado con 1% O₂; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

6.6 Metabolismo de CPA e IFA por enzimas CYP

En el metabolismo de CPA e IFA intervienen varias enzimas de la fase I que incluyen enzimas de CYP, principalmente las isoformas CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5. Una vez que se ha formado el compuesto hidroxilado, este puede experimentar reacciones adicionales en las que participan enzimas como la alcohol deshidrogenasa (ADH), la aldehído deshidrogenasa (ALDH) y la glutatión S-transferasa (GST; Wang y Wang, 2012). Los compuestos hidroxilados (4-OH-CPA e 4-OH-IFO (Figura 14), mediante β-eliminación, forman sus respectivas mostazas, que son los principales metabolitos citotóxicos, y

acroleína, metabolito que genera efectos adversos como cistitis hemorrágica y toxicidad neurológica, hepática y renal (Zhang et al., 2006; Wang y Wang, 2012).

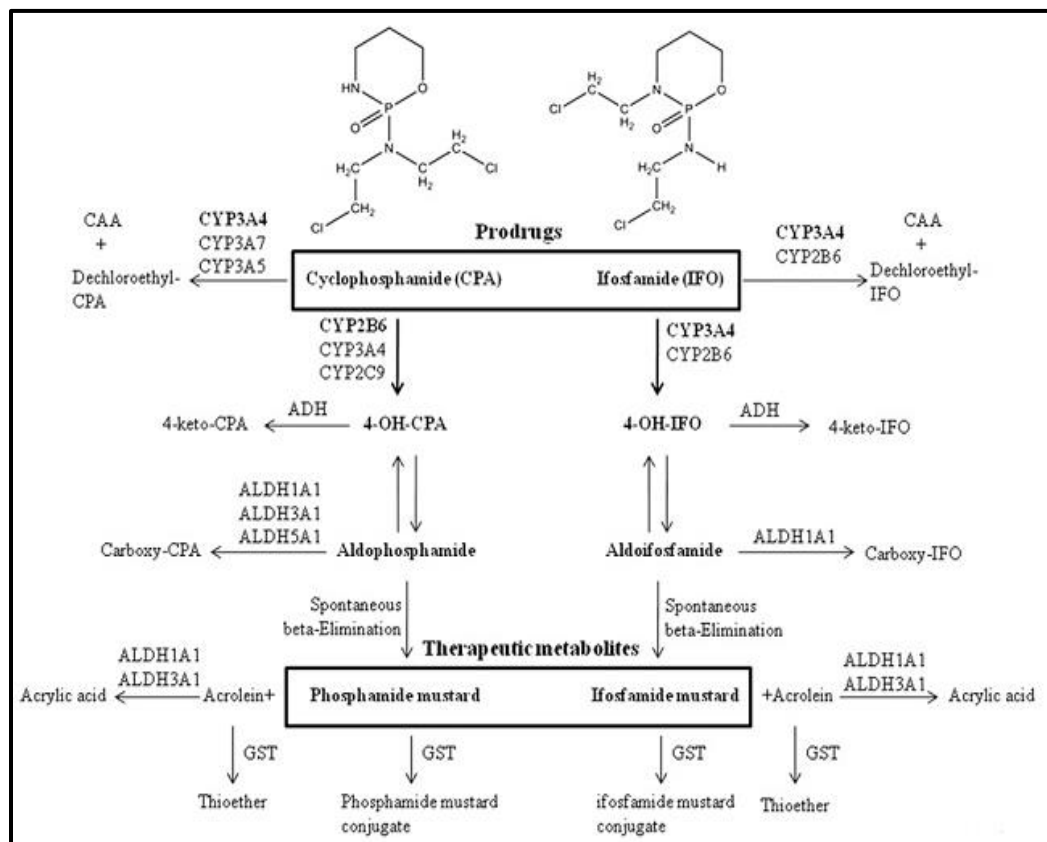


Figura14. Metabolismo de CPA e IFA por enzimas CYP. La activación (4-hidroxilación) se lleva a cabo por enzimas de CYP y por otras enzimas (ADH, ALDH, GST) para generar las formas activas (mostazas) que ejercen acción alquilante en el DNA. Tomado de Wang y Wang, 2012.

6.7 Efecto de la hipoxia en la expresión del RNAm de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5

Se identificaron dos posibles HRE en la región del promotor de *CYP2B6* (-971 a -965 pb y -2,905 a -2,899 pb), lo que sugiere su regulación por HIF-1 α en condiciones de hipoxia. En las células DAOY expuestas a condiciones de normoxia e hipoxia por 24 h, el RNAm de

CYP2B6 aumentó en la condición del 1% O₂ a $200 \pm 20\%$ y en la condición de 0.1% O₂ a $290 \pm 40\%$ del valor en normoxia. La expresión del RNAm no fue diferente entre las dos condiciones de hipoxia (Figura 15).

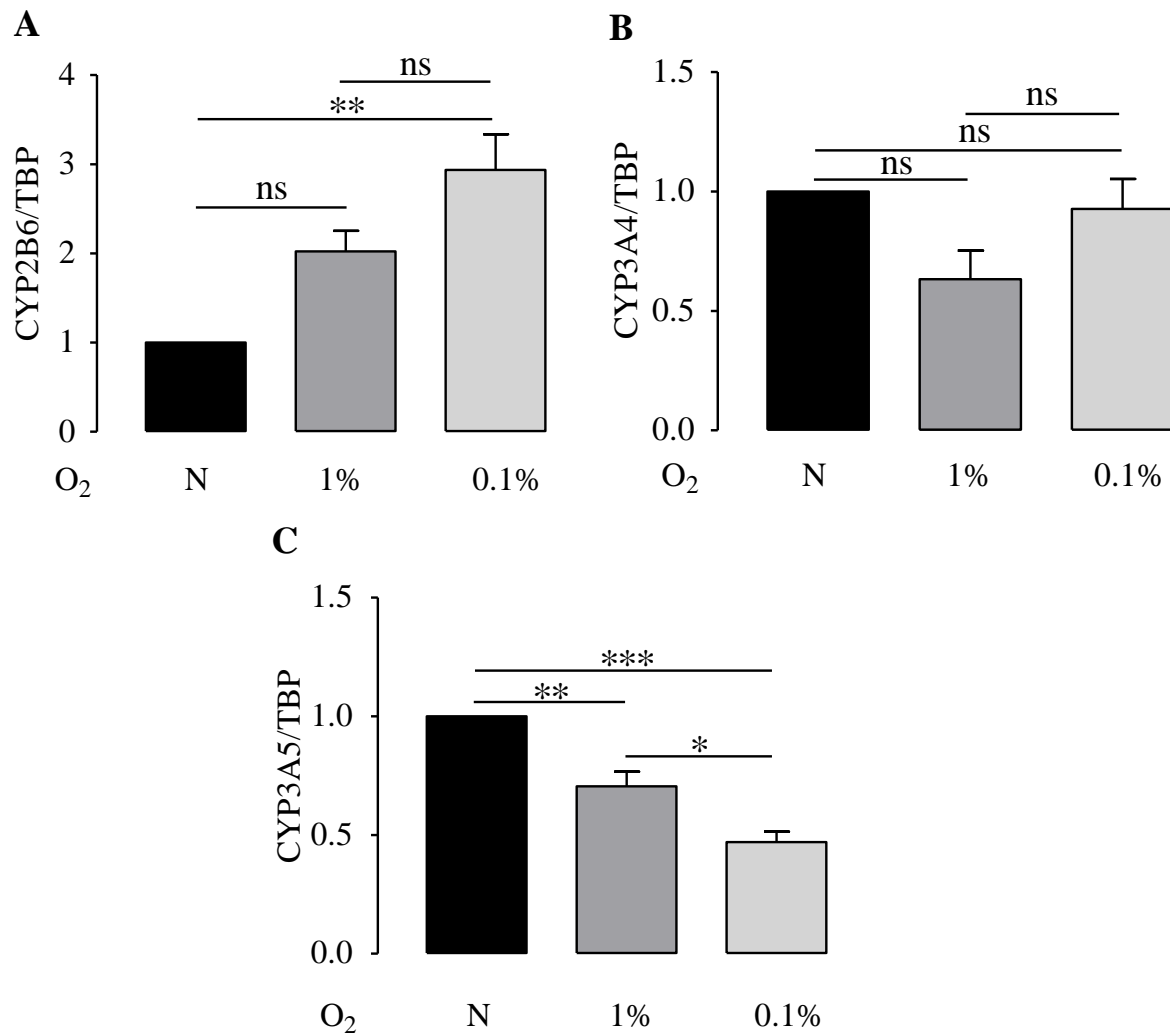


Figura 15. Efecto de la hipoxia en la expresión del RNAm de *CYP2B6*, *CYP3A4* y *CYP3A5* en células DAOY. Las células fueron incubadas en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂) por 24 h. Las gráficas muestran el análisis de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, sin diferencia estadísticamente significativa; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Para *CYP3A4* se identificaron 2 posibles HRE en la región del promotor (posiciones -3,496 a -3,490 pb y -3,215 a -3,208 pb). La expresión del RNAm de *CYP3A4* fue $60 \pm 10\%$ y $90 \pm 10\%$ del valor control en células incubadas con 1% y 0.1% de O₂, respectivamente, sin diferencia significativa con los valores de normoxia. En la región del promotor de *CYP3A5* se identificó un posible HRE (-3,296 a -3,290 bp). La expresión del RNAm de *CYP3A5* disminuyó a $70 \pm 10\%$ del control (normoxia) en la condición de 1% O₂ y a $50 \pm 4\%$ en la condición de 0.1% O₂. Ambos valores fueron estadísticamente diferentes de la condición y normoxia, y entre ellos. Estos resultados indican que la hipoxia aumenta la expresión del RNAm de *CYP2B6*, no modifica la expresión del RNAm de *CYP3A4* y disminuye la expresión del RNAm de *CYP3A5*.

6.8 Efecto de la hipoxia en la expresión proteica de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5

La activación metabólica de CPA e IFA genera los compuestos hidroxilados, y para CPA es realizada mayoritariamente por CYP2B6 (45%) y CYP3A4 (25%) para CPA (Huang et al., 2000), mientras que la hidroxilación de IFA la realiza principalmente la isoforma CYP3A4 (65%), con una menor contribución de CYP2B6 (6.5%) y CYP3A5 (~1%).

La Figura 16 muestra que la hipoxia disminuyó significativamente la expresión proteica de CYP2B6 a $50 \pm 20\%$ (1% O₂) y $30 \pm 20\%$ (0.1% O₂) de la condición de normoxia. El efecto no fue significativamente diferente entre ambas condiciones de hipoxia. Para CYP3A4 la hipoxia también disminuyó significativamente la expresión proteica de CYP2B6 a $70 \pm 4\%$ (1% O₂) y $70 \pm 10\%$ (0.1% O₂) de la condición de normoxia, sin diferencia estadística entre ambas condiciones de hipoxia. La expresión de CYP3A5 disminuyó a $70 \pm 10\%$ (1% O₂) y $70 \pm 5\%$ (0.1% O₂) de la condición de normoxia, sin diferencia significativa entre ambas condiciones de hipoxia. Estos resultados indican que la hipoxia regula negativamente la expresión proteica CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5, lo que puede relacionarse con el aumento en la resistencia al tratamiento con CPA e IFA, al disminuir la formación del metabolito activo (hidroxilado) de estos fármacos.

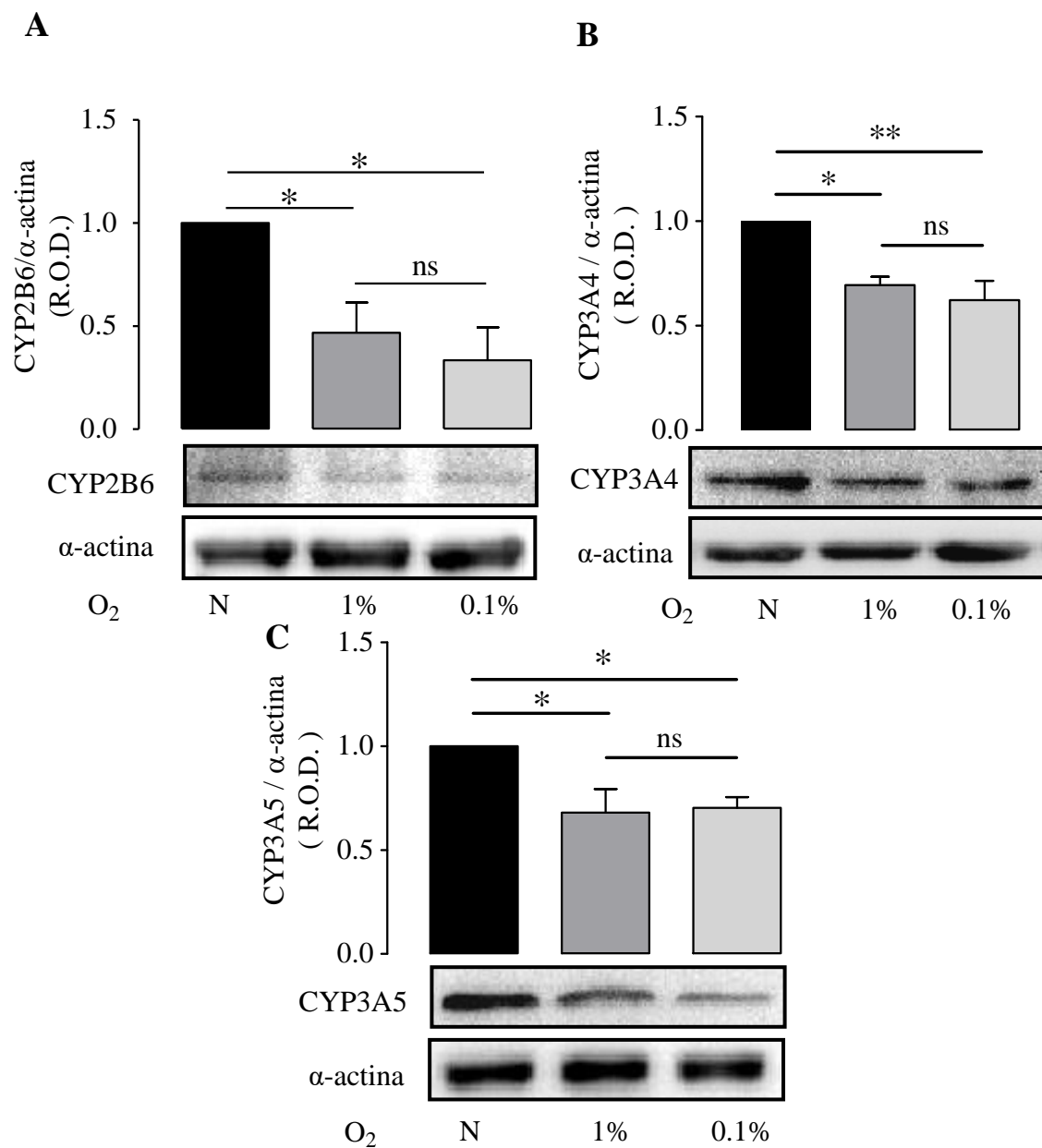


Figura16. Efecto de la hipoxia en la expresión de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 en células DAOY. Las células fueron incubadas en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o

hipoxia (1% o 0.1% O₂) por 24 h. Se muestra un *blot* representativo. Las gráficas corresponden al análisis de la densidad óptica relativa (R.O.D.) de 4 experimentos independientes (promedio ± SEM). **P*<0.05, ***P*< 0.01ns, sin diferencia estadísticamente significativa; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

6.9 Efecto de la hipoxia en la proliferación celular

Los productos hidroxilados de CPA e IFA experimentan reacciones adicionales para generar compuestos alquilantes, y se ha sugerido que la distribución del ciclo celular puede por lo tanto modificar el efecto citotóxico de estos fármacos, ya que en las células en constante proliferación se favorece la formación de aductos con el DNA (Box y Demetrick, 2004; Beaumont et al., 2016). Con base en lo anterior, se determinó el efecto de la hipoxia en la proliferación celular, y la Figura17 muestra que la hipoxia (1% O₂ o 0.1% O₂) disminuyó el número de células a 70.4±8.7% y 68.6±4.7%, respectivamente, de los valores para la normoxia.

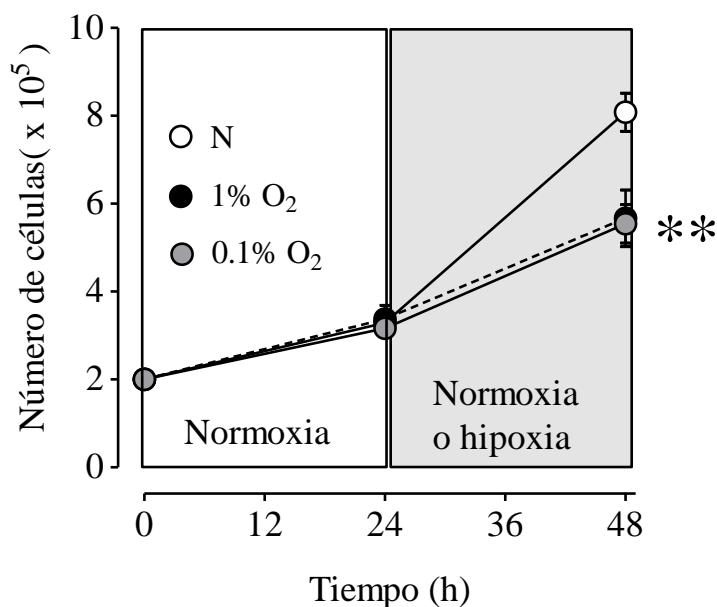


Figura17. Efecto de la hipoxia en la proliferación de las células DAOY. Las células fueron incubadas en condiciones de normoxia(16.2% O₂)por 24 h y posteriormente por 24 h en

condiciones de normoxia o hipoxia (1% o 0.1% O₂). El número de células fue determinado por conteo y exclusión de azul de tripán. Los valores representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. ** $P < 0.01$ versus el valor de normoxia; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Estos resultados indicaron que la hipoxia promueve el arresto celular. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la distribución del ciclo celular por tinción con yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. En células DAOY incubadas en condiciones de hipoxia se observó un aumento en la fracción celular en la fase G1 acompañado de disminución de la población celular en la fase S (Figura 18 y Cuadro 7). La hipoxia no modificó la fracción de células en la fase G2/M.

