

ARTICOLO DI RASSEGNA

MECCANISMI DELLA MALATTIA

Rilevazione di ossigeno, omeostasi e malattia

Gregg L. Semenza, M.D., Ph.D.

L'ipossia svolge un ruolo importante nella patobiologia di malattie cardiache, cancro, ictus e malattie polmonari croniche, responsabili del 60% delle morti negli Stati Uniti. Questa rassegna riassume i progressi nella nostra comprensione di come le cellule percepiscono e rispondono ai cambiamenti nella disponibilità di ossigeno e le conseguenze fisiologiche o patologiche di queste risposte nel contesto delle malattie croniche. Il ruolo dell'ipossia nei disturbi infiammatori è stato recentemente recensito nel *Journal*¹ e non è quindi qui discusso.

MECCANISMO DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE NELL'IPPOSSIA

Gli esseri umani hanno sviluppato un complesso sistema circolatorio, respiratorio e neuroendocrino per garantire che il livello di ossigeno sia accuratamente preservato, poiché un eccesso o un'insufficienza possono portare alla morte di cellule, tessuti o dell'organismo. Come discusso di seguito, l'omeostasi dell'ossigeno rappresenta un principio organizzativo per comprendere l'evoluzione, lo sviluppo, la fisiologia e la malattia. Storicamente, la rilevazione di ossigeno era considerata limitata a cellule specializzate, come le cellule glomiche del corpo carotideo, che depolarizzano in millisecondi in risposta all'ipossia per mezzo di meccanismi non completamente conosciuti.² Riconosciamo ora che tutte le cellule nucleate del corpo percepiscono e rispondono all'ipossia. In condizioni di ridotta disponibilità di ossigeno, il fattore 1 indotto dall'ipossia (HIF-1) regola l'espressione dei geni che mediano le risposte adattive.³⁻⁶ Nelle cellule ipossiche la trascrizione di diverse centinaia di RNA messaggeri (mRNA) è aumentata e l'espressione di un numero uguale di mRNA è diminuita. I cambiamenti dipendono in entrambi i casi da HIF-1, ma il legame HIF-1 viene rilevato solo in geni con un'aumentata espressione. L'HIF-1 diminuisce l'espressione mRNA indirettamente regolando i repressori trascrizionali e i microRNA.³⁻⁶

HIF-1 è stata identificata per la prima volta nelle cellule umane come regolatore dell'eritropoietina, l'ormone che controlla la produzione di globuli rossi; fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), che stimola l'angiogenesi; ed enzimi glicolitici, che adattano il metabolismo cellulare alle condizioni ipossiche (fig. 1A).⁶ L'HIF-1 è composto da una sottounità HIF-1 β costitutivamente espressa e da una sottounità HIF-1 α ossigeno-regolata.⁷ In condizioni aerobiche, l'HIF-1 α è idrossilata da proteine prolinidrossilasi-dominio (PHD), che utilizzano l'ossigeno e l' α -chetoglutarato come substrato e contengono Fe²⁺ nel loro centro catalitico.⁸ L'HIF-1 α idrossilato interagisce con la proteina Von Hippel-Lindau (VHL), sottounità di riconoscimento del substrato di una ligasi ubiquitina-proteina che attacca l'HIF-1 α per la degradazione proteosomale (fig. 1B). In condizioni ipossiche, l'idrossilazione è inibita e l'HIF-1 α si accumula. L'attività trascrizionale di HIF-1 è regolata dal fattore di inibizione di HIF-1 (FIH-1), un asparaginil-idrossilasi che blocca l'interazione di HIF-1 α con la proteina coattivatrice p300.^{6,8} Quindi, l'idrossilazione di HIF-1 α fornisce un meccanismo per i cambiamenti di trasduzione nella disponibilità di ossigeno al nucleo come cambiamenti in trascrizione genica.

La crescita degli embrioni murini HIF-1 α ^{-/-}, che mancano di HIF-1 α , viene arrestata a metà gravidanza e muoiono a causa di problemi cardiaci e vascolari e per l'aumento di eritropoiesi, indicando che tutti e tre i componenti del sistema circolatorio dipendono dall'HIF-1 per il normale sviluppo.⁹⁻¹²

Dal Programma Vascolare, Istituto di Ingegneria Cellulare; i dipartimenti di Pediatria, Medicina, Oncologia, Radioterapia Oncologica e Chimica Biologica e l'Istituto McKusick-Nathans di Medicina Genetica — tutti presso la John Hopkins University School of Medicine, Baltimora. Per richieste di ristampa contattare il dott. Semenza presso Broadway Research Bldg., Suite 671, 733 N. Broadway, Baltimora, MD 21205, o scrivere a gsemenza@jhmi.edu.