El arresto del ciclo celular está controlado por varias ciclinas, y para confirmar el arresto en la fase G1 se evaluó la expresión de CDKN1B, una cinasa dependiente de ciclina que induce el arresto en la fase G1 al inactivar a los complejos ciclina E/CDK2, ciclina A/CDK2 y ciclina D/CDK4 (Sun et al., 2016; Li et al., 2017). La Figura 19 muestra que la hipoxia aumentó la expresión de CDKN1B a 216 ± 36 y $223 \pm 26\%$ del valor de normoxia en células expuestas a 1% O₂ y 0.1% O₂, respectivamente, sin diferencia significativa entre ambas condiciones de hipoxia. Estos resultados sugieren que la hipoxia promueve la disminución en la proliferación celular promoviendo el arresto celular en la fase G1 al aumentar la expresión CDKN1B, lo que afectaría el efecto alquilante de CPA e IFA y por lo tanto su efecto citotóxico.

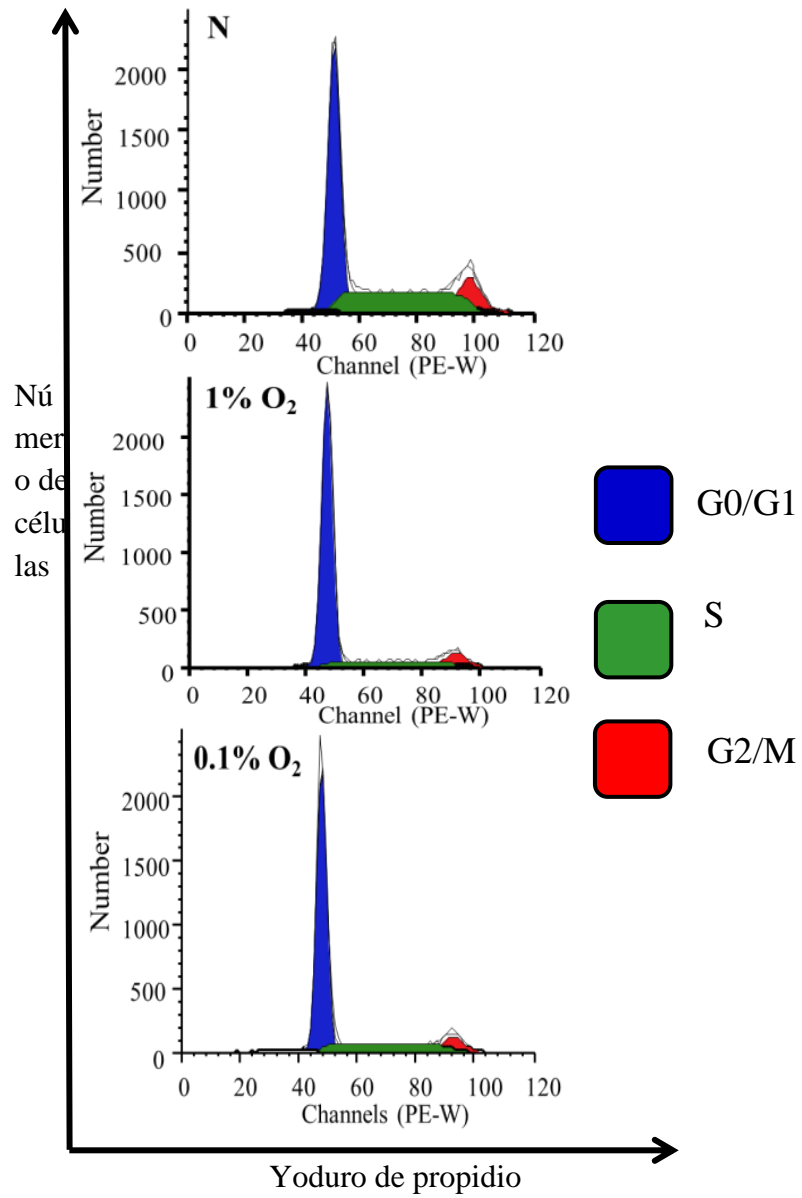


Figura18. Efecto de la hipoxia en el ciclo celular. Las células DAOY fueron incubadas por 24 h en condiciones de normoxia (16% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂), y las fases del ciclo celular fueron evaluadas por citometría de flujo después de la tinción con yoduro de propidio(10,000 eventos).La imagen es representativa de 3 experimentos independientes con resultados similares. El análisis cuantitativo se presenta en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Distribución del ciclo celular en células DAOY en condiciones de hipoxia.

| [O ₂] | Fase del ciclo celular (%) | | |
|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | G1 | S | G2/M |
| 16.2% | 56.9 ± 0.4 | 33.5 ± 0.4 | 9.7 ± 0.1 |
| 1% | 77.0 ± 0.3 ^a | 15.6 ± 1.0 ^a | 7.4 ± 2.4 ^{ns} |
| 0.1% | 73.1 ± 0.5 ^a | 19.2 ± 0.4 ^a | 7.7 ± 0.2 ^{ns} |

Las células DAOY fueron incubadas por 24 h en condiciones de normoxia(16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂), y las fases del ciclo celular fueron evaluadas por citometría de flujo después de la tinción con yoduro de propidio. Los valores representan el promedio ± SEM de 3 experimentos independientes. ns, sin diferencia estadísticamente significativa; ^a*P* < 0.05 comparado con los valores de normoxia; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

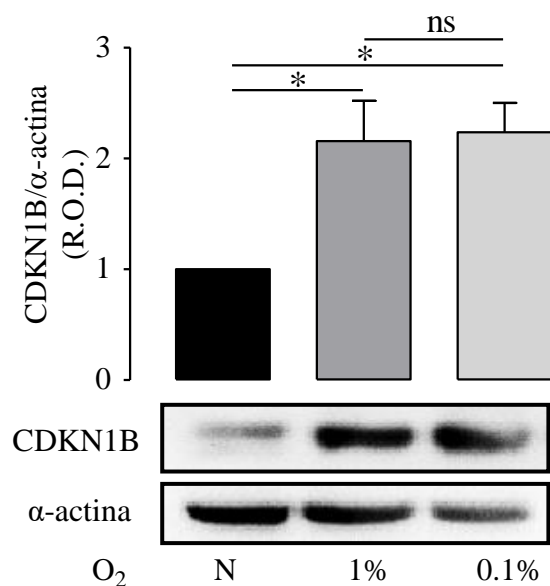


Figura19. Efecto de la hipoxia en la expresión de CDKN1B por células DAOY. Las células fueron incubadas en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂) por 24 h. Se muestra un *blot* representativo. Las gráficas corresponden al análisis de la densidad óptica relativa (R.O.D.) de 4 experimentos independientes (promedios ± SEM).

* $P < 0.05$; ns, sin diferencia estadísticamente significativa; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

6.10 Efecto del 2-metoxiestradiol (2-ME) en la expresión de HIF-1 α

Los resultados anteriores indican que en células DAOY la hipoxia induce resistencia al efecto citotóxico de CPA e IFA, al activar la vía de señalización de HIF-1 α , lo que se relaciona con disminución de la expresión de las enzimas CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5, inhibición de la proliferación celular y arresto del ciclo celular en la fase G1. Para evaluar la dependencia de estos mecanismos de la expresión de HIF-1 α , se evaluó el efecto de la inhibición farmacológica de la misma por 2-metoxiestradiol (2-ME), que induce la despolimerización de los microtúbulos necesarios para la translocación de HIF-1 α al núcleo, disminuyendo su actividad transcripcional y por lo tanto su expresión (Mabjeesh et al., 2003). En células DAOY en condiciones de hipoxia (1% O₂) la incubación con 2-ME (5-40 μ M) por 24 h disminuyó la expresión de HIF-1 α en extractos nucleares de manera dependiente de la concentración (Figura 20). La expresión de HIF-1 α en relación al control fue $57 \pm 11\%$ (5 μ M 2-ME), $51 \pm 12\%$ (10 μ M), $46 \pm 7\%$ (20 μ M) y $36 \pm 9\%$ (40 μ M).

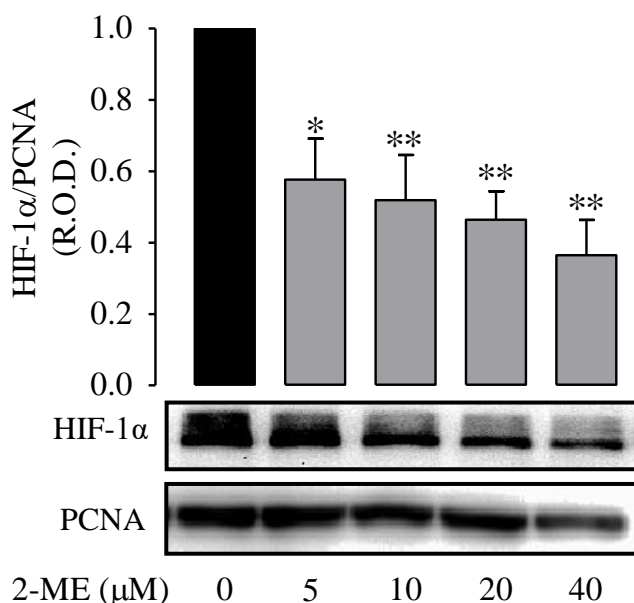


Figura 20. Efecto del 2-Metoxiestradiol (2-ME) en la expresión nuclear de HIF-1 α inducida por la hipoxia en células DAOY. Las células fueron incubadas por 24 h en condiciones de 1% O₂ en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de 2-ME. Se muestra un *blot* representativo. La gráfica muestra los promedios \pm SEM de la densidad óptica relativa

(R.O.D.) de 4 experimentos independientes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus los valores control (sin tratamiento con 2-ME); ANOVA de una vía y prueba de Dunnett.

Se evaluó el efecto citotóxico de 2-ME en condiciones de normoxia (24 h). La Figura 21 muestra que una concentración de 5 μM de 2-ME no afectó de manera significativa la viabilidad celular ($91.0 \pm 3.1\%$ del valor control), y que concentraciones mayores disminuyeron significativamente la viabilidad (10 μM , $72.8 \pm 3.1\%$; 20 μM , $70.0 \pm 1.4\%$; 40 μM , $56.2 \pm 3.2\%$). Con base en lo anterior, los experimentos posteriores fueron realizados utilizando 5 μM de 2-ME, concentración que inhibió significativamente la expresión de HIF-1 α en el núcleo sin comprometer la viabilidad celular en condiciones de normoxia.

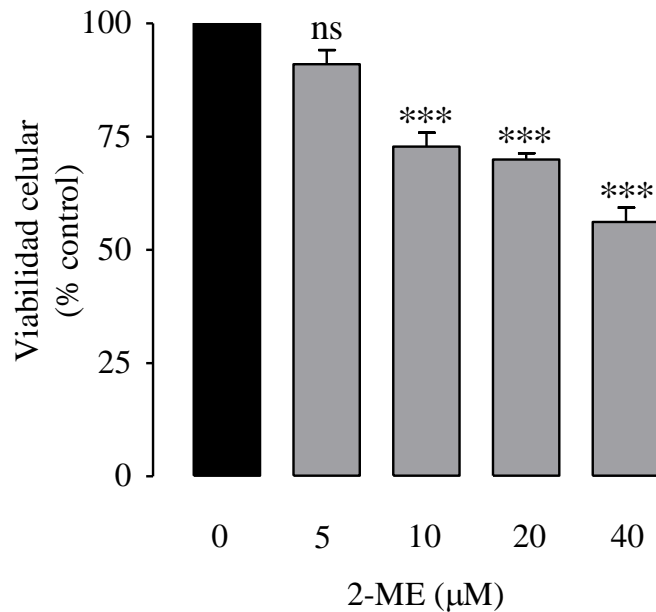


Figura 21. Efecto del 2-Metoxiestradiol (2-ME) en la viabilidad celular. Las células DAOY fueron incubadas por 24 h en condiciones de normoxia (16.2% O_2), en ausencia o en presencia de las concentraciones indicadas de 2-ME, y la viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT. Los valores representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. *** $P < 0.001$; ns, sin diferencia estadísticamente significativa comparada con los valores control (sin 2-ME); ANOVA de una vía y prueba de Dunnett

Nuestros resultados indicaron que la hipoxia (1% y 0.1% O₂) acidifica el pH del medio de cultivo de células DAOY. Por ello, se determinó el efecto del 2-ME (5 μM) en el pH extracelular en condiciones de normoxia e hipoxia. La Figura 22 muestra que el 2-ME no modificó el pH en condiciones de normoxia y que no previno la acidificación inducida por ambas condiciones de hipoxia.

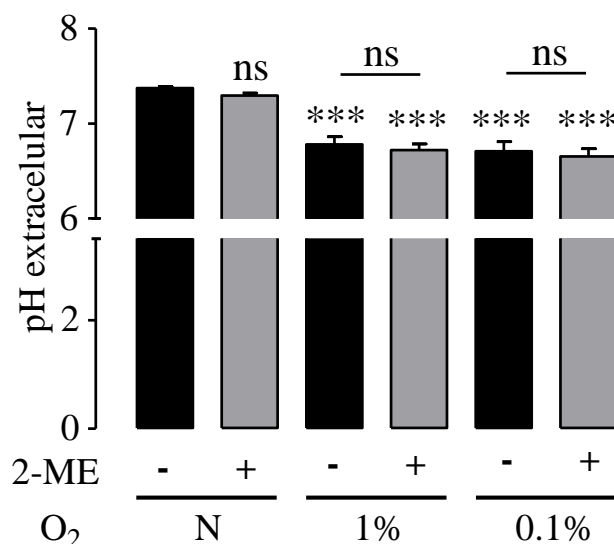


Figura 22. Efecto del 2-Metoxiestradiol (2-ME) en el pH extracelular en condiciones de normoxia e hipoxia. Las células DAOY fueron incubadas en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂) por 24 h. El medio de cultivo fue retirado y se determinó el pH en el mismo. Los valores son los promedios ± SEM de 3 experimentos independientes. ****P* < 0.001 versus los valores control (normoxia y ausencia de 2-ME); ns, sin diferencia estadísticamente significativa; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Estos resultados muestran que la hipoxia (1% O₂ y 0.1% O₂) aumenta la expresión de CA-IX y de MCT-4, lo que a su vez podría regular el pH en las células tumorales. Por tal motivo, se determinó el efecto de 2-ME en la expresión de CA-IX y MCT-4 en condiciones de hipoxia. La Figura 23 muestra que el 2-ME (5 μM) redujo en 40-60% la expresión de CA-IX inducida por la hipoxia (1% O₂). No se observaron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de 2-ME.

La hipoxia también aumentó la expresión de MCT-4. Sin embargo, el 2-ME no tuvo efecto significativo en la expresión de MCT-4 inducida por 1% O₂. En conjunto, estos resultados indicaron que el 2-ME disminuyó la expresión de CA-IX, en 40-60%, sin afectar la expresión de MCT-4. Estas condiciones podrán mantener la acidificación extracelular.

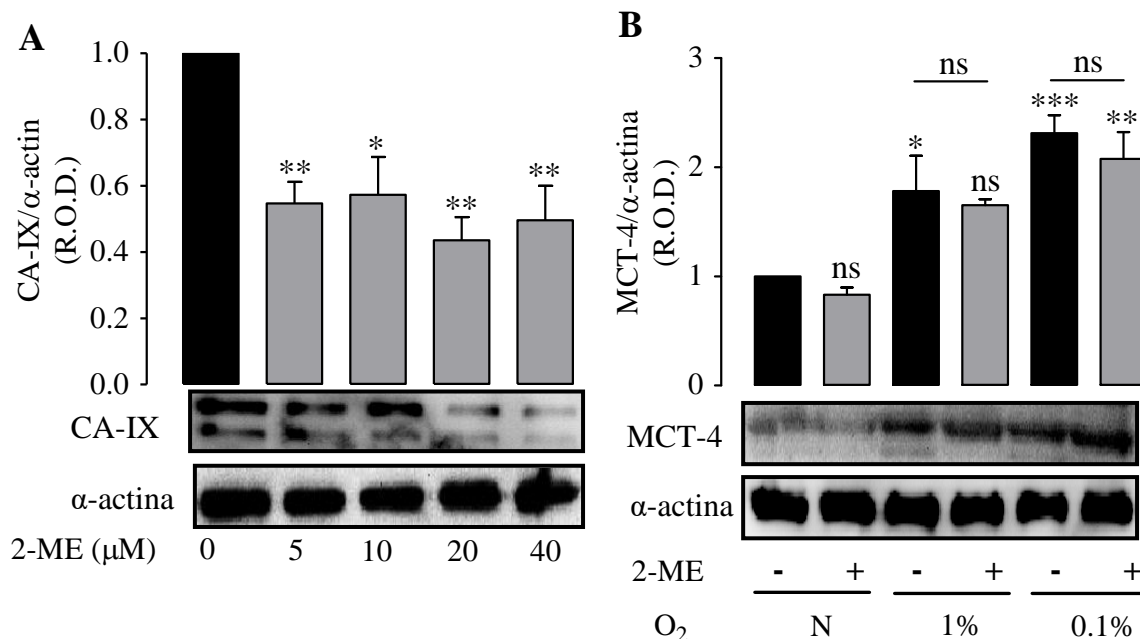


Figura 23. Efecto del 2-Metoxiestradiol (2-ME) en la expresión de CA-IX y MCT-4 inducida por la hipoxia en células DAOY. Las células fueron incubadas por 24 h en 1% O₂ en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de 2-ME. Se muestra un *blot* representativo. Los valores de la gráfica son los promedios ± SEM de la densidad óptica relativa (R.O.D.) de 4 experimentos independientes. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* versus los valores control (normoxia y sin 2-ME); los valores en presencia de 2-ME no fueron diferentes entre sí, ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

6.11 Efecto de 2-ME en la expresión de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5

La hipoxia disminuyó la expresión de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5, lo que podría asociarse con la resistencia al tratamiento con CPA e IFA. La expresión de CYP2B6 disminuyó en la condición de 1% O₂ a 60 ± 20% del valor control, y en la condición de 0.1%

O₂ a 50 ± 2%. El tratamiento de 2-ME (5 μM) previno el efecto de la hipoxia a 1% O₂ (90 ± 3%), pero no el efecto de 0.1% O₂ (40 ± 10%), como se observa en la Figura 24.