N Engl J Med 2011;365:537-47.
Copyright © 2011 Massachusetts Medical Society.

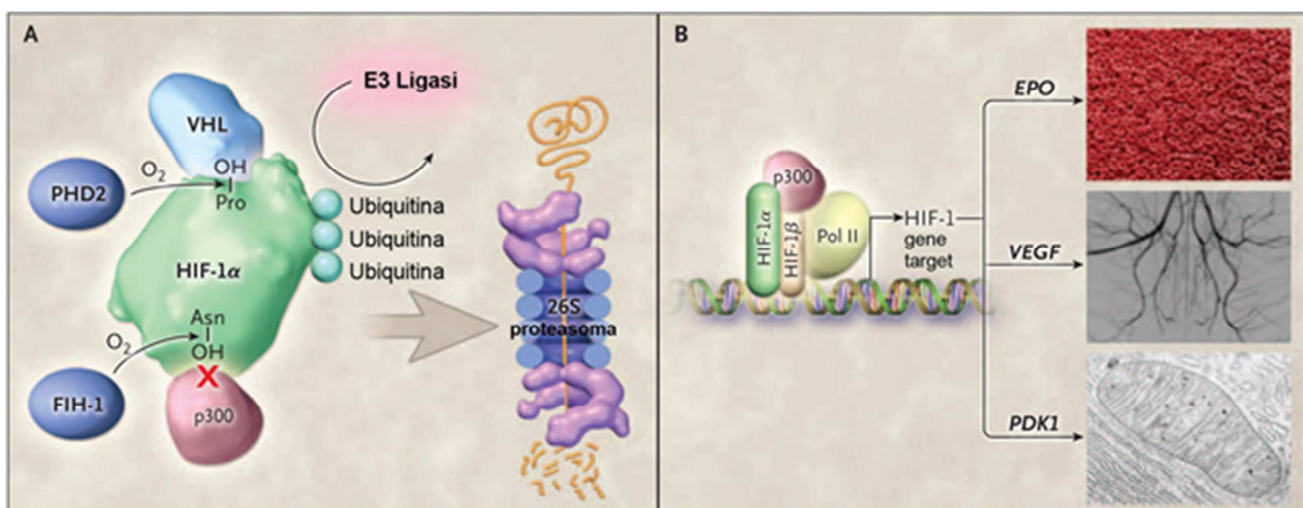


Figura 1: Rilevazione di ossigeno, espressione genica e risposta adattiva all'ipossia.

Nelle cellule ben ossigenate (riquadro A), la prolil idrossilasi-dominio 2 (PHD2) utilizza l'ossigeno per idrossilare il fattore 1 indotto dall'ipossia (HIF-1 α) su un residuo di prolina (Pro-OH). La proteina Von Hippel-Lindau (VHL) si lega a HIF-1 α contenente Pro-OH e recluta un'ubiquitina ligasi E3. La poliubiquitinazione di HIF-1 α segnala la degradazione della proteina dal proteasoma 26S. Il fattore di inibizione di HIF-1 (FIH-1) usa anch'esso ossigeno per idrossilare HIF-1 α su un residuo di asparagina (Asn-OH). L'HIF-1 α contenente Asn-OH non può essere legato dalla proteina coattivatrice p300, impedendo così ad HIF-1 α di attivare la trascrizione del gene. In condizioni ipossiche (riquadro B) le reazioni di idrossilazione Pro e Asn sono inibite e HIF- α (e cioè o HIF-1 α o HIF-2 α) si accumulano rapidamente, dimerizza con HIF-1 β , recluta p300, si lega agli elementi di risposta ipossica e attiva la trascrizione da parte della RNA polimerasi II (Pol II) di centinaia di geni target, come i seguenti: *EPO*, che sta per eritropoietina, è un ormone che stimola la produzione di globuli rossi (microfotografia in alto); *VEGF*, che sta per fattore di crescita dell'endotelio vascolare, è un fattore angiogenico che stimola la formazione dei vasi sanguigni (angiogramma centrale); e *PDK1*, che sta per piruvato deidrogenasi chinasi 1, inibisce la conversione del piruvato nell'acetil-coenzima A per l'ossidazione nel mitocondrio (micrografia in basso).

Le risposte ipossiche sono inoltre mediate da HIF-2, un composto eterodimero di HIF-1 β and HIF-2 α (un paralogo di HIF-1 α che è regolato anche dall'idrossilazione ossigeno-dipendente). L'HIF-1 è presente in tutte le cellule nucleate di tutte le specie metazoiche, mentre l'espressione HIF-2 α è limitata a determinate tipologie cellulari tra le specie vertebrate e svolge un ruolo importante sia nell'eritropoiesi sia nella vascolarizzazione.¹³

REGOLAZIONE DEL METABOLISMO CELLULARE DA PARTE DI HIF-1

Anche il semplice verme cilindrico *Caenorhabditis elegans*, che è composto da circa 1000 cellule e non possiede sistemi specializzati per il rilascio dell'ossigeno, esprime HIF-1, indicando che la funzione primordiale di HIF-1 era quella di mediare le risposte adattive che permettono alle cellule di sopravvivere alla deprivazione di ossigeno. Uno dei modi in cui HIF-1 promuove la sopravvivenza delle cellule in condizioni ipossiche è mediando una

commutazione da metabolismo ossidativo a glicolitico. Gli enzimi glicolitici convertono il glucosio in piruvato, che può essere convertito sia in acetil-coenzima A (CoA) per l'ossidazione nel ciclo degli acidi tricarbossilici, sia in lattato come prodotto finale glicolitico (fig. 2). HIF-1 attiva l'espressione di lattato deidrogenasi A e piruvato deidrogenasi chinasi 1 (PDK1) portando l'equilibrio da metabolismo ossidativo a glicolitico.^{14,15}

Rispetto alla glicolisi, il metabolismo ossidativo rende 18 volte più ATP per mole di glucosio consumato. Anche se la saggezza tradizionale indica che le cellule respirano fino a quando l'ossigeno si esaurisce, punto in cui si commutano in glicolisi, sappiamo adesso che tale modello di regolazione metabolica non è corretto. I fibroblasti HIF-1 $\alpha^{-/-}$ non sono capaci di commutare da metabolismo ossidativo a glicolitico quando passano da condizioni aerobiche con 95% di aria e 5% di anidride carbonica (20% ossigeno con una pressione parziale di ossigeno[PO₂] di circa 140 mm Hg) a condizioni ipossiche (1% ossigeno, con una PO₂ di circa 7 mm Hg).¹⁶

I livelli di ATP sono maggiori nelle cellule HIF-1 α ^{-/-} all'1% di ossigeno, rispetto alle cellule HIF-1 α ^{+/+} al 20% di ossigeno, indicando quindi che l'1% di ossigeno non limita la produzione di ATP.¹⁶ Tuttavia, i fibroblasti HIF-1 α ^{-/-} mantenuti all'1% o meno di ossigeno muoiono a causa dei livelli tossici delle specie reattive dell'ossigeno.^{14,16} In condizioni aerobiche, gli elettroni sono trasferiti da NADH e flavina adenina dinucleotide (FADH₂) (generata dall'ossidazione dell'acetil-coenzima A CoA) al complesso mitocondriale I o II, quindi al complesso III e infine al complesso IV, in cui reagiscono con l'ossigeno formando acqua. In condizioni ipossiche, il rilascio di elettroni è incrementato prima del trasferimento al complesso IV, portando alla formazione di superossido,¹⁷ che viene quindi convertito in perossido di idrogeno e altre specie reattive dell'ossigeno tossiche. Per questo c'è ossigeno a sufficienza per far avvenire la fosforilazione ossidativa nei fibroblasti ipossici, ma a costo di una perdita di omeostasi redox. La misura in cui tali risultati si applicano a stati patologici, come cancro e ipertensione polmonare, resta da determinare.

L'ASSE PHD – VHL – HIF NELL'ERITROCITOSI EREDITARIA

L'eritrocitosi ereditaria (policitemia congenita) è un disturbo caratterizzato dall'eccesso di produzione di globuli rossi. Ad alti livelli di ematocrito il flusso di sangue nei capillari è compromesso, esponendo così le persone affette a un maggiore rischio di trombosi vascolare periferica e cerebrale. I soggetti affetti da policitemia Chuvash sono omozigoti per una mutazione di senso che altera parzialmente il legame della proteina VHL alle sottounità idrossilate HIF-1 α , portando ad un aumento inappropriato dell'attività di HIF ad ogni dato livello di PO₂.¹⁸ I cambiamenti della respirazione e del tono vascolare polmonare indotti dall'ipossia avvengono a livelli più elevati di PO₂ nelle persone affette rispetto ai pazienti di controllo, riflettendo una deficienza generalizzata nella rilevazione di ossigeno.¹⁹ Sono stati anche descritti casi di eritrocitosi ereditaria dovuta a mutazione di senso nella proteina 2 PHD (PHD2) o HIF-2 α , che compromette l'idrossilazione di HIF-1 α , HIF-2 α , o entrambi.^{18,20,21}

Perciò, il percorso PHD–VHL–HIF è stato saturato con le mutazioni, indicando il suo

ruolo chiave nell'eritropoiesi e in altri sistemi fisiologici incaricati di mantenere l'omeostasi dell'ossigeno.