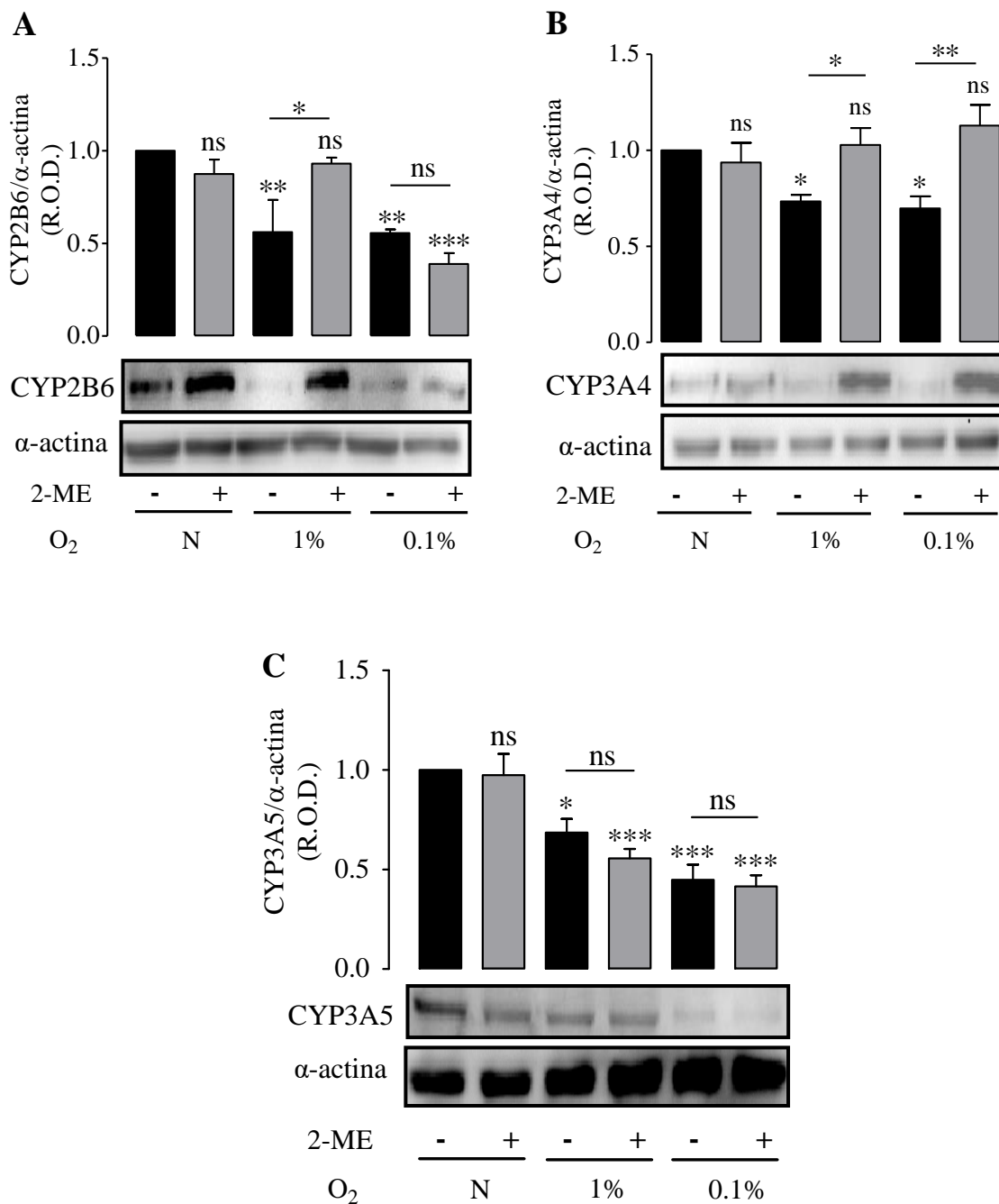


Figura24. Efecto del 2-Metoxiestradiol (2-ME) y la hipoxia en la expresión de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 en células DAOY. Las células fueron incubadas por 24 h a 1% O₂ en ausencia o presencia de 2-ME (5 μM). Se muestra un *blot* representativo. La gráfica muestra los promedios ± SEM de la densidad óptica relativa (R.O.D.) de 4 experimentos independientes. ns, sin diferencia estadísticamente significativa; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 versus los valores control (normoxia y sin 2-ME); ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

La expresión de CYP3A4 disminuye en condiciones de hipoxia (70 ± 3% y 70 ± 10% del control en 1% y 0.1 de O₂, respectivamente) y este efecto fue prevenido por el 2-ME (5 μM; 1% O₂, 100 ± 10%; 0.1% O₂, 110 ± 10% de la condición control). La expresión de CYP3A5 disminuyó también en ambas condiciones de hipoxia (1% de O₂, 70 ± 10%; 0.1% de O₂, 40 ± 10% de los valores control), pero el tratamiento con 2-ME (5 μM) no previno el efecto de la hipoxia (1% O₂, 60 ± 5%; 0.1% O₂, 40 ± 10% de los valores control).

Estos resultados indican que la inhibición farmacológica de HIF-1α con 2-ME afecta el efecto de la hipoxia en la expresión de isoformas de CYP de manera diferencial, previniendo su efecto para la isoforma CYP2B6 solo en la condición de 1% de O₂, y en ambas condiciones de hipoxia para la isoforma CYP3A4. Lo anterior resulta relevante ya que estas dos isoformas participan de manera primaria en el metabolismo de CPA e IFA.

La hipoxia (1% y 0.1% O₂, 24 h) disminuyó la proliferación de las células DAOY, favoreciendo el arresto celular en la fase G1 y aumentando la expresión de CDKN1B, lo que indica que la expresión de HIF-1α podría estar asociada con el arresto celular que a su vez participa en la resistencia a la quimioterapia. El 2-ME disminuyó la expresión de HIF-1α, y la Figura 25 muestra que previene el efecto de ambas condiciones de hipoxia en la proliferación celular.

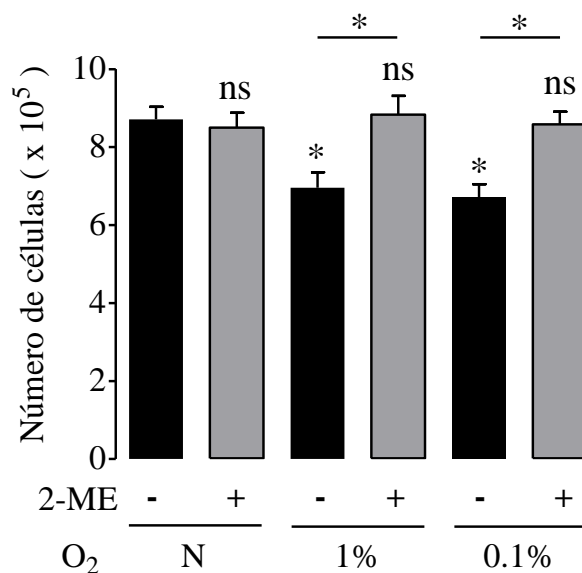


Figura25. Efecto del 2-ME en la disminución de la proliferación celular inducida por la hipoxia. Las células DAOY fueron incubadas por 24 h en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂), en ausencia y en presencia de 2-ME (5 μM), y el número de células fue determinado con la tinción por exclusión de azul de tripán. Los valores son los promedios ± SEM de 3 experimentos independientes. **P*<0.05 versus los valores control (normoxia y ausencia de 2-ME); ns, sin diferencia estadísticamente significativa; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Ambas condiciones de hipoxia aumentaron la expresión de CDKN1B (216 ± 36 y 223 ± 26% del control con 1% y 0.1% de O₂, respectivamente), y el tratamiento con 2-ME previno este efecto para 1% O₂ (100 ± 5% del control), pero no en la condición de 0.1% O₂ (170 ± 10%), como se muestra en la Figura 26. La expresión de CDKN1B puede estar relacionada con la regulación del arresto celular en la fase G1 y la transición de la fase G1 a S, y por lo

tanto con el arresto celular en condiciones de hipoxia; sin embargo, en este efecto pueden intervenir otras cinasas CDKs como p21^{Cip1} y p57^{Kip2} (Donjerkovic y Scott , 2000).

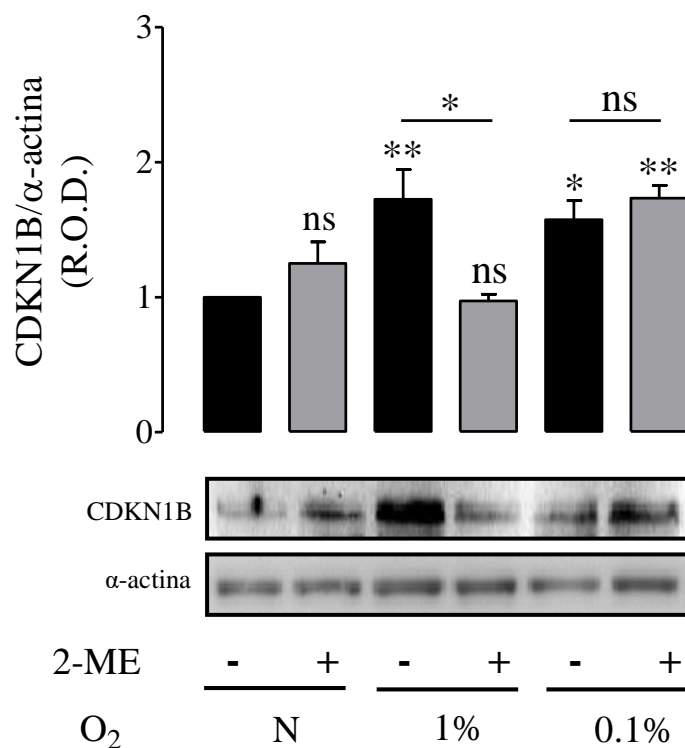


Figura26. Efecto del 2-ME en la expresión de CDKN1B inducida por la hipoxia. Las células DAOY fueron incubadas en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂) por 24 h, en ausencia y en presencia de 2-ME (5 μM). Se muestra un *blot* representativo. Los valores representan el promedio ± SEM del análisis de la densidad óptica relativa (R.O.D.) de 4 experimentos independientes. **P*<0.05, ***P*< 0.01, versus los valores control (normoxia y sin 2-ME); ns, sin diferencia estadísticamente significativa; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

6.12 Efecto citotóxico de CPA o IFA en combinación con 2-ME

Los datos de esta tesis indican que la hipoxia induce la resistencia al tratamiento con CPA e IFA, y que este efecto podría deberse a la expresión de HIF-1 α , disminución de la expresión de CYP2B6 y CYP3A4, y modificaciones del ciclo celular. Además. El 2-ME disminuyó la expresión de HIF-1 α , y previno el efecto de la hipoxia en la expresión de CYP2B6 y CYP3A4, así como en la proliferación celular.

Por lo anterior, se determinó el efecto citotóxico de CPA e IFA en combinación con 2-ME (5 μ M). El Cuadro 8 muestra que en condiciones de normoxia la reducción en la viabilidad celular inducida por CPA ($-43.2 \pm 1.7\%$) e IFA ($-46.3 \pm 2.2\%$) no difiere de la observada con la combinación CPA+2-ME ($-45.8 \pm 3.3\%$) o IFA+2-ME ($-51.4 \pm 2.0\%$).

Para las células incubadas en 1% de O₂ la disminución en la viabilidad celular inducida por CPA ($-45.7 \pm 1.9\%$) e IFA ($-50.3 \pm 2.5\%$) aumentó significativamente con el tratamiento CPA+2-ME ($-72.7 \pm 2.1\%$) e IFA+2-ME ($-76.4 \pm 2.3\%$). En condiciones de 0.1% de O₂ el efecto del tratamiento combinado (CPA + 2-ME, $-72.7 \pm 2.1\%$; IFA + 2-ME, $-73.5 \pm 1.9\%$) fue mayor que el efecto de los fármacos aislados (CPA, $-44.5 \pm 1.5\%$; IFA, $-51.2 \pm 2.9\%$).

El cuadro 8 muestra el análisis del Índice de Resistencia (RI). En condiciones de normoxia el análisis de la combinación de 2-ME con CPA o IFA resultó valores no diferentes de 1, indicando ausencia de aditividad. Para la combinación CPA + 2-ME el valor de RI indicó efectos aditivos tanto en 1% de O₂ ($RI\ 1.9 \pm 0.1$) como de 0.1% de O₂ ($RI\ 1.7 \pm 0.1$). Para la combinación IFA + 2-ME el valor de RI en la condición de 1% de O₂ fue 2.0 ± 0.1 , sugiriendo un efecto sinérgico, y para la condición de 0.1% de O₂ fue 1.8 ± 0.1 , indicativo de un efecto aditivo. Estos resultados sugieren que el tratamiento con CPA e IFA en combinación con 2-ME aumenta la acción citotóxica en las células DAOY expuestas a hipoxia.

Cuadro 8. Efecto del 2-ME en la citotoxicidad de CPA e IFA.

| [O ₂] | 2-ME | CPA | CPA+2-ME | RI ^c | Efecto |
|-------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|------------|
| N | 94.35 ± 7.3 | 56.8 ± 1.7 ^a | 54.2 ± 3.3 | 0.99 ± 0.06 | Sin efecto |
| 1% | 95.6 ± 7.0 | 54.3 ± 1.9 ^a | 27.3 ± 2.1 ^b | 1.92 ± 0.13 ^c | Aditividad |
| 0.1% | 93.2 ± 3.0 | 55.5 ± 1.5 ^a | 30.2 ± 2.1 ^b | 1.74 ± 0.11 ^c | Aditividad |

| [O ₂] | 2-ME | IFA | IFA+2-ME | RI ^c | Efecto |
|-------------------|------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|------------|
| N | 93.9 ± 1.0 | 53.7 ± 2.2 ^a | 48.6 ± 2.0 | 1.04 ± 0.02 | Sin efecto |
| 1% | 94.4 ± 1.2 | 49.7 ± 2.5 ^a | 23.6 ± 2.3 ^b | 2.03 ± 0.12 ^c | Sinergismo |
| 0.1% | 95.4 ± 1.6 | 48.8 ± 2.9 ^a | 26.5 ± 1.9 ^b | 1.77 ± 0.10 ^c | Aditividad |

Las células DAOY fueron incubadas por 24 h en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂) y expuestas a CPA o IFA (IC₅₀ determinada previamente; Cuadro 6) en presencia o ausencia de 2-ME (5 μM). La viabilidad celular fue determinada con el ensayo de MTT. Los valores se expresan como porcentaje de la viabilidad celular control (sin tratamiento alguno) y son el promedio ± SEM de 5 experimentos independientes. ^a*P* < 0.001 versus 2-ME; ^b*P* < 0.01 versus CPA o IFA solas; ^c*P* < 0.01 versus el valor de R de las células incubadas en normoxia; ANOVA de una vía y prueba de Tukey. El cálculo del índice R se describe en Materiales y métodos.

6.13 Efecto del tratamiento con CPA, IFA y 2-ME en la apoptosis celular

Con base en los resultados anteriores, determinó el efecto del tratamiento con CPA e IFA, individualmente o en combinación con 2-ME, en la apoptosis celular (Figura 27 y Cuadro 9).