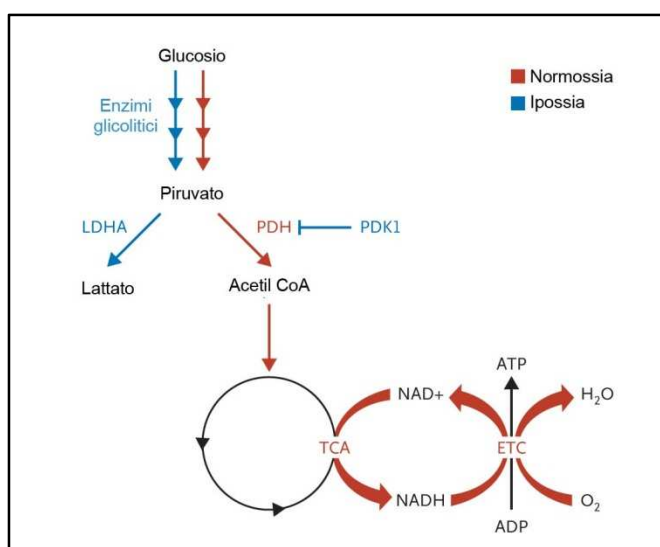
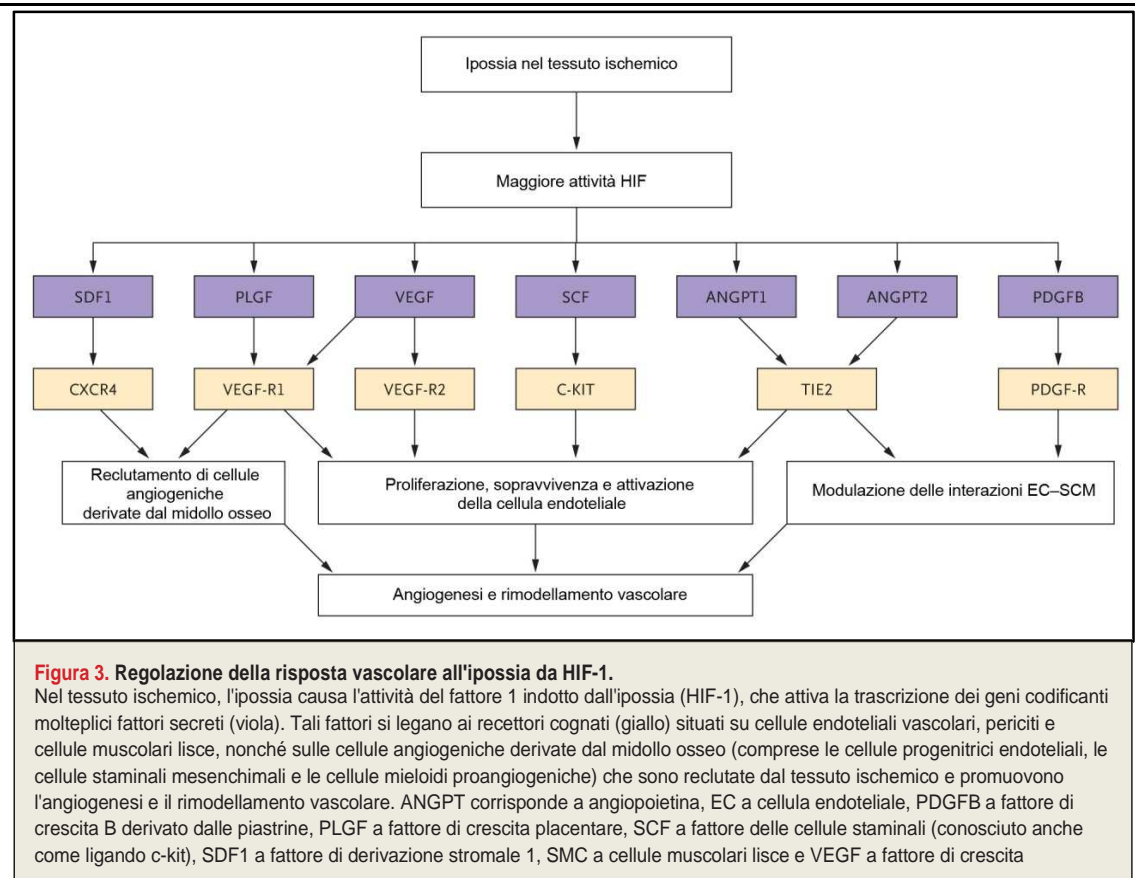


Figura 2. Regolamento del metabolismo di glucosio in risposta ai cambiamenti dei livelli di ossigeno cellulare.

Il glucosio è convertito in piruvato grazie all'azione degli enzimi glicolitici. Nelle cellule ben ossigenate (percorso rosso) la piruvato deidrogenasi (PDH) converte il piruvato in acetil-coenzima A (CoA) che si ossida nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA), generando elettroni che vengono trasportati attraverso una serie di complessi proteici (ETC) e vengono eventualmente trasferiti all'ossigeno per formare acqua. Il gradiente protonico determinato dall'ETC è utilizzato per sintetizzare l'ATP. In condizioni ipossiche (percorso blu) la piruvato deidrogenasi chinasi 1 (PDK1) inattiva la PDH e la lattato deidrogenasi A (LDHA) converte il piruvato in lattato. L'espressione degli enzimi glicolitici è inoltre spinta in condizioni ipossiche ad incrementare il flusso durante il percorso.

MANCATO ADATTAMENTO ALL'IPSSIA NELLA MALATTIA CARDIOVASCOLARE ISCHEMICA

La stenosi aterosclerotica nel cuore e nelle gambe porta rispettivamente all'ischemia cardiaca e degli arti quando il flusso sanguigno a valle della stenosi si restringe. Nei topi giovani e sani la legatura dell'arteria femorale porta all'induzione locale di HIF-1, seguita dall'attivazione trascrizionale dei geni che codificano il VEGF e altri fattori angiogenici all'interno dell'arto angiogenico e dopo diverse settimane la normale perfusione viene ristabilita.²² Questa risposta vascolare adattiva è compromessa dall'invecchiamento²² e dal diabete^{23,24}, che costituiscono i principali fattori di rischio per la malattia coronarica e arteriosa periferica. Mentre i topi HIF-1 α ^{-/-} sono soggetti a morte embrionale, i topi HIF-1 α ^{+/-} si sviluppano normalmente ma hanno un recupero di perfusione danneggiato e danni ai tessuti più severi dopo la legatura dell'arteria.²²



Il VEGF e altri fattori secreti (fig. 3) attivano le cellule vascolari per promuovere l'angiogenesi (gemmazione di nuovi capillari da vasi esistenti) e l'arteriogenesi (il rimodellamento dei vasi sanguigni collaterali per accogliere un flusso maggiore, bypassando quindi le regioni stenotiche dei condotti arteriosi).^{25,26} I fattori angiogenici raggiungono anche la circolazione e stimolano la mobilitazione delle cellule angiogeniche derivate dal midollo osseo (BMDAC), che tornano al tessuto ischemico e partecipano all'angiogenesi e all'arteriogenesi.^{22,27}

Anche se originariamente descritte come cellule progenitrici endoteliali, la maggior parte delle BMDAC sono cellule mieloidi. Invece di differenziarsi in cellule che sono incorporate nei vasi rimodellati, le cellule mieloidi producono fattori paracrini che stimolano il rimodellamento vascolare.^{28,29} Per promuovere il rimodellamento vascolare, le BMDAC devono essere mobilitate dal midollo osseo e altri tessuti e entrare nel sangue periferico, tornare al tessuto ischemico, devono essere trattenute nel tessuto ischemico aderendo all'endotelio vascolare e stravasare dai vasi e sopravvivere abbastanza a lungo all'interno di tale tessuto per avviare le risposte vascolari.

Con l'invecchiamento la perdita di espressione dei fattori angiogenici causata

dall'ischemia porta alla mancata mobilizzazione e homing delle BMDAC.²²

Dopo la legatura dell'arteria in topi da 2 a 8 mesi, la somministrazione intramuscolare di un adenovirus ricombinante che codifica una forma di HIF-1 α creata per avere attività costitutiva (AdCA5) è sufficiente a stimolare la mobilizzazione e l'homing delle BMDAC, migliorando il recupero della perfusione.²² L'AdCA5 migliora anche il risultato dopo la legatura dell'arteria nei topi con un recettore della leptina mutante (Lepr^{db/db}), un modello per il diabete di tipo 2.³⁰ L'AdCA5 non è sufficiente per recuperare la perfusione nei topi dai 13 ai 17 mesi; in questi topi, la terapia genica AdCA5 seguita dalla somministrazione intravenosa delle BMDAC porta al recupero del flusso sanguigno, ma solo quando le BMDAC sono state pretrattate con dimetilossalilglicina (DMOG), un antagonista α -chetoglutarato che induce l'attività di HIF-1 inibendo l'idrossilazione di prolina.^{31,32} L'attivazione di HIF-1 nelle BMDAC porta all'espressione di integrine β_2 che promuovono l'aderenza vascolare e la ritenzione tissutale,³¹ così come gli enzimi metabolici, trasportatori di membrana e regolatori di pH che promuovono la sopravvivenza delle BMDAC nel tessuto ischemico.³²