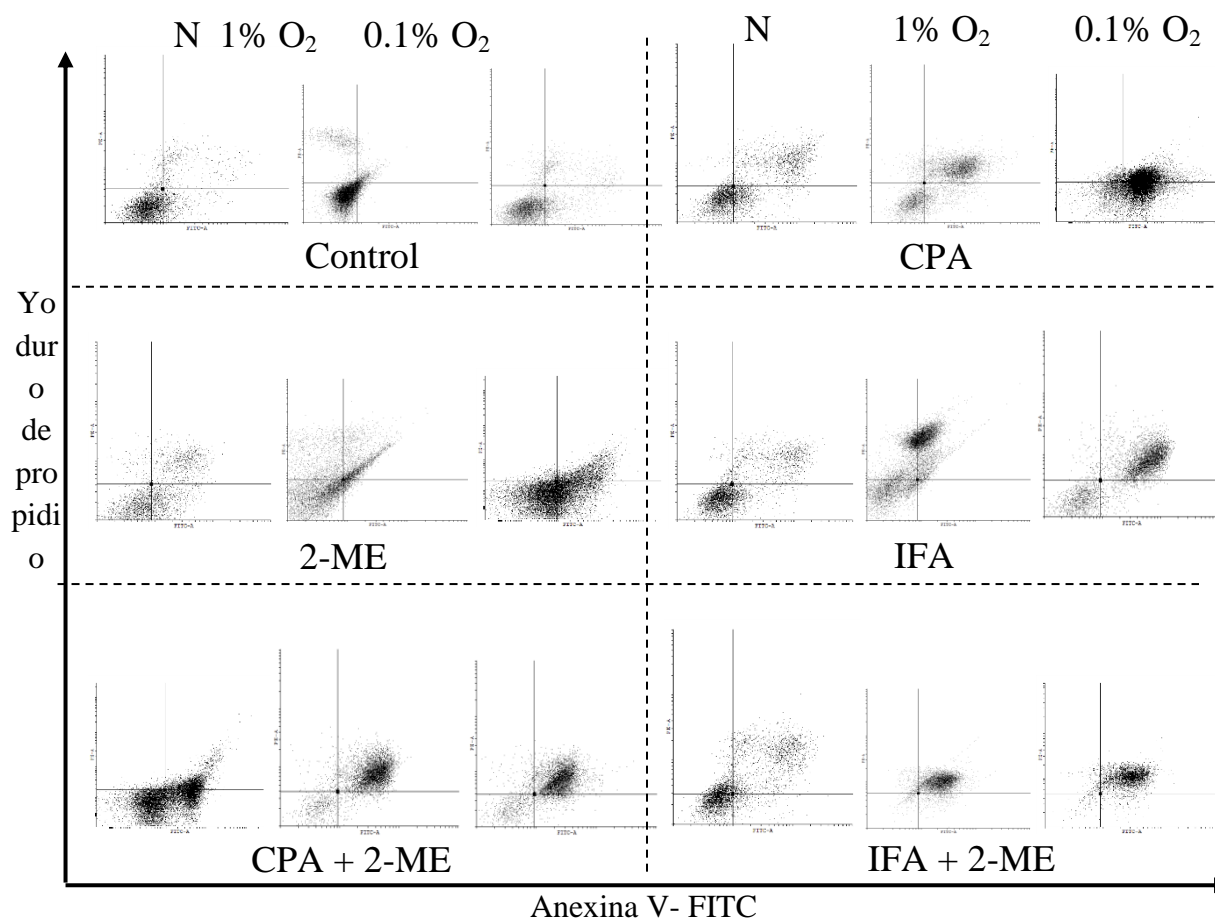


Figura27. Efecto del tratamiento con CPA o IFA en combinación con 2-ME en la apoptosis celular. Las células DAOY fueron incubadas por 24 h en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂) y la apoptosis fue evaluada con la tinción de Anexina V-FITC/PI y citometría de flujo. La imagen muestra un experimento representativo de tres realizados con resultados similares. El análisis cuantitativo se presenta en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Apoptosis inducida por CPA e IFA en combinación con 2-ME.

| [O ₂] | 16.2% | 1% | 0.1% |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control | 5.5 ± 1.1 | 11.0 ± 2.1 | 6.1 ± 2.5 |
| 2-ME | 9.7 ± 3.8 ^a | 19.4 ± 5.7 ^a | 13.9 ± 2.1 ^a |
| CPA | 22.5 ± 2.8 | 62.9 ± 1.4 | 38.2 ± 4.7 |
| CPA+2-ME | 27.6 ± 4.7 ^b | 78.8 ± 2.4 ^b | 68.9 ± 6.6 ^d |
| IFA | 24.0 ± 4.4 | 67.8 ± 1.1 | 42.0 ± 1.7 |
| IFA+2-ME | 22.9 ± 4.5 | 86.6 ± 2.7 ^c | 75.9 ± 2.6 ^e |

Las células DAOY fueron incubadas por 24 h en condiciones de normoxia (16.2 % O₂) o hipoxia (1% o 0.1% O₂) con CPA (18.6 mM) o IFA (14.7 mM) en presencia o ausencia de 2-ME (5 μM), y la apoptosis fue evaluada con la tinción de Anexina V-FITC/PI y citometría de flujo (10,000 eventos). Los valores indican el porcentaje de células en fase de apoptosis y representan el promedio ± SEM de 3 experimentos independientes. ^a*P*< 0.05 versus los valores control; ^b*P*< 0.05 versus CPA sola; ^c*P*< 0.01 versus IFA sola; ^d*P*< 0.001 versus CPA sola; ^e*P*< 0.001 versus IFA sola. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de una vía y la prueba de Tukey.

La fracción de células apoptóticas aumentó en células DAOY incubadas en condiciones de hipoxia (1% O₂) y tratadas con CPA en combinación con 2-ME (78.8 ± 2.4%) en

comparación con CPA ($62.9 \pm 1.4\%$). De manera similar, la combinación de IFA y 2-ME aumentó la fracción de células en apoptosis ($86.6 \pm 2.7\%$) en comparación con el tratamiento individual con IFA ($67.8 \pm 1.1\%$).

Un efecto similar fue observado para las células DAOY incubadas en condiciones de mayor hipoxia ($0.1\% \text{ O}_2$), con la combinación CPA y 2-ME induciendo una mayor fracción de células apoptóticas ($68.9 \pm 6.6\%$) en comparación con el tratamiento individual con CPA ($38.2 \pm 4.7\%$), y para la combinación IFA y 2-ME ($75.9 \pm 2.6\%$) en comparación con solo IFA ($42.0 \pm 1.7\%$).

En conjunto, estos resultados apoyan que la inhibición farmacológica de HIF-1 α aumenta el efecto citotóxico de CPA e IFA en condiciones de hipoxia.

7. Discusión

7.1 Identificación de elementos de respuesta a hipoxia (HRE)

Se identificaron posibles HRE en la región del promotor de los genes de CYP2B6 (-965/-971 pb, -2899/-2905 pb), CYP3A4 (-3208/-3215 pb, -3490/-3496 pb) y CYP3A5 (-3290/-3296 pb). Legendre et al. (2009) reportaron un posible HRE en la posición -674/-661 bp del gen de CYP3A4. La diferencia en la posición de la secuencia de HRE se debe a las diferentes características de los programas utilizados para la predicción en los genes de CYP. El análisis *in silico* realizado en esta tesis es un generador de hipótesis de la posible regulación del factor transcripción HIF-1 α con base en la identificación de HREs. Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para evaluar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de los HRE identificados.

Para el gene de CYP2B6 se identificó un HRE en la región del promotor (-971 a -965 pb) que incluye a la región central (*core*) del mismo (TATA, sitio del inicio de la transcripción), y los otros posibles HRE de los genes CYP se encuentran a mayor distancia (CYP2B6, -2905 a -2899 pb; CYP3A4, -3215 a -3208 pb y -3496 a -3490; y para CYP3A5, -3296 a -3290 pb) en la región de elementos regulatorios distales (amplificadores, silenciadores, aislantes, y el *locus* de región de control) que comprende hasta 1 Mb en el promotor (Maston et al., 2006).

La predicción de HRE de CYP3A4 y CYP3A5 se encuentran a una distancia similar debido a que a 1.5 kb en la región proximal de CYP3A5 tiene una identidad de 59% con CYP3A4, y una identidad de amino ácidos de 84% (Plant, 2007). Una de las diferencia principales de CYP3A4 y CYP3A5 es que el primero posee un elemento transcripcional básico (BTE) y caja-TATA, y el segundo posee una caja-TATA modificada (CATAA) y BTE (Plant, 2007). Se ha identificado en la región proximal (-1,105 pb) o distal (11,400 pb) de la región del promotor de CYP3A4, CYP3A5 y de CYP2B6 (-1,600 a -8,600 pb) varios sitios de unión de factores transcripcionales, y se ha determinado la funcionalidad de algunos de ellos; sin embargo, el reto es identificar los mecanismos que regula cada uno ellos (Handschin y Meyer, 2003; Plant, 2007; Inoue y Negishi, 2009).

7.2 La hipoxia incrementa la expresión de HIF-1 α en células DAOY

Los resultados de este trabajo indicaron que la hipoxia aumenta la expresión nuclear de HIF-1 α tanto para 1% de O₂ (5 veces) como 0.1% de O₂ (6 veces), con el mismo efecto, aunque de menor magnitud (3 veces) para los extractos citosólicos en ambas condiciones de hipoxia. Como factor transcripcional, HIF-1 α es translocado al núcleo para regular la expresión génica y se ha identificado su presencia en glioblastomas (Talks et al., 2000) y en diversos tipos tumorales como los de vejiga (Talks et al., 2000), hígado (Talks et al., 2000), pulmón (Talks et al., 2000), ovario (Talks et al., 2000), páncreas (Talks et al., 2000), próstata (Talks et al., 2000), colon (Kuwai et al., 2003; Ding et al., 2010), mama (Gruber et al., 2004; Lai et al., 2014) y estómago (Griffith et al., 2007; Chen et al., 2014).

HIF-1 α es regulado positivamente en cáncer de cérvix en condiciones de hipoxia de 0.1%-1% de O₂ (Box y Demetrick, 2004; Ullah et al., 2006), cáncer de pulmón a 0.5%-1% de O₂ (Uchida et al., 2004; Rho et al., 2009), cáncer de mama a 0.1%-3% de O₂ (Box y Demetrick, 2004; Sullivan et al., 2008; Doublier et al., 2012) y en condiciones de 1% de O₂ en cáncer gástrico (Liu et al., 2008), cáncer de colon (Ding et al., 2010; Murono et al., 2012), neuroblastoma (Hussein et al., 2006), osteosarcoma (Adamski et al., 2013) y glioblastoma (Richards et al., 2016).

Nuestros resultados mostraron de manera novedosa que la hipoxia induce la expresión de HIF-1 α en células de meduloblastoma humano, lo que podría estar implicado en varios procesos que favorezcan la progresión de este tipo tumoral.

7.3 La hipoxia favorece la quimiorresistencia

Los datos de esta tesis muestran que en las células DAOY el efecto citotóxico de los fármacos CPA e IFA disminuye en condiciones de hipoxia (1% y 0.1% de O₂). Estos resultados concuerdan con estudios previos que reportan que la hipoxia induce resistencia a la tratamiento con fármacos como daunorrubicina, doxorrubicina, etopósido y mitoxantrona en cáncer de mama (Sullivan et al., 2008); para doxorrubicina en glioblastoma induciendo la

regulación de proteínas anti-apoptóticas como BCL-2, que inhibe la liberación de citocromo c, y survivina, que inhiben la activación de caspasas (Kim et al., 2011); para cisplatino, etopósido y doxorubicina en células de osteosarcoma, con una resistencia que no depende de la activación de HIF-1 o de la vía PI3K/Akt, pero sí de la actividad de p53 (Adamski et al., 2013).

Hemos sugerido que la respuesta al efecto citotóxico de los fármacos CPA e IFA depende de la expresión de HIF-1 α , de manera similar a lo mostrado previamente para vincristina y etopósido en neuroblastoma, donde HIF-1 α disminuye la expresión de la proteína pro-apoptótica Bid (Hussein et al., 2006); para gefitinib en cáncer de pulmón, con disminución de la acumulación de HIF-1 α mediante la vía PI3K/Akt (Rho et al., 2009); en cáncer de mama para doxorubicina por aumento de la expresión de la glicoproteína-P (Doublier et al., 2012), y en osteosarcoma para doxorubicina por la modulación de la apoptosis y el aumento de la glicoproteína-P (Roncuzzi et al., 2014).

7.4 Regulación del pH extracelular en condiciones de hipoxia

El pH extracelular se acidificó en células expuestas a hipoxia (1% de O₂, pH 6.8; 0.1% de O₂, pH 6.7) con respecto a la condición de normoxia. En este trabajo se estudió el efecto citotóxico de CPA e IFA, con características de ácidos débiles (pK_a 6.0 y 3.5-4, respectivamente), y se ha sugerido que la acidificación aumenta la entrada al interior celular de los fármacos que son ácidos débiles, como se mostró en células de cáncer de mama a un pH de 6.8 para los fármacos CPA, 5-FU y clorambucil (Mahoney et al., 2003).

Las características de la entrada a la célula de antineoplásicos se ajustan al modelo de captura de iones (*ion-trapping*) que predice que los fármacos básicos débiles como antraciclinas, antraquinonas o vinca alcaloides se concentran en compartimentos ácidos. El pH extracelular ácido en los tumores podría impedir la efectividad de fármacos básicos débiles al impedir alcanzar su objetivo intracelular, y reduciendo por lo tanto su citotoxicidad. El modelo de captura de iones también predice que el pH extracelular ácido en los tumores aumenta la absorción de fármacos ácidos débiles en el espacio intracelular neutro (Raghunand y Gillies, 2000; Mahoney et al., 2003)

La regulación de la acidez del pH extracelular puede estar asociada con la expresión de CA-IX, aumentada por ambas condiciones de hipoxia (1% y 0.1% O₂). Estudios previos indican que la hipoxia (2% de O₂ por 48 h) aumenta la expresión de CA-IX en células normales de riñón, lo que fue asociado con la acidificación del pH extracelular de 7.2 ± 0.2 a 6.4 ± 0.2 (Svastová et al., 2004). De manera relevante, la expresión de CA-IX en tejidos de pacientes con meduloblastoma se ha asociado con un peor pronóstico (Nordfors et al., 2010), ya que se ha propuesto que la expresión de CA-IX modula la adhesión celular mediada por la interacción de las proteínas E-cadherina y β -catenina, aumentando la progresión tumoral (Svastová et al., 2003). La CA-IX es expresada en diferentes tipos de cáncer como los de mama, pulmón, riñón, colon/recto, cérvix, cavidad oral, vejiga, hígado, cerebro, páncreas y gástrico, en los que se ha asociado con un mal pronóstico de los pacientes, y ha sido por lo tanto propuesta como un blanco terapéutico (Mahon et al., 2015).

Nuestros resultados también muestran que la expresión de MCT-4 aumentó en ambas condiciones de hipoxia (1% y 0.1% O₂), y para las células de cáncer de cérvix se ha reportado que la expresión de MCT-4 aumenta en hipoxia (1% de O₂) y que esta regulación depende de HIF-1 α (Ullah et al., 2006). La expresión de MCT-4 se ha identificado en glioblastoma (Goncalves et al., 2013), cáncer de páncreas (Baek et al., 2014) y cáncer gástrico (Lee et al., 2016), y se ha asociado con un mal pronóstico y por lo tanto ha sido también propuesta como un potencial blanco terapéutico (Bovenzi et al., 2015).

7.5 Expresión de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 en condiciones de hipoxia

La hipoxia (1% y 0.1% de O₂) disminuyó la expresión proteica de las isoformas del CYP CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 por las células DAOY. En el organismo humano, la 4-hidroxilación de CPA es realizada mayoritariamente por CYP2B6 (44.8%), CYP3A4 (24.7%) y CYP3A5 (~11.0%), mientras que la 4-hidroxilación de IFA es efectuada por CYP3A4 (64.8%), CYP3A5 (~8.0%) y CYP2B6 (6.5%) (Roy et al., 1999; 1999b; Huang et al., 2000).

En la reacción de 4-hidroxilación, CYP2B6 tiene valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) muy similares para CPA-4-OH (1.89 mM) e IFA-4-OH (1.88 mM), pero la velocidad máxima (V_{max}) es 10 veces mayor con CPA-4-OH (100.4 nmol/min/nmol P450) que con IFA-4-OH (10.1 nmol/min/nmol P450). De manera contraria, la V_{max} de CYP3A4 para IFA-4-OH (56.9 nmol/min/nmol P450) es 2 veces mayor que para CPA-4-OH (25.5 nmol/min/nmol P450), pero presenta valores similares de K_m (IFA-4-OH, 1.33 mM; CPA-4-OH, 1.46 mM; Huang et al., 2000). Por lo anterior, nuestros resultados sugieren que la disminución de la expresión de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 resultaría en metabolismo reducido de CPA e IFA y por lo tanto en una menor generación de los metabolitos activos, lo cual podría inducir resistencia a la quimioterapia del meduloblastoma en condiciones de hipoxia.

7.6 Mecanismo de regulación de la expresión de CYP

Los resultados indican que la hipoxia aumenta la expresión del RNAm de CYP2B6 pero regula negativamente su expresión proteica. Se ha identificado que la expresión proteica de CYP2B6 a nivel de proteína disminuye con el tratamiento por 3 h con [(Z)-1-[2-(2-aminoetil)-N-(2-amonioetil) amino] diazen-1-ilo-1,2-diolato], un donador de óxido nítrico (NO), sin alterar la expresión a nivel del RNAm. Este efecto ocurre post-traduccionalmente por la vía de señalización ubiquitina/proteosoma (Lee et al., 2007; 2017). Otro donador de NO (NOC-18) disminuye la expresión de la proteína de CYP2B6 en 30% con respecto al control, sin efecto a nivel del RNAm (Aitken et al., 2008). La hipoxia aumenta la producción de NO en distintos tipos de células tumorales (Matthews et al., 2001; Chowdhury et al., 2012; Burrows et al., 2016), pero se desconocen los niveles de NO en las células DAOY y el efecto que podrían tener en la expresión de la proteína CYP2B6 en condiciones de hipoxia.

Por otra parte, la hipoxia no modifica la expresión del RNAm de CYP3A4 pero disminuye la expresión del RNAm del CYP3A5, mientras que la expresión proteica de CYP3A4 y CYP3A5 disminuye para ambas en condiciones de hipoxia. Se ha mostrado que la fosforilación de CYP3A4 (Ser⁴⁷⁸, Thr²⁶⁴, y Ser⁴²⁰) es importante para favorecer la degradación vía ubiquitinación/proteosoma (Wang et al., 2009; 2011, 2014). También se ha

determinado que la expresión de los microRNAs hsa-miR-577, hsa-miR-1, hsa-miR-532-3p y hsa-miR-627 (Wei et al., 2014) y de la interleucina-6 (Jover et al., 2002) podría estar asociada con la disminución en la expresión proteica de CYP3A4. Para el caso de la isoforma CYP3A5 se desconoce qué mecanismo podría estar asociado con la regulación de la expresión.

7.7 Arresto celular en condiciones de hipoxia

Nuestros datos muestran una disminución de la proliferación de las células DAOY en condiciones de hipoxia (1% y 0.1% de O₂), un efecto semejante al reportado previamente para las células de cáncer de próstata (-24%; Anderson et al., 2011), de cáncer colorrectal (-83%; Murono et al., 2012) y de glioblastoma (-50%; Richards et al., 2016). La disminución de la proliferación puede asociarse con el arresto celular, como se ha indicado en estudios previos en los que la hipoxia indujo arresto en la fase G1 en células de cáncer de cérvix y de mama (Box y Demetrick, 2004), en células de cáncer de colon (Murono et al., 2012) y en células de retinoblastoma (Graff et al., 2005).

El arresto del ciclo celular es controlado por varias ciclinas, como CDKN1B, que induce arresto en la fase G1 (Sun et al., 2016). Nuestros resultados muestran que la hipoxia (1% y 0.1% O₂) aumentó la expresión de CDKN1B, efecto también reportado para células de cáncer de mama (Box y Demetrick, 2004) y encarcinoma endometrial (Horrée et al., 2007). Por lo tanto, HIF-1 α parece ser esencial para el arresto celular en la fase G1 al regular la alza la expresión de p21 y CDKN1B (p27), que controlan la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Goda et al., 2003; Horrée et al., 2007).

La expresión de CDKN1B ha sido asociada con la resistencia a doxorrubicina, etopósido, 5-FU y cisplatino en células de cáncer de colon (Dimanche et al., 1998); a paclitaxel, cisplatino y hidroperoxi-ciclofosfamida en células de cáncer de mama y en células de cáncer de ovario (St. Croix et al., 1996); y para etopósido, camptotecina, daunorrubicina, vinblastina, actinomicina D y cicloheximida en células de leucemia (Eymin et al., 1999). Así, una perspectiva de este trabajo sería evaluar la participación de CDKN1B en la resistencia al tratamiento con CPA e IFA en meduloblastoma.

7.8 Efecto de la inhibición con 2-ME de la expresión de HIF-1 α

El tratamiento con 2-ME disminuyó la expresión de HIF-1 α (-43%) por las células DAOY. Reportes previos indican que en condiciones de hipoxia el 2-ME redujo en ~60% la expresión de HIF-1 α en células de cáncer de próstata y de cáncer de mama (Mabjeesh et al., 2003); en células de cáncer gástrico la disminuyó en ~80% (Rohwer et al., 2009) y en células de cáncer de próstata en ~90% (Carbonaro et al., 2012). En este trabajo se utilizó una concentración de 2-ME (5 μ M) que no mostró efecto citotóxico, pero que disminuyó la expresión de HIF-1 α , con la finalidad de no producir otros efectos descritos para HIF-1 α , como la inducción de la apoptosis (Mooberry, 2003).

7.9 Regulación por 2-ME de la expresión de CA-IX y MCT-4

En este trabajo se muestra que la hipoxia aumenta la expresión de CA-IX, y que el tratamiento con 2-ME (5 μ M) reduce en 46% dicho efecto. Dado que la expresión de CA-IX inducida por hipoxia no es completamente prevenida por el 2-ME, podría mantenerse la acidificación del pH extracelular inducida por la hipoxia. Lo anterior podría también relacionarse con el resultado de una inhibición parcial por el 2-ME de la expresión de

HIF-1 α inducida por la hipoxia, dado que el factor transcripcional regula la expresión de CA-IX (Kaluz et al., 2009). En este sentido, la expresión de HIF-1 α se correlaciona con la expresión de CA-IX en cáncer de nasofaringe (Hui et al., 2002), en tumores de Wilms (Dungwa et al., 2011), en cáncer rectal (Korkeila et al., 2011), en cáncer de mama (Kaya et al., 2012) y en cáncer de cérvix (Iwasaki et al., 2015).

El tratamiento con 2-ME no afectó la inducción por la hipoxia de la expresión de MCT-4. En células de cáncer de cérvix la hipoxia (1% O₂) aumentó la expresión de MCT-4 en ~2 veces (Ullah et al., 2006), pero en células de cáncer de mama no modificó la expresión de MCT-4 (Jamali et al., 2015), lo que sugiere la existencia de mecanismos adicionales que regulan la expresión de MCT-4. Por ejemplo, la cinasa dependiente de AMP (AMPK) y la testosterona aumentan la expresión de MCT-1 y MCT-4 (Kitaoka et al., 2011). En células de osteosarcoma la hipoxia (1.5% O₂) induce la formación de

especies reactivas de O₂ que a su vez aumentan la concentración intracelular de Ca²⁺, lo que resulta en activación de la AMPK mediante la acción de la CaMKKβ (Mungai et al., 2011). Por otra parte, las ROS generadas por el complejo mitocondrial III estabilizan a HIF-1α en condiciones de hipoxia en células de hepatoma (Chandel et al., 2000). Por lo tanto la activación de AMPK y la generación de ROS podrían mantener la expresión de MCT-4 en ambas condiciones de hipoxia.

7.10 Regulación por 2-ME de la expresión de las isoformas de CYP

El tratamiento con 2-ME previno la inhibición por la hipoxia moderada (1% O₂) de la expresión de CYP2B6, pero no la inhibición por la hipoxia severa (0.1% O₂). Un proceso que puede explicar la respuesta diferencial de las dos condiciones de hipoxia es la regulación negativa por el óxido nítrico de la expresión de CYP2B6 observada en hepatocitos humano (Aitken et al., 2008), ya que se ha reportado que la hipoxia (1% O₂) aumenta la formación de óxido nítrico en células de cáncer de colon (Burrow et al., 2015).

El 2-ME previno la inhibición de la expresión de CYP3A4 inducida por ambas condiciones de hipoxia, lo que concuerda con el efecto inhibitorio de HIF-1α en la expresión de CYP3A4 (Legendre et al., 2009). Un mecanismo adicional de regulación transcripcional de CYP2B6 y CYP3A4 depende de receptores nucleares como CAR (receptor constitutivo de androstanos), PXR (receptor de pregnano X) y VDR (receptor de vitamina D) (Drocourt et al., 2002). Se ha determinado en células hepáticas que la hipoxia disminuye la expresión del RNAm de CAR y PXR (Legendre et al., 2009), por lo que la contribución de estos receptores nucleares a la expresión de CYP2B6 y CYP3A4 constituye un aspecto de interés para su evaluación futura.

En contraste, el 2-ME no previno la inhibición por hipoxia de la expresión de CYP3A5. En células de hepatoma, la expresión de CYP3A5 es regulada por el factor nuclear-Y (NF-Y) y las proteínas de especificidad 1 y 3 (Sp1 y Sp3) (Iwano et al., 2001), y se ha reportado que la hipoxia disminuye la expresión de Sp3, mientras que Sp1 no se modifica en miocitos, lo que podría explicar la disminución de CYP3A5 en ambas condiciones de hipoxia (Discher et al., 1998), y la ausencia de efecto del 2-ME.

7.11 Regulación por 2-ME de la proliferación celular

El 2-ME previno la inhibición de la proliferación celular inducida por la hipoxia, así como su efecto en la expresión de CDKN1B en la condición de 1% O₂, pero no en la condición de 0.1%. La regulación transcripcional de CDKN1B es regulado por la 3β-cinasa de la sintasa de glucógeno (GSK-3β) en células de cáncer gástrico (Wei et al., 2011), lo que podría explicar el aumento en la expresión de CDKN1B en la condición de hipoxia al 0.1% de O₂.

7.12 Efectividad del tratamiento de CPA e IFA en combinación con 2-ME

La combinación de 2-ME con CPA o IFA induce un efecto citotóxico aditivo, así como un aumento en la apoptosis en condiciones de hipoxia. Lo anterior concuerda con la aditividad en el efecto citotóxico de la combinación del 2-ME con doxorrubicina o bortezomib en células de mieloma múltiple (Chauhan et al., 2002; Song et al., 2013).

En línea con lo anterior, en el carcinoma de cabeza/cuello el tratamiento con 2-ME inhibe a HIF-1α, el crecimiento tumoral, y la angiogénesis, y el tratamiento combinatorio de 2-ME con paclitaxel resultó en un efecto antiproliferativo aditivo en células UM-SCC-6, -11A, y -46, y un efecto antiproliferativo sinérgico en células UM-SCC-1 y -11B, comparadas con el tratamiento individual (Ricker et al., 2004); en células de cáncer de mama el tratamiento con paclitaxel, vinorelbina o bis(etil)norspermina induce un efecto citotóxico sinérgico al combinarse con 2-ME (Han et al., 2005; Nair et al., 2007); y en células de cáncer pancreático el paclitaxel, 5-FU y cisplatino presentan un efecto citotóxico aditivo con 2-ME (Fotopoulou et al., 2010).

8. Conclusiones

1. En las células DAOY de meduloblastoma humano, la hipoxia (1% y 0.1% O₂; 24 h) aumenta la expresión del factor transcripcional HIF-1 α , y el análisis *in silico* indica la presencia de elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en las región del promotor (+1 a -3.5 kb) de los genes de las enzimas CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5.
2. La hipoxia (1% y 0.1% O₂) por 24 h induce la acidificación del pH extracelular, la expresión de las proteínas reguladoras del pH CA-IX y MCT-4, disminuye la expresión proteica de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5, induce arresto del ciclo celular en la fase G1 y resistencia al efecto citotóxico de los agentes alquilantes ciclofosfamida y la ifosfamida.
3. El tratamiento farmacológico con 2-Metoxiestradiol disminuye la expresión de HIF-1 α y CA-IX inducida por la hipoxia y reduce la resistencia a ciclofosfamida e ifosfamida inducida.
4. La inhibición farmacológica de HIF-1 α en combinación con agentes antineoplásicos canónicas indican una alternativa potencial terapéutica en contra de meduloblastoma humano al disminuir la resistencia al tratamiento con la quimioterapia convencional.

9. Perspectivas

1. Determinar *in vitro* la funcionalidad de los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) de los genes de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 predichos con el modelo *in silico*.
2. Evaluar la formación de los metabolitos activos (hidroxilados) de los antineoplásicos ciclofosfamida e ifosfamida en células de meduloblastoma humano sometidas a hipoxia.
3. Establecer el efecto de la inhibición molecular de HIF-1 α en la resistencia a los antineoplásicos ciclofosfamida e ifosfamida.
4. Evaluar en un modelo animal de meduloblastoma la eficacia de un nuevo esquema de tratamiento considerando la inhibición de HIF-1 α como nuevo blanco terapéutico.
5. Con base en lo anterior, considerar incorporar la inhibición farmacológica o molecular de HIF-1 α a un nuevo esquema de tratamiento con antineoplásicos como vincristina, carmustina, metotrexato, procarbazona, arabinósido A, etopósido, lomustina, cisplatino y carboplatino utilizados en la quimioterapia de meduloblastoma.

10. Referencias

1. Aarsen FK, Paquier PF, Reddingius RE et al (2006) Functional outcome after low-grade astrocytoma treatment in childhood. *Cancer*. 106(2):396-402.
2. Adamski J, Price A, Dive C, Makin G (2013) Hypoxia-induced cytotoxic drug resistance in osteosarcoma is independent of HIF-1 alpha. *PLoS ONE*. 8:e65304.
3. Aitken AE, Lee CM, Morgan ET (2008) Roles of nitric oxide in inflammatory down-regulation of human cytochromes P450. *Free Radic Biol Med*. 44:1161-1168.
4. Alfieri RR, Galetti M, Tramonti S et al (2011) Metabolism of the EGFR tyrosin kinase inhibitor gefitinib by cytochrome P450 1A1 enzyme in EGFR-wild type non small cell lung cancer cell lines. *Mol Cancer*. 10:143-157.
5. Anderson KM, Guinan P, Rubenstein M (2011) The effect of normoxia and hypoxia on a prostate (PC-3) CD44/CD41 cell side fraction. *Anticancer Res*. 3:487-494.
6. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR et al (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*. 279:38458-38465.
7. Arany Z, Huang LE, Eckner R, et al (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:12969-12973.
8. Araujo OL, Trindade KM, Trompieri NM et al (2011) Analysis of survival and prognostic factors of pediatric patients with brain tumor. *J Pediatr*. 87(5):425-432.
9. Baek G, Tse YF, Hu Z (2014). MCT4 defines a glycolytic subtype of pancreatic cancer with poor prognosis and unique metabolic dependencies. *Cell Rep*. 9:2233-2249.
10. Barnett JA, Urbauer DL, Murray GI et al (2007) CytochromeP450 1B1 expression in glial cell tumors: an immunotherapeutic target. *Clin Cancer Res*.3: 3559-3567.
11. Beaumont KA, Hill DS, Daignault SM (2016) Cell Cycle Phase-Specific Drug Resistance as an Escape Mechanism of Melanoma Cells.*J Invest Dermatol*. 136(7):1479-1489.

12. Bovenzi CD, Hamilton J, Tassone P et al (2015) Prognostic indications of elevated MCT4 and CD147 across cancer types: a meta-analysis. *BioMed Res Int.* 15:242437-242452.
13. Box AH, Demetrick DJ (2004) Cell cycle kinase inhibitor expression and hypoxia-induced cell cycle arrest in human cancer cell lines. *Carcinogenesis* 25:2325-2335.
14. Brüggemann SK, Kisro J, Wagner T (1997) Ifosfamide cytotoxicity on human tumor and renal cells: role of chloroacetaldehyde in comparison to 4-hydroxyifosfamide. *Cancer Res.* 57: 2676-2680.
15. Burrows N, Cane G, Robson M, et al. (2016) Hypoxia-induced nitric oxide production and tumour perfusion is inhibited by pegylated arginine deiminase (ADI-PEG20). *Sci Rep.* 6:22950.
16. Carbonaro M, Escuin D, O'Brate A, Thadani-Mulero M, Giannakakou P (2012) Microtubules regulate hypoxia-inducible factor-1 α protein trafficking and activity: implications for taxane therapy. *J Biol Chem.* 287:11859-11869.
17. Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to Hypoxia-Inducible Factor 1 α . *Mol Cell Biol.* 20:402-415.
18. Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L et al (2017) Intertumoral heterogeneity within medulloblastoma subgroups. *Cancer Cell.* 31(6):737-754.
19. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem.* 275:25130-25138.
20. Chauffert B, Dimanche-Boitrel MT, Garrido C (1998) New insights into the kinetic resistance to anticancer agents. *Cytotechnology.* 27(1-3):225-235.
21. Chauhan D, Catley L, Hideshima T (2002) 2-Methoxyestradiol overcomes drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood.* 100:2187-2194.
22. Chen L, Shi Y, Yuan J et al (2014) HIF-1 α overexpression correlates with poor overall survival and disease-free survival in gastric cancer patients. *PLoS ONE.* 9:e90678.

23. Chiche J, Brahimi Horn MC, Pouysségur J (2010) Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med.* 14:771-794.
24. Chowdhury R, Godoy LC, Thiantanawat A. et al. (2012) Nitric oxide produced endogenously is responsible for hypoxia-induced HIF-1 α stabilization in colon carcinoma cells. *Chem Res Toxicol.* 25(10):2194-2202.
25. Desjardins P, Conklin D (2010) NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp.* 45:2565-2569.
26. DeSouza RM, Jones BR, Lowis SP, Kurian KM (2014) Pediatric medulloblastoma - update on molecular classification driving targeted therapies. *Front Oncol.* 22(4):1-8.
27. Dimanche Boitrel M, Micheau O, Hamman A et al (1998) Contribution of the cyclin dependent kinase inhibitor p27 kip1 to the confluence dependent resistance of HT29 human colon carcinoma cells. *Int J Cancer.* 77:796–802.
28. Ding Z, Yang L, Xie X et al (2010) Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 136:1697-1707.
29. Discher DJ, Bishopric NH, Wu X, Peterson CA, Webster KA (1998) Hypoxia regulates beta-enolase and pyruvate kinase-M promoters by modulating Sp1/Sp3 binding to a conserved GC element. *J Biol Chem.* 273:26087-26093.
30. Donjerkovic D1, Scott DW (2000) Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Res.* 10(1):1-16.
31. Donovan L, Welford SM, Haaga J, LaManna J, Strohl KP (2010) Hypoxia implications for pharmaceutical developments. *Sleep breath.* 14:291-298.
32. Doublier S, Belisario DC, Polimeni M et al (2012) HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *BMC Cancer.* 12:4-19.