L'HIF-1 svolge un ruolo importante anche nella malattia coronarica. L'induzione di HIF-1 α si verifica precocemente nel corso dell'infarto miocardico, come dimostrato dall'esame di campioni biotipici ventricolari ottenuti da pazienti con infarto acuto.³³ I topi transgenici con sovraespressione HIF-1 α miocardica hanno un infarto di dimensioni ridotte, una migliore funzionalità cardiaca e maggiore densità capillare dopo la legatura dell'arteria coronaria.³⁴ I vasi sanguigni collaterali sono identificati nell'angiografia in circa due terzi dei pazienti con malattia coronarica critica in cui il grado di stenosi arteriosa (>70%) è sufficiente a causare sintomi (angina). Non sono stati identificati fattori che determinano lo sviluppo di collaterali in pazienti con stenosi critica. Tuttavia, quando la rottura della placca causa un'occlusione coronarica totale e infarto miocardico, i pazienti con vasi collaterali hanno infarti di dimensioni minori e una maggiore sopravvivenza rispetto a quelli senza vasi collaterali.^{35,36} I polimorfismi a singolo nucleotide del locus HIF-1 α sono associati a un'assenza di vasi collaterali coronarici in pazienti con stenosi critica³⁷ e in pazienti con sindromi coronariche acute che si presentano con angina stabile piuttosto che con infarto.³⁸ Perciò, la variazione genetica può influenzare l'attività di HIF-1 e alterare quindi la presentazione della malattia coronarica.

Nei topi l'HIF-1 è necessario per il preconditionamento ischemico, fenomeno in cui l'esposizione del cuore a diversi brevi episodi (ad es. 5 minuti) di ischemia e riperfusione fornisce protezione dagli effetti pregiudizievole di un episodio successivo prolungato (ad es. 30 minuti) di ischemia.^{39,40} I topi con un livello maggiore di HIF-1 α e HIF-2 α cardiaco dovuti a una minore attività di PHD2 sono protetti dall'infarto miocardico in assenza di preconditionamento.^{40,42} Questi risultati suggeriscono che HIF-1 regola non solo la perfusione e il rilascio di ossigeno, ma svolge anche un ruolo essenziale nella capacità del cuore di superare episodi di privazione di ossigeno, che possono coinvolgere cambiamenti nel metabolismo energetico (descritti in precedenza) e nella produzione di adenosina.⁴³ Nei modelli di infarto dei roditori il pretrattamento con farmaci induttori dell'attività di HIF porta a una riduzione della dimensione di infarto cerebrale e diversi geni target HIF sono candidati per mediare la neuroprotezione.⁴⁴⁻⁴⁷ La mortalità per malattia coronarica o infarto è meno comune nei residenti ad elevate altitudini in Svizzera rispetto alla popolazione generale, suggerendo che vivere in ipossia cronica fornisce una certa protezione.⁴⁸ I dati preclinici che collegano l'attivazione del sistema PHD– HIF con l'adattamento ischemico forniscono una base per effettuare tentativi terapeutici per

aumentare l'attività HIF o diminuire quella PHD nei pazienti con malattia coronarica e arteriosa periferica. In uno studio con pazienti affetti da ischemia critica degli arti (condizione in cui la perfusione è insufficiente per mantenere la vitalità dei tessuti) i livelli di HIF-1 α erano aumentati nelle cellule endoteliali vascolari, ma non nelle cellule muscolari ischemiche,⁴⁹ suggerendo una risposta fisiologica all'ischemia compromessa. Nella fase I degli studi clinici i pazienti con malattia arteriosa periferica o malattia coronarica sono stati fatti entrare in contatto con un adenovirus ricombinante che codifica una proteina chimerica contenente la metà N-terminale di HIF-1 α fusa con la proteina transattivatrice di herpesvirus VP16. Non sono state riportate conseguenze avverse in questi due studi in cui sono state effettuate iniezioni intramuscolari a 34 pazienti con ischemia critica degli arti e in cui sono state effettuate iniezioni intramiocardiche in 10 pazienti al momento dell'impianto di bypass dell'arteria coronaria.^{50,51} Tuttavia, non è stata riportata l'efficacia di tali trattamenti in pazienti con malattia arteriosa periferica o coronarica, forse perché la proteina chimerica non conserva tutte le attività di HIF-1 α ; la sola terapia genica non è sufficiente a mediare la risposta vascolare in questo tipo di pazienti, che tendono ad essere anziani, o le proteine adenovirali o VP16 inducono una risposta infiammatoria confondente.