33. Drexler HG, Uphoff CC (2002) Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 39:75-90.
34. Drocourt L, Ourlin JC, Pascussi JM, Maurel P, Vilarem MJ (2002). Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes. *J Biol Chem*. 277:25125-25132.
35. Drozdowicz K, Long J, Winterbottom E, et al.(2017) Targeting SHH-Subgroup Medulloblastoma. *JSM Brain Sci*. 2(2): 1014.
36. Dungwa JV, Hunt LP, Ramani P (2011) Overexpression of carbonic anhydrase and HIF-1 α in Wilms tumours. *BMC Cancer*. 11:390-405.
37. El-Abaseri TB, El-Metwally TH, Iversen PL, Adrian TE (2015) Inhibition of cytochrome P450 and multidrug resistance proteins potentiates the efficacy of all-trans retinoic acid in pancreatic cancer in vitro and in vivo. *J Clin Exp Oncol*. 4:1-7.
38. Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ et al (2004) Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol*. 24:2875-2889.
39. Evans SM, Judy KD, Dunphy I et al (2004) Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin Cancer Res* 10:8177-8184.
40. Eymin B, Haugg M, Droin N et al (1999) p27Kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells. *Oncogene*. 18:1411-1418.
41. Fajardo Gutiérrez A, González Miranda G, Pachuca Vázquez A et al (2016) Cancer incidence and mortality in children in the Mexican Social Security Institute (1996-2013). *Salud Publica Mex*. 58(2):162-170.
42. Flamant L, Notte A, Ninane N, Raes M, Michiels C (2010) Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Mol Cancer*. 9:191-205.

43. Florea AM, Büsselberg D (2011) Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*. 3(1):1351-1371.
44. Fotopoulou C, Baumunk D, Schmidt SC, Schumacher G (2010) Additive growth inhibition after combined treatment of 2-methoxyestradiol and conventional chemotherapeutic agents in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res*. 30:4619-4624.
45. Friedman HS, Colvin M, Kaufmann SH, et al. (1992) Cyclophosphamide Resistance in Medulloblastoma. *Cancer Res*. 52: 5373-5378.
46. Gillies RJ, Schornack PA, Secomb TW, Raghunand N (1999) Causes and effects of heterogeneous perfusion in tumors. *Neoplasia*. 1:197-207.
47. Goda N, Ryan HE, Khadivi B (2003) Hypoxia-Inducible Factor 1 α is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol*. 23:359-369.
48. Goncalves V, Honavar M, Pinheiro C et al (2013) Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets. *Neuro-Oncology*. 15:172-188.
49. Graff P, Amellem O, Seim J, Stokke T, Pettersen EO (2005) The role of p27 in controlling the oxygen-dependent checkpoint of mammalian cells in late G1. *Anticancer Res*. 25:2259-2267.
50. Green SL, Freiberg RA, Giaccia AJ (2001) p21(Cip1) and p27(Kip1) regulate cell cycle reentry after hypoxic stress but are not necessary for hypoxia-induced arrest. *Mol Cell Biol*. 21(4):1196-1206.
51. Griffiths EA, Pritchard SA, Valentine HR et al (2007) Hypoxia-inducible factor-1 α expression in the gastric carcinogenesis sequence and its prognostic role in gastric and gastro-oesophageal adenocarcinomas. *Br J Cancer*. 96:95-103.
52. Gruber G, Greiner RH, Hlushchuk R et al (2004) Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter?. *Breast Cancer Res*. 6:191-198.

53. Guengerich FP (2003) Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv.* 3:194-204.
54. Guerreiro AS, Fattet S, Kulesza DW, et al. (2011) A sensitized RNA interference screen identifies a novel role for the PI3K p110 γ isoform in medulloblastoma cell proliferation and chemoresistance. *Mol Cancer Res.* 9(7):925-935.
55. Han GZ, Liu ZJ, Shimoi K, Zhu BT (2005) Synergism between the anticancer actions of 2-methoxyestradiol and microtubule-disrupting agents in human breast cancer. *Cancer Res.* 65:387-393.
56. Handschin C, Meyer U (2003) Induction of drug metabolism: The role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 55:649-673.
57. Hazin I, Dellatolas G, Garcia D et al (2010) Intellectual aspects of cognitive performance in children after treatment for medulloblastoma and astrocytoma. *Psychol Neurosci.* 3(2):183-187.
58. Höckel M, Vaupel P (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 93:266-276.
59. Holland AA (2013) Neuropsychological Comparison of pediatric medulloblastoma and pilocytic astrocytoma: existing knowledge and future directions. *New School Psych Bull.* 10(1): 1-20.
60. Horrée N, van Diest PJ, van der Groep P et al (2008) Progressive derailment of cell cycle regulators in endometrial carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 61:36-42. doi:10.1136/jcp.2006.043794.
61. Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS (2002) Sequence determinants in Hypoxia-Inducible Factor-1 α for hydroxylation by the Prolyl Hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem.* 277:39792-39800.
62. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7987-7992.

63. Huang Z, Roy P, Waxman DJ (2000) Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochem Pharmacol.* 59:961-972.
64. Hui EP, Chan AT, Pezzella F et al (2002) Coexpression of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res.* 8:2595-2604.
65. Hussein D, Estlin EJ, Dive C, Makin GW (2006) Chronic hypoxia promotes Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha-dependent resistance to etoposide and vincristine in neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther* 5:2241-2250.
66. Ingram WJ, Crowther LM, Little EB, et al. (2013) ABC transporter activity linked to radiation resistance and molecular subtype in pediatric medulloblastoma. *Exp Hematol Oncol.* 2(1):26.
67. Inoue K, Negishi M (2009). Early growth response 1 loops the CYP2B6 promoter for synergistic activation by the distal and proximal nuclear receptors CAR and HNF4 α . *FEBS Lett.* 583:2126-2130.
68. Istomin YP, Zhavrid EA, Alexandrova EN et al. (2008) Dose enhancement effect of anticancer drugs associated with increased temperature in vitro. *Exp Oncol.* 30(1):56-59.
69. Ivanov DP, Coyle B, Walker DA, Grabowska AM (2016). In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job. *J Biotechnol.* 236:10-25.
70. Iwano S, Saito T, Takahashi Y, Fujita K, Kamataki T (2001) Cooperative regulation of CYP3A5 gene transcription by NF-Y and Sp family members. *Biochem Biophys Res Comm.* 286:55-60.
71. Iwasaki K, Yabushita H, Ueno T, Wakatsuki A (2015). Role of hypoxia-inducible factor-1 α , carbonic anhydrase-IX, glucose transporter-1 and vascular endothelial growth factor associated with lymph node metastasis and recurrence in patients with locally advanced cervical cancer. *Oncol Lett.* 10:1970-1978.

72. Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM (1985) Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 44:472-485.
73. Jamali S, Klier M, Ames S et al (2015) Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX facilitates lactate flux in human breast cancer cells by non-catalytic function. *Sci Rep.* 5:13605-13621.
74. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A (2001) Induction of HIF-1 alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 15:1312-1314
75. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH (1996) Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol.* 271:1172-1180.
76. Jover R, Bort R, Gómez-Lechón MJ, Castell JV (2002) Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved. *FASEB J.* 16(13):1799-1801.
77. Kakde D, Jain D, Shrivastava V (2011) Cancer therapeutics- opportunities, challenges and advances in drug delivery. *J Appl Pharm Sci.* 1(09):01-10.
78. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 274:6519-6525.
79. Kaluz S, Kaluzová M, Liao S-Y, Lerman M, Stanbridge EJ (2009) Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: a one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim biophys acta.* 1795:162-172.
80. Kaya AO, Gunel N, Benekli M et al (2012) Hypoxia inducible factor-1 alpha and carbonic anhydrase IX overexpression are associated with poor survival in breast cancer patients. *J BUON.* 17:663-668.
81. Ke Q, Costa M (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 70(5):1469-1480.
82. Kieran MW (2014) Targeted treatment for sonic hedgehog-dependent medulloblastoma. *Neuro Oncol.* 16(8):1037-1047.

83. Kim JW, Ho WJ, Wu BM (2011) The role of the 3D environment in hypoxia-induced drug and apoptosis resistance. *Anticancer Res.* 31:3237-3245.
84. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y et al (2000) Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood.* 95:189-197.
85. Kitaoka Y, Machida M, Takemasa T, Hatta H (2011) Expression of monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in overloaded mice plantaris muscle. *J Physiol Sc.* 61:467-472.
86. Kool M, Korshunov A, Remke M, et al. (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.*123(4):473-484.
87. Korkeila EA, Sundström J, Pyrhönen S, Syrjänen K (2011) Carbonic anhydrase IX, hypoxia-inducible factor-1 α , ezrin and glucose transporter-1 as predictors of disease outcome in rectal cancer: multivariate Cox survival models following data reduction by principal component analysis of the clinicopathological predictors. *Anticancer Res.* 31:4529-4535.
88. Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S et al (2003) Expression of hypoxia-inducible factor-1 α is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer.* 105:176-181.
89. Lai Q, Wang T, Guo Q et al (2014) Positive correlation between the expression of hEag1 and HIF-1 α in breast cancers: an observational study. *BMJ Open.* 4:e005049.
90. Leary SE, Olson JM (2012) The molecular classification of medulloblastoma: driving the next generation clinical trials. *Curr Opin Pediatr.* 24(1):33-39.
91. Lee CM, Kim BY, Li L, Morgan ET. (2007) Nitric oxide-dependent proteasomal degradation of cytochrome P450 2B proteins. *J Biol Chem.* 283(2):889-898.
92. Lee CM, Tripathi S, Morgan ET. (2017) Nitric oxide-regulated proteolysis of human CYP2B6 via the ubiquitin-proteasome system. *Free Radic Biol Med.* 108:478-486.

93. Lee JY, Lee I, Chang WJ et al (2016) MCT4 as a potential therapeutic target for metastatic gastric cancer with peritoneal carcinomatosis. *Oncotarget*. 7:43492-43503.
94. Legendre C, Hori T, Loyer P et al (2009) Drug-metabolising enzymes are down-regulated by hypoxia in differentiated human hepatoma HepaRG cells: HIF-1 alpha involvement in CYP3A4 repression. *Eur J Cancer*. 45:2882-2892.
95. Li J, Vervoorts J, Carloni P, Rossetti G, Lüscher B (2017) Structural prediction of the interaction of the tumor suppressor p27KIP1 with cyclin A/CDK2 identifies a novel catalytically relevant determinant. *BMC Bioinformatics*. 18:15-23.
96. Liu L, Ning X, Sun L et al (2008) Hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Sci*. 99:121-128.
97. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods*. 25:402-408.
98. Longley DB, Allen WL, McDermott U et al (2004) The roles of thymidylate synthase and p53 in regulating Fas-mediated apoptosis in response to antimetabolites. *Clin Cancer Res* 10:3562-3571.
99. Louis DN, Perry A, Reifenberger G et al (2016) The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol*. 131:803-820.
100. Luoto KR, Kumareswaran R, Bristow RG (2013) tumor hypoxia as a driving force in genetic instability. *Genome Integr*. 4(1):5
101. Luqmani YA (2005) Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract*. 1:35-48.
102. Mabjeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM (2003) 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell*. 3:363-375.
103. Mahon BP, Pinard MA, McKenna R (2015) Targeting carbonic anhydrase IX activity and expression. *Molecules*. 20:2323-2348.

104. Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B, Gillies RJ (2003) Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochem Pharmacol.* 66:1207-1218.
105. Massimino M, Biassoni V, Gandola L et al (2016) Childhood medulloblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 105:35-51.
106. Massimino M, Giangaspero F, Garrè ML et al., (2011) Childhood medulloblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 79 (2011): 65-83.
107. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *The EMBO J.* 20:5197-5206.
108. Maston GA, Evans SK, Green MR (2006) Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 7:29-59.
109. Mathijssen RH, de Jong FA, van Schaik RH et al (2004) Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. *J Natl Cancer Inst.* 96:1585-1592.
110. Matthews NE, Adams MA, Maxwell LR. (2001) Nitric oxide-mediated regulation of chemosensitivity in cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 93(24):1879-1885.
111. McFadyen MC, Melvin WT, Murray GI (1997). Cytochrome P450 in normal human brain and brain tumours. *Biochem Soc Trans.* 25: S577.
112. McFadyen MC, Melvin WT, Murray GI (2004) Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther.* 3:363-371.
113. McKeown SR (2014) Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours - implications for treatment response. *Br J Radiol.* 87:1-12.
114. Michael M, Doherty MM (2005) Tumoral drug metabolism: Overview and its implications for cancer therapy. *J Clin Oncol.* 23:205-229.
115. Minchinton AI, Tannock IF (2006) Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer.*6:583-592. doi:10.1038/nrc1893.

116. Mitby PA, Robison LL, Whitton JA et al (2003) Utilization of special education services and educational attainment among long-term survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Cancer*. 1 97(4):1115-1126.
117. Miyoshi Y, Ando A, Takamura Y et al (2002) Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues. *Int J Cancer*. 97:129-132.
118. Mooberry SL (2003) Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments. *Drug Resist Updat*. 6:355-361.
119. Morfouace M, Cheepala S, Jackson S et al (2015) ABCG2 Transporter expression impacts Group 3 medulloblastoma response to chemotherapy. *Cancer Res*. 75(18):3879-3889.
120. Motwani M, Delohery TM, Schwartz GK (1999) Sequential dependent enhancement of caspase activation and apoptosis by flavopiridol on paclitaxel-treated human gastric and breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 5(7):1876-1883.
121. Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A et al (2011) Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. *Mol Cell Biol*. 31:3531-3545.
122. Murono K, Tsuno NH, Kawai K et al (2012) SN-38 overcomes chemoresistance of colorectal cancer cells induced by hypoxia, through HIF1 alpha. *Anticancer Res*. 32:865-872.
123. Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC (1997) Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res*. 57:3026-3031.
124. Nair SK, Verma A, Thomas TJ et al (2007) Synergistic apoptosis of MCF-7 breast cancer cells by 2-Methoxyestradiol and Bis(ethyl)norspermine. *Cancer Lett*. 250:311-322.
125. Narjoz C, Favre A, McMullen J et al (2014) Important role of CYP2J2 in protein kinase inhibitor degradation: a possible role in intratumor drug disposition and resistance. *PLoS ONE*. 9:e95532.
126. Nordfors K, Haapasalo J, Korja M et al (2010) The tumour-associated carbonic anhydrases CA II, CA IX and CA XII in a group of medulloblastomas and

- supratentorial primitive neuroectodermal tumours: an association of CA IX with poor prognosis. *BMC Cancer*. 10:148-158.
127. Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy S (2017) The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature*. 547(7663):311-317.
 128. Northcott PA, Dubuc AM, Pfister S, Taylor MD (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma. *Expert Rev Neurother*.12(7):871-884.
 129. Ohta I, Gorai I, Miyamoto Y, et al. (2001) Cyclophosphamide and 5-fluorouracil act synergistically in ovarian clear cell adenocarcinoma cells. *Cancer Lett*. 162 (1): 39-48.
 130. Othman RT, Kimishi I, Bradshaw TD et al (2014) Overcoming multiple drug resistance mechanisms in medulloblastoma. *Acta Neuropathol Commun*. 2(57):1-14.
 131. Packer RJ, Finlay JL (1996) Chemotherapy for Childhood Medulloblastoma and Primitive Neuroectodermal Tumors. *Oncologist*. 1(6):381-393.
 132. Palmer SL (2008) Neurodevelopmental impacts on children treatment for medulloblastoma: a review and proposed conceptual model. *Developmental disabilities research reviews*. 14:203-210.
 133. Palmer SL, Reddick WE, Gajjar A (2007) Understanding the cognitive impact on children who are treated for medulloblastoma. *J Pediatr Psychol*. 32:1040-1049.
 134. Pawlak A, Rapak A, Zbyryt I, Obmińska-Mrukowicz B (2014) The effect of common antineoplastic agents on induction of apoptosis in canine lymphoma and leukemia cell lines. *In Vivo*. 28(5):843-850.
 135. Plant N (2007). The human cytochrome P450 sub-family: transcriptional regulation, inter-individual variation and interaction networks. *Biochim Biophys Acta*. 1770:478-488.
 136. Ponce de León F, Castro Sierra E, Perezpeña Diazconti M et al (2006) Tumores intracraneanos del niño. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 63: 367-381.
 137. Primeau AJ, Rendon A, Hedley D, Lilge L, Tannock IF (2005). The distribution of the anticancer drug doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Clin Cancer Res*. 11:8782-8788.

138. Rae JM, Sikora MJ, Henry NL et al (2009) Cytochrome P450 2D6 activity predicts discontinuation of tamoxifen therapy in breast cancer patients. *The pharmacogenomics J.* 9:258-264.
139. Raghunand N, Gillies RJ (2000) pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist Updat.* 3:39-47.
140. Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, et al. (2016) Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol.* 131(6):821-831.
141. Rho JK, Choi YJ, LEE JK, Ryoo BY, Na III (2009) Gefitinib circumvents hypoxia-induced drug resistance by the modulation of HIF-1. *Oncol Reports* 21:801-807.
142. Richards R, Jenkinson MD, Haylock BJ, See V (2016) Cell cycle progression in glioblastoma cells is unaffected by pathophysiological levels of hypoxia. *Peer J.* 4:e1755.
143. Ricker JL, Chen Z, Yang XP, Pribluda VS, Swartz GM, Van Waes C (2004) 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1 alpha, tumor growth, and angiogenesis and augments paclitaxel efficacy in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 10:8665-8673.
144. Ricotti L, Barzanti F, Tesei A, et al. (2000) Combined 4-hydroxy-ifosfamide and vinorelbine treatment in established and primary human breast cell cultures. *Ann Oncol.* 11(5):587-594.
145. Rios EJ, Fallon M, Wang J, Shimoda LA (2005). Chronic hypoxia elevates intracellular pH and activates Na⁺/H⁺ exchange in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289:867-874.
146. Rivera Luna R, Cárdenas Cardos R, Olaya Vargas A et al (2015) El niño de población abierta con cáncer en México.Consideraciones epidemiológicas. *An Med Mex.* 60: 91-97.
147. Rivera Luna R, Niembro Zúñiga AM, Zarco A et al (2007) Medulloblastoma en pediatría. Pronóstico y tratamiento en la actualidad. *Gac Méd Méx.* 143:415-420.