Una strategia alternativa per il trattamento di malattia arteriosa periferica,⁵² ischemia cerebrale⁴⁴⁻⁴⁷ e altre patologie ischemiche consiste nello sviluppo di farmaci che inibiscono la prolid idrossilasi e quindi attivano l'HIF.^{47,53} Tali farmaci, o ferro chelato che è presente nel centro catalitico dell'idrossilasi, o DMOG, competono con l' α -chetoglutarato per il legame al sito catalitico. Più di 60 diverse diossigenasi utilizzano il ferro e l' α -chetoglutarato⁵⁴ e sarebbe altamente auspicabile lo sviluppo di inibitori specifici di una particolare idrossilasi (ad es. una delle PHD) per le applicazioni cliniche. Tuttavia, nei pazienti con la policitemia Chuvash si è riscontrato un moderato aumento di segnalazione HIF che è prolungata e ha effetti patologici sistemici.⁵⁵ Pertanto, l'applicazione clinica di questi agenti deve essere affrontata in maniera prudente e conservativa.

Un'altra strategia alternativa contempla l'uso dei prodotti del gene target HIF come agenti terapeutici, che ci porta all'inizio della storia, con la clonazione del gene dell'eritropoietina^{56,57} e la produzione di eritropoietina umana ricombinante per la somministrazione in pazienti con insufficienza renale cronica, le cui reni non producono eritropoietina a sufficienza per sostenere una normale massa di globuli rossi.⁵⁸

Sebbene l'eritropoietina sia altamente efficace nella stimolazione dell'eritropoiesi, la somministrazione di un singolo fattore angiogenico, come il VEGF, ha fallito come mezzo per la stimolazione del rimodellamento vascolare, processo che richiede l'azione coordinata di fattori angiogenici HIF-dipendenti multipli.²² Un potenziale vantaggio di utilizzare proteine a valle come agenti terapeutici è il fatto che agiscono immediatamente, mentre gli effetti della terapia genica HIF- α o degli inibitori di PHD sono ritardati poiché necessitano della trascrizione e traduzione dei prodotti dei geni target. Nei modelli animali, l'eritropoietina, che funziona da fattore di sopravvivenza per molti tipi di cellule, ha migliorato il recupero da un evento ischemico se somministrata subito prima o dopo l'evento.⁵⁹⁻⁶² Sono stati riportati risultati positivi in un piccolo studio clinico sull'eritropoietina nei pazienti con infarto ischemico acuto,⁶³ ma studi di follow-up non hanno dimostrato l'efficacia e l'uso di eritropoietina in combinazione con l'attivatore tissutale del plasminogeno hanno dato luogo ad un aumento della mortalità.^{64,65} Gli inibitori di PHD, che inducono l'espressione di fattori multipli di sopravvivenza e angiogenici, potrebbero essere più efficaci, ma è necessario che gli studi clinici confermino tale ipotesi.

ADATTAMENTO COOPTATO ALL'IPOSSIA NEL CANCRO

Nella malattia vascolare ischemica l'induzione di attività dell'HIF è adattiva e gli sforzi terapeutici sono diretti verso l'aumento della risposta. Nel cancro, la cooptazione delle risposte fisiologiche all'ipossia giocano un ruolo importante nella progressione della malattia e gli sforzi terapeutici sono diretti verso l'inibizione dell'HIF. Folkman ha sancito il ruolo fondamentale dell'angiogenesi nella crescita dei tumori primari e delle loro metastasi.⁶⁶ I vasi tumorali sono strutturalmente e funzionalmente anormali e anche i cancri molto vascolarizzati possono contenere aree di ipossia severa. Nel cancro del seno, la PO₂ media è di 10 mm Hg (rispetto a >60 mm Hg nel tessuto mammario normale) e una PO₂ inferiore a 10 mm Hg nei tumori primari è associata ad un rischio maggiore di metastasi e morte.⁶⁷ La sovraespressione di HIF-1 α nei tumori primari è associata anche ad una maggiore mortalità nel cancro del seno e in altri tumori comuni (fig. 4).⁶⁸ L'HIF-1 attiva la trascrizione di geni che svolgono un ruolo importante in angiogenesi,⁶⁹ instabilità genetica,⁷⁰ evasione immunitaria,⁷¹ riprogrammazione metabolica,⁷²⁻⁷⁴ invasione e metastasi,^{75,76} resistenza alle radiazioni⁷⁷ e conservazione delle cellule staminali.⁷⁸ Anche se

l'HIF-1 ha il potere di regolare centinaia di geni target, in un determinato tumore solo un sottoinsieme sarà regolato dall'HIF-1. Come con ogni proteina implicata nel cancro, è possibile trovare esempi contraddittori che suggeriscono il coinvolgimento dell'HIF-1 nella limitazione della crescita del tumore o il mancato effetto. La sfida è quella di comprendere il ruolo dell'HIF-1 in un particolare tumore del paziente al fine di determinare se possa essere bersagliato terapeuticamente ed eventualmente in che modo.