148. Rivera Luna R, Shalkow-Klincovstein J, Velasco-Hidalgo L et al (2014) Descriptive epidemiology in Mexican children with cancer under an open national public health insurance program. *BMC Cancer*. 14:790-798.
149. Rivera Luna R, Correa-González C, Altamirano-Alvarez E et al (2013) Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *Int J Cancer*. 132:1646-1650.
150. Rodriguez Antona C, Ingelman Sundberg M (2006) Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*. 25:1679-1691.
151. Rohwer N, Dame C, Haugstetter A et al (2010) Hypoxia-Inducible Factor 1 α determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF- κ B. *PLoS ONE*. 5:e12038.
152. Rohwer N, Lobitz S, Daskalow K et al (2009) HIF-1 α determines the metastatic potential of gastric cancer cells. *Br J Cancer*. 100:772-781.
153. Roncuzzi L, Pancotti F, Baldini N (2014) Involvement of HIF-1 α activation in the doxorubicin resistance of human osteosarcoma cells. *Oncol Rep*. 32:389-394.
154. Rossi A, Caracciolo V, Russo G, Reiss K, Giordano A (2008) Medulloblastoma: from molecular pathology to therapy. *Clin Cancer Res*. 14(4): 971-976.
155. Roy P, Tretyakov O, Wright J, Waxman DJ (1999) Stereoselective metabolism of ifosfamide by human P-450s 3A4 and 2B6. Favorable metabolic properties of R-enantiomer. *Drug Metab Dispos*. 27:1309-1318.
156. Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ (1999). Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metab Dispos*. 27:655-666.
157. Rutkowski S, Bode U, Deinlein F et al (2005) Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. *N Engl J Med*. 352:978-986.
158. Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its

- stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 272:22642-22647.
159. Sang N, Fang J, Srinivas V, Leshchinsky I, Caro J (2002) Carboxyl-terminal transactivation activity of Hypoxia-Inducible Factor 1 α is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. *Mol Cell Biol.* 22:2984-2992.
 160. Schmidt R, Baumann F, Knüpfer H et al (2004) CYP3A4, CYP2C9 and CYP2B6 expression and ifosfamide turnover in breast cancer tissue microsomes. *Br J Cancer.* 90:911-916.
 161. Schwalbe EC, Lindsey JC, Nakjang S, et al. (2017) Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *Lancet Oncol.* 18(7):958-971.
 162. Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3:721-732.
 163. Semenza GL, Wang GL (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 12:5447-5454.
 164. Shimoda LA, Fallon M, Pisarcik S, Wang J, Semenza GL (2006) HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalinization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 291:941-949.
 165. Shinwari Z, Al-Hindi H, Al-Shail E et al (2011) Response of medulloblastoma cells to vincristine and lomustine: role of TRKC, CTNNB1 and STK15. *Anticancer Res.* 31(5):1721-1733.
 166. Singh N, Nigam M, Ranjan V, et al. (2009) Caspase mediated enhanced apoptotic action of cyclophosphamide- and resveratrol-treated MCF-7 cells. *J Pharmacol Sci.* 109(4):473-485.
 167. Song IS, Jeong YJ, Jeong SH et al (2013) Combination treatment with 2-methoxyestradiol overcomes bortezomib resistance of multiple myeloma cells. *Exp Mol Med.* 45:e50-59.

168. St Croix B, Flørenes VA, Rak JW (1996) Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med.* 2:1204-1210.
169. Stavrinou P, Mavrogiorgou M-C, Polyzoidis K et al (2015) Expression profile of genes related to drug metabolism in human brain tumors. *PLoS ONE.* 10:e0143285.
170. Storme T, Deroussent A, Mercier L, et al. (2009) New ifosfamide analogs designed for lower associated neurotoxicity and nephrotoxicity with modified alkylating kinetics leading to enhanced in vitro anticancer activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 328(2):598-609.
171. Strese S, Fryknäs M, Larsson R, Gullbo J (2013) Effects of hypoxia on human cancer cell line chemosensitivity. *BMC Cancer.* 13:331-342.
172. Sullivan R, Paré GC, Frederiksen LJ et al (2008). Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Cancer Ther* 7:1961-1973.
173. Sun C, Wang G, Wrighton KH et al (2016). Regulation of p27Kip1 phosphorylation and G1 cell cycle progression by protein phosphatase PPM1G. *Am J Cancer Res.* 6:2207-2220.
174. Suryo Rahmanto A, Savov V, Brunner A, et al. (2016) FBW7 suppression leads to SOX9 stabilization and increased malignancy in medulloblastoma. *EMBO J.* 35(20):2192-2212.
175. Svastová E, Hulíková A, Rafajová M et al (2004) Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* 577:439-445.
176. Svastová E, Zilka N, Zatóvicová M et al (2003) Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp Cell Res.* 290:332-345
177. Swift LH, Golsteyn RM (2014) Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int J Mol Sci.* 15(3):3403-3431.

178. Takahata T, Ookawa K, Suto K et al (2008) Chemosensitivity determinants of irinotecan hydrochloride in hepatocellular carcinoma cell lines. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 102:399-407.
179. Talks KL, Turley H, Gatter KC et al (2000) The expression and distribution of the Hypoxia-Inducible Factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* 157:411-421.
180. Tan BS, Tiong KH, Muruhadas A (2011) CYP2S1 and CYP2W1 mediate 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-fluorobenzothiazole (GW-610, NSC 721648) sensitivity in breast and colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 10:1982-1992.
181. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L (2000) Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *The EMBO J.* 19:4298-4309.
182. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A et al (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* 123:465-472.
183. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF (2007) Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 99:1441-1454.
184. Uchida T, Rossignol F, Matthay MA et al (2004) Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 α . *J Biol Chem.* 279:14871-14878.
185. Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem.* 281:9030-9037.
186. Vaupel P (2004) The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist.* 5:10-17.
187. von Bueren AO, Oehler C, Shalaby T, et al. (2011) c-MYC expression sensitizes medulloblastoma cells to radio- and chemotherapy and has no impact on response in medulloblastoma patients. *BMC Cancer.* 11:74.

188. Wang D, Wang H (2012) Oxazaphosphorine bioactivation and detoxification: the role of xenobiotic receptors. *Acta Pharm Sin B.* 2:107-117.
189. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:5510-5514.
190. Wang Y, Guan S, Acharya P, et al. (2011) Multisite phosphorylation of human liver cytochrome P450 3A4 enhances Its gp78- and CHIP-mediated ubiquitination: a pivotal role of its Ser-478 residue in the gp78-catalyzed reaction. *Mol Cell Proteomics.* 11(2):M111.010132.
191. Wang Y, Kim SM, Trnka MJ, et al. (2014) Human liver cytochrome P450 3A4 ubiquitination: molecular recognition by UBC7-gp78 autocrine motility factor receptor and UbCH5a-CHIP-Hsc70-Hsp40 E2-E3 ubiquitin ligase complexes. *J Biol Chem.* 290(6):3308-3332.
192. Wang Y, Liao M, Hoe N, et al. (2009) A role for protein phosphorylation in cytochrome P450 3A4 ubiquitin-dependent proteasomal degradation. *J Biol Chem.* 284(9):5671-5684.
193. Warnke PC, Kopitzki K, Timmer J, Ostertag CB (2006) Capillary physiology of human medulloblastoma: impact on chemotherapy. *Cancer* 107:2223-2227.
194. Wei M, Wang Z, Yao H et al. (2011) P27Kip1 regulated by glycogen synthase kinase-3 β , results in HMBA-induced differentiation of human gastric cancer cells. *BMC Cancer.*11:109-121.
195. Wei Z, Jiang S, Zhang Y, et al. (2014) The effect of microRNAs in the regulation of human CYP3A4: a systematic study using a mathematical model. *Sci Rep.* 4:4283.
196. Wilk A, Waligorska A, Waligorski P, et al. (2012) Inhibition of ER β induces resistance to cisplatin by enhancing Rad51-mediated DNA repair in human medulloblastoma cell lines. *PLoS ONE* 7(3): e33867.
197. Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ, Gillies RJ (2011) Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Mol Pharm.* 8(6):2032-2038.

198. Wu HM, Jiang ZF, Ding PS, Shao LJ, Liu RY (2015) Hypoxia-induced autophagy mediates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Sci Rep.* 5:12291-12205.
199. Xu J, Erdreich-Epstein A, Gonzalez-Gomez I et al (2012) Novel cell lines established from pediatric brain tumors. *J Neuro-Oncology.* 107:269-280. doi:10.1007/s11060-011-0756-5.
200. Zanger UM, Schwab M (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 138:103-141.
201. Závada J, Zavadová Z, Zatovičová M, Hyršl L, Kawaciuk I (2003) Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer.* 89:1067-1071.
202. Zhang J, Tian Q, Zhou SF (2006) Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. *Curr Drug Therapy.* 1:55-84.
203. Zhao F, Ohgaki H, Xu L et al. (2016) Molecular subgroups of adult medulloblastoma: a long-term single-institution study. *Neuro Oncol.* 18(7):982-990.
204. Zhou D, Lu Y, Steiner MS, Dalton JT (2000) Cytochrome P-450 2C9 sensitizes human prostate tumor cells to cyclophosphamide via a bystander effect. *Antigen Chem.* 44(10): 2659–2663.
205. Zhou J, Giannakakou P (2005) Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 5(1):65-71.
206. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G (2013) Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity.* 39(1):74-88.

11. Anexos

11.1 Anexo 1. Características de células DAOY de meduloblastoma humano.

Las células DAOY de meduloblastoma pertenecen al tipo histológico desmoplásico, y la línea celular fue establecida a partir de un niño varón de 4 años. Presentan ploidías superiores al 2n y trece o más cromosomas marcadores con dos a cuatro copias por célula. Existen dos cromosomas X normales en la mayoría de las células, pero ningún cromosoma Y normal detectable (www.atcc.org/Products/All/HTB-186.aspx#characteristics). La Figura A1 muestra que las células DAOY presentan formas poligonales regulares con núcleos grandes y múltiples nucléolos; además, las células indiferenciadas muestran uniones intercelulares y cilios (Jacobsen et al., 1985).

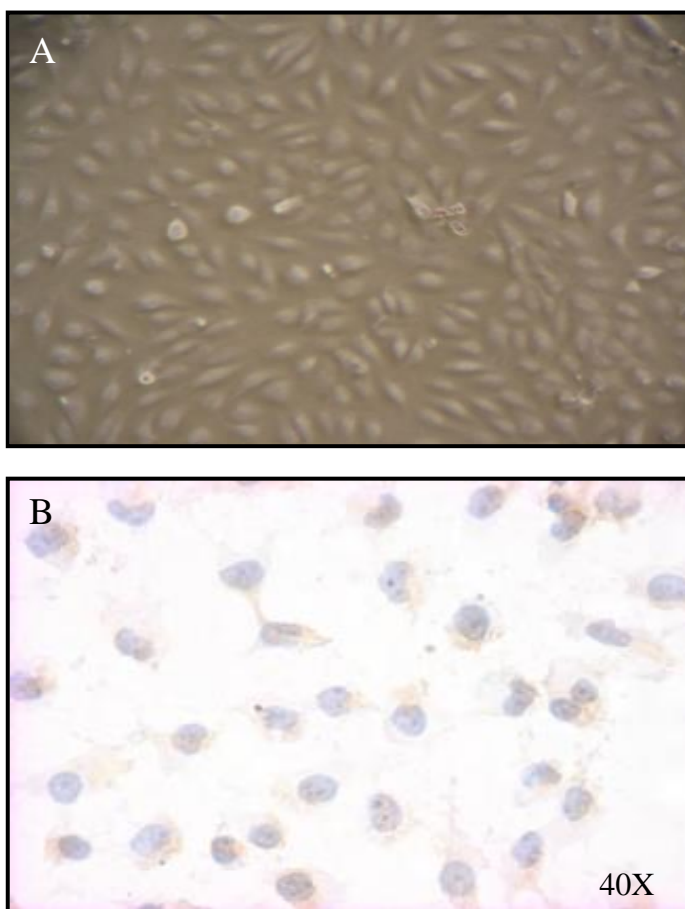


Figura A1. Imagen de alta confluencia (A) e inmunocitoquímica con hematoxilina-eosina (B) de células DAOY de meduloblastoma humano (HTB-186, ATCC).

11.2 Anexo 2. Curva de proliferación de las células DAOY.

La proliferación fue evaluada con el ensayo de exclusión de azul de tripán. La curva de crecimiento mostró una fase de latencia de las 0 h a las 24 h, una fase lineal de las 24 h a las 96 h, y una fase estacionaria o incluso de muerte celular después de las 96 h (Figura A2). El tiempo de duplicación determinado fue 28.5 ± 1.4 h (3 determinaciones), semejante al reportados por Xu et al. (2012) de 29 h y por Jacobsen et al. (1985) de 33.6 h.

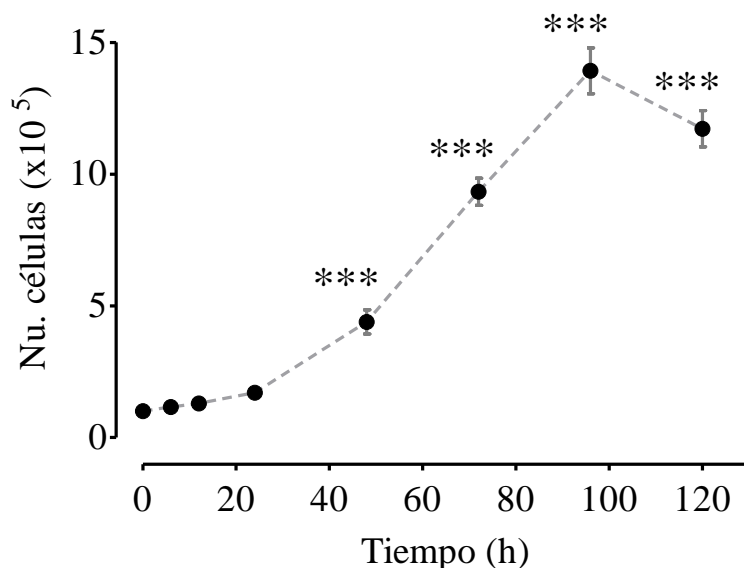


Figura A2. Curva de proliferación de las células DAOY. Los valores son el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett, *** $P < 0.001$ versus 0 h (control).

11.3 Anexo 3. Detección de micoplasma en células DAOY.

Se utilizaron cubreobjetos previamente tratados con poli-L-isina (Sigma-Aldrich) y esterilizados, que fueron colocados dentro de cajas Petri de 35 mm. Las células DAOY (4 x 10³ células/caja de 35 mm) fueron sembradas en 2 ml en medio EMEM suplementado con 10% FBS para incubar a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ por 72 h. Se retiró el medio de cultivo y se agregaron 2 ml de solución de fijación (ácido acético glacial/metanol absoluto, 1:3) y Tritón X-100 (0.1%) por 5 min. Las células fueron lavadas cinco veces con solución PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaHPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 1 ml de solución de tinción Hoechst-33258 (0.5 µg/ml) por 30 min. Los cubreobjetos fueron cubiertos con portaobjetos y se obtuvieron imágenes con un microscopio Olympus BX-40 (Feasterville, PA, USA) y el programa FV10-ASW 1.7 (Olympus; Miami, FL, USA).

Los micoplasmas son un grupo de microorganismos de la clase *Mollicutes* que carecen de pared celular y con un tamaño de 0.3-0.8 µm. Los cultivos celulares contaminados con micoplasmas pueden alterar la expresión de proteínas, la morfología, y la proliferación, entre otras procesos que pueden resultar en la pérdida del cultivo celular (Drexler y Uphoff, 2002). La Figura A3 (panel A y B) muestra que las células DAOY (pasaje 5) no estaban contaminadas con micoplasmas. El panel C muestra células CHO-K1 contaminadas que fueron utilizadas como control positivo. Las células CHO-K1 fue amablemente obsequiadas por el Dr. Daniel McNaught Flores.

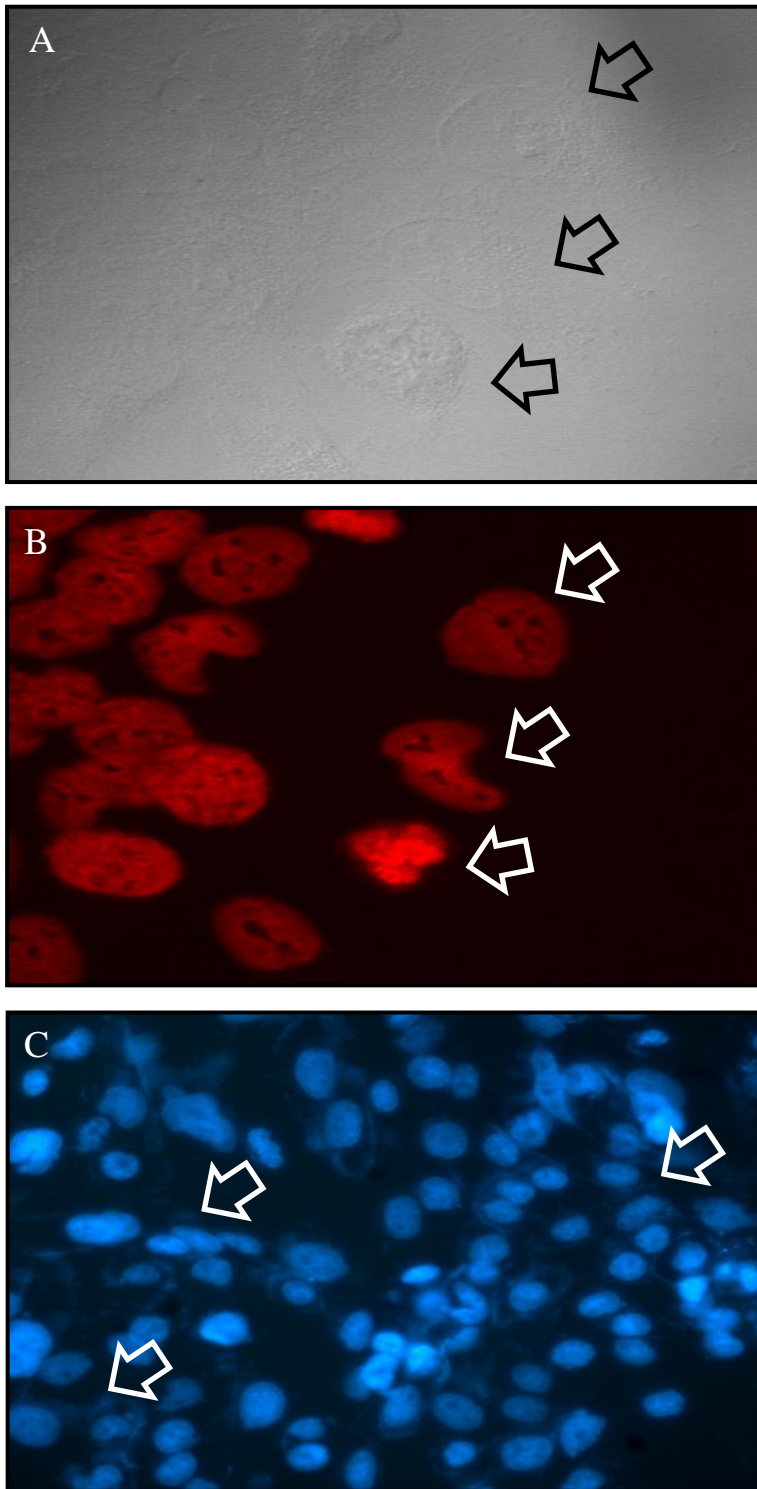


Figura A3. Prueba de detección de micoplasma en células de DAOY. Tinción con Hoechst-33258 y análisis con microscopía confocal. Morfología celular (A) y tinción de los núcleos celulares (rojo, B). El ensayo fue realizado por duplicado. El panel C es un control positivo (células CHO-K1 contaminadas).

11.4 Anexo 4. Establecimiento de las condiciones de hipoxia.

Se utilizó una cámara hipóxica Bactrox en la que las células fueron expuestas a 1% o 0.1% de O₂, balanceado con N₂ y CO₂, e incubadas en una cámara húmeda a 37°C con 5% CO₂ en aire. La condición control o normoxia se consideró como 16.2% de O₂.

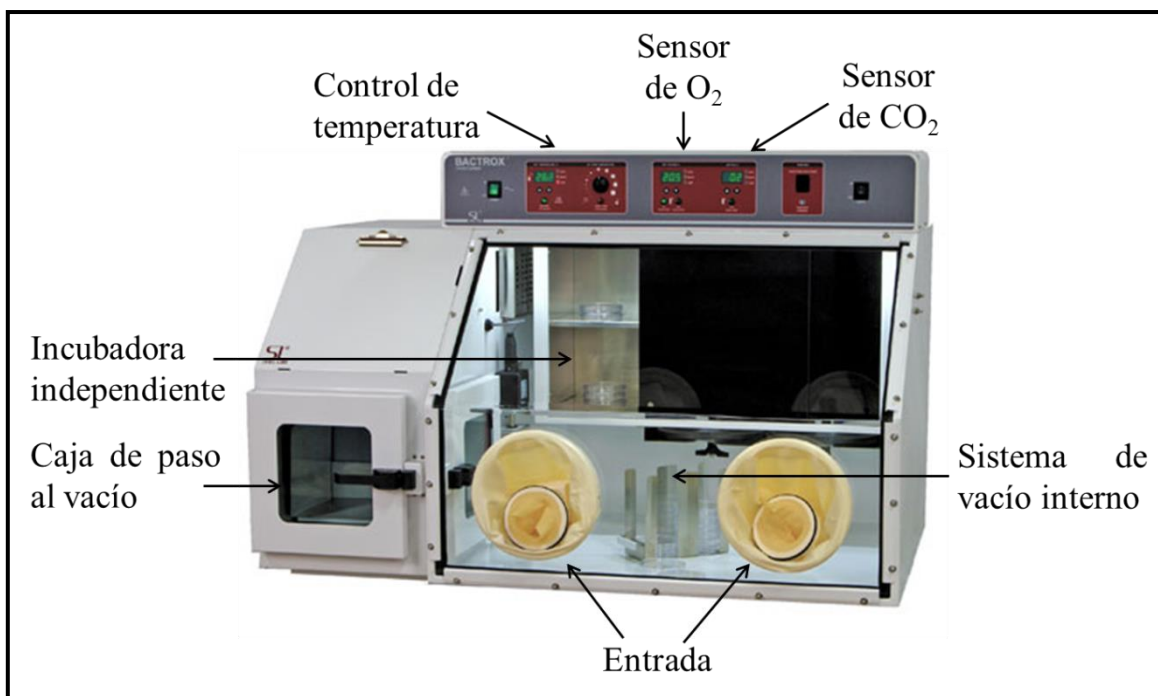
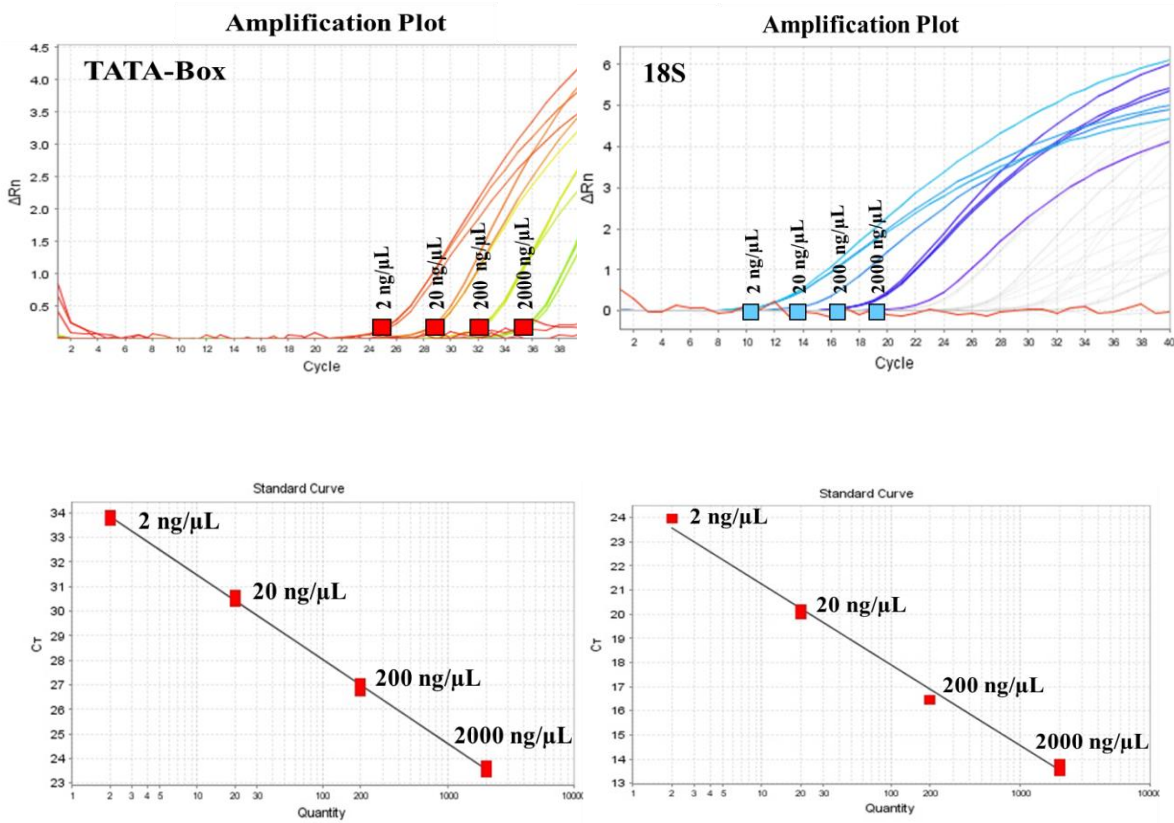


Figura A4. Cámara de hipoxia (Bactrox hypoxic chamber, Shel Labs, USA). Las células previamente sembradas en cajas de cultivo son colocadas dentro de la incubadora independiente bajo las condiciones de incubación con control de temperatura, O₂ y CO₂.

11.5 Anexo 5. Curvas estándar de genes endógenos (*house-keeping*).

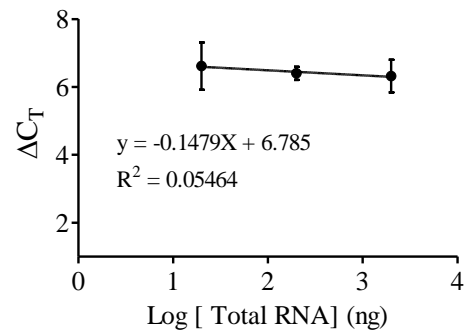
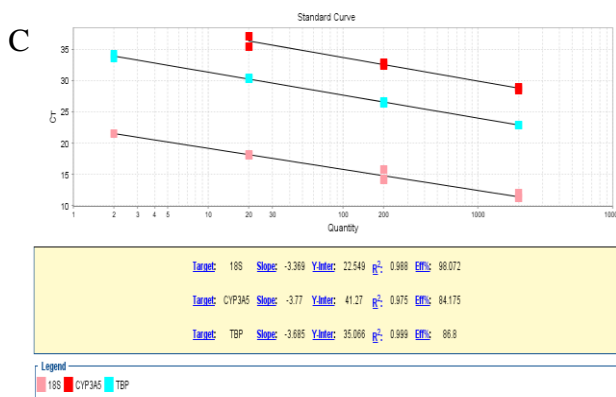
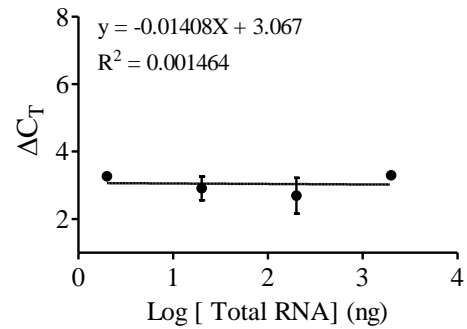
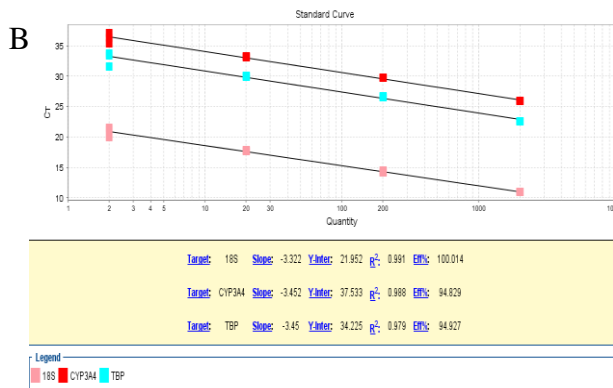
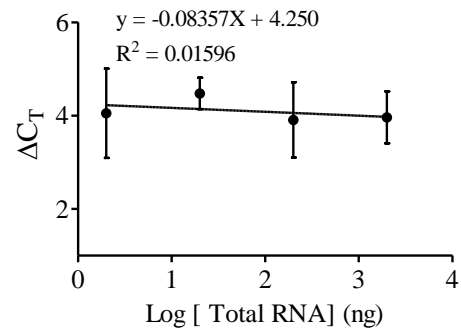
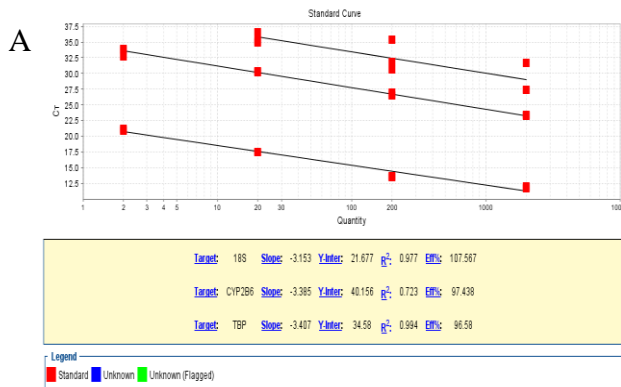
Las curvas estándar fueron obtenidas para los genes endógenos TATA-Box (TBP) y 18S, con intervalo de concentración de 2 a 2000 ng/μl.



| Características | TBP | 18S |
|-----------------|-------|-------|
| Pendiente | -3.42 | -3.34 |
| R ² | 0.99 | 0.99 |
| Eficiencia | 96% | 99% |

11.6 Anexo 6. Curva estándar y validación de la eficiencia de CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5.

Para cada gen se determinó la curva de validación ($-0.1 > m < 0.1$) con TBP como gen de referencia en los experimentos posteriores para CYP2B6 (A), CYP3A4 (B) y CYP3A5 (C).



11.7 Anexo 7. Concentración y pureza del RNA total de células DAOY expuestas a normoxia o hipoxia.

| Normoxia | ng/μl | 260/280 nm | 260/230 nm |
|-----------------|--------------|-------------------|-------------------|
| Exp. 1 | 2585.6 | 1.99 | 1.92 |
| Exp. 2 | 2241.2 | 1.99 | 1.92 |
| Exp. 3 | 2972.7 | 1.99 | 2.03 |

| 1% O₂ | ng/μl | 260/280 nm | 260/230 nm |
|-------------------------|--------------|-------------------|-------------------|
| Exp. 1 | 1312.8 | 2.02 | 2.19 |
| Exp. 2 | 1311.4 | 2.01 | 2.18 |
| Exp. 3 | 1395.3 | 2.02 | 1.73 |

| 0.1% O₂ | ng/μl | 260/280 nm | 260/230 nm |
|---------------------------|--------------|-------------------|-------------------|
| Exp. 1 | 1133.6 | 1.99 | 2.02 |
| Exp. 2 | 1142.2 | 1.99 | 2.18 |
| Exp. 3 | 1025.1 | 2.00 | 2.04 |

11.8 Anexo 8. Integridad del RNA total en geles de agarosa.

Las células DAOY fueron incubadas en condiciones de normoxia (16.2% O₂) o hipoxia (1% y 0.1% O₂) por 24 h, e inmediatamente después fue obtenido el RNA total. La pureza del RNA total fue determinada por la relación de absorbancia 260/280 nm, que corresponde a ~2.0 (Desjardins y Conklin, 2010). La integridad de las muestras de RNA total se determinó en geles de agarosa al 1.5% (w/v) en solución TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA). En cada pozo se colocaron 5 µl de la muestra (dilución 1:10) y 3 µl de solución de carga (50 mM EDTA, 0.2% SDS, 50% glicerol, 0.05% azul de bromofenol). La electroforesis fue realizada a 85 V por 40 min, los geles fueron incubados en bromuro de etidio (5 mg/ml) por 15 min y visualizados bajo luz UV. La Figura A8 muestra la separación de las muestras de RNA total, observándose las bandas ribosomales 28S y 18S, sin evidencia de degradación. Estos resultados indicaron que la pureza y la integridad fueron las adecuadas para utilizar las muestras para la síntesis de cDNA.

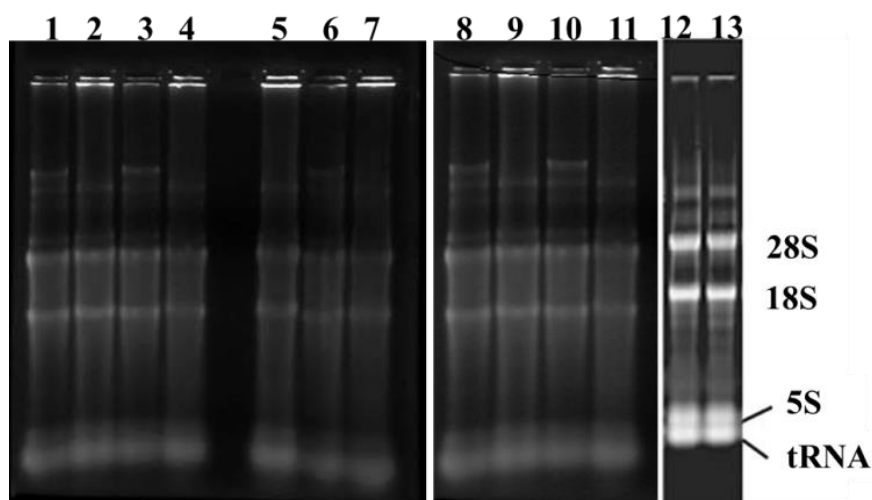


Figura A8. RNA total en geles de agarosa al 1.5%. Carriles 1 y 8, células de cáncer de cérvix HeLa. Carriles 2, 5, 9: células DAOY incubadas en normoxia; carriles 3, 6 y 10: células DAOY incubadas en 1% de O₂; carriles 4, 7 y 11: células DAOY incubadas en 0.1% de O₂; carriles 12 y 13: células *stem* de ratón (Pall y Hamilton, 2008).