L'ipossia intratumorale è un importante meccanismo col quale l'HIF-1 è attivato nei tumori umani, ma gli HIF sono attivati anche in conseguenza ad una perdita di funzionalità dei soppressori tumorali, o ad un aumento della funzionalità oncogena.⁶⁸ Il maggiore esempio di questa perdita di funzionalità di VHL porta alla sovraespressione costitutiva di HIF-1 α e HIF-2 α .⁷⁹ A differenza delle persone affette da policitemia Chuvash, omozigoti per una mutazione di senso di VHL che altera parzialmente la sua capacità di ubiquitinare gli HIF, molte persone con la sindrome di VHL (tipo 1, 2A o 2B) sono eterozigoti per una mutazione che porta alla perdita di funzionalità. La mutazione somatica o l'inattivazione epigenetica di altri alleli blocca l'ubiquitinazione e la degradazione dell'HIF. Questi pazienti sono ad alto rischio di tumori (in particolare carcinoma renale a cellule chiare e emangioblastoma cerebellare) che sono altamente vascolarizzati a causa di livelli elevati di VEGF e altri fattori angiogenici regolati da HIF.⁷⁹

Un numero crescente di agenti chemioterapici hanno dimostrato il loro funzionamento con inibitori di HIF-1 attraverso diversi meccanismi molecolari.^{68,80} Farmaci come il topotecan sono somministrati ad intermittenza alla massima dose tollerata come agenti citotossici, ma se somministrati quotidianamente a dosi inferiori, inibiscono l'HIF-1 e le vie a valle come l'angiogenesi nei modelli di xenotrapianto tumorale.⁸⁰ Diversi farmaci che venivano precedentemente utilizzati per il trattamento di patologie diverse dal cancro, compresi i glicosidi cardiaci come la digossina, hanno dimostrato di inibire l'attività dell'HIF-1 e di arrestare la crescita tumorale nei topi,⁸¹ ma non è noto se questo avverrà nel range di dosaggio tollerato dagli esseri umani. Altri agenti bloccanti di HIF-1 che vengono studiati negli studi clinici sul trattamento del cancro (inibitori di istone deacetilasi, proteina da shock termico 90 e bersaglio della rapamicina nei mammiferi [mTOR]) inibiscono l'attività di molte altre proteine; la misura in cui l'inibizione di HIF-1 contribuisce all'efficacia terapeutica è sconosciuta, ma può variare in modo significativo da un paziente all'altro.

Comprendere un farmaco che inibisce l'HIF-1 come parte di un regime chemioterapico multi-agente beneficerà probabilmente un sottoinsieme di pazienti affetti da cancro, ma la difficoltà di somministrare ai pazienti la corretta combinazione farmacologica rimane il maggiore ostacolo per un trattamento efficace delle metastasi.

RISPOSTE MALADATTIVE ALL'IPOSSIA NELL'IPERTENSIONE POLMONARE

L'ipertensione polmonare ipossica è una complicazione progressiva e spesso mortale delle malattie polmonari croniche. A differenza delle arteriole sistemiche, che si dilatano in risposta all'ipossia al fine di incrementare la perfusione tissutale, le arteriole polmonari si restringono per deviare il sangue dalle regioni polmonari non ventilate. Si tratta di una risposta adattiva presente nei pazienti con polmonite lobare, ma non in quelli con malattie polmonari croniche, in cui l'ipossia alveolare si verifica attraverso tutto il polmone, con l'ipertensione polmonare che porta a insufficienza cardiaca destra e progressiva ipossia. Gli HIF regolano i geni target che svolgono un ruolo importante nella patogenesi dell'ipertensione polmonare (fig. 5).⁸²⁻⁸⁴ Rispetto a topi wild-type della stessa nidiata, i topi HIF-1 $\alpha^{+/-}$ or HIF-2 $\alpha^{+/-}$ sono affetti da ipertensione polmonare meno severa quando soggetti a ipossia prolungata.^{85,86} Al contrario, le persone con eritrocitosi ereditaria dovuta a mutazioni che stabilizzano la proteina HIF-2 α hanno elevate pressioni arteriose polmonari in condizioni normossiche.⁸⁷ Le alterazioni mediate da HIF-1 nel metabolismo energetico delle cellule muscolari lisce di arteria polmonare⁸⁸ e endoteliali⁸⁹ possono svolgere un ruolo patogenico importante nell'ipertensione polmonare ipossica (Organizzazione Mondiale della Sanità [OMS] gruppo III) e nell'ipertensione polmonare idiopatica (OMS gruppo I). Alterazioni dell'omeostasi redox svolgono anch'esse un ruolo importante nell'ipertensione polmonare.^{90,91} L'inattivazione epigenetica dell'espressione della superossido dismutasi 2 è stata implicata nell'induzione di espressione di HIF-1 α nelle cellule muscolari lisce di arteria polmonare di ratti fawn-hooded, che sono un modello di ipertensione polmonare idiopatica.⁹⁰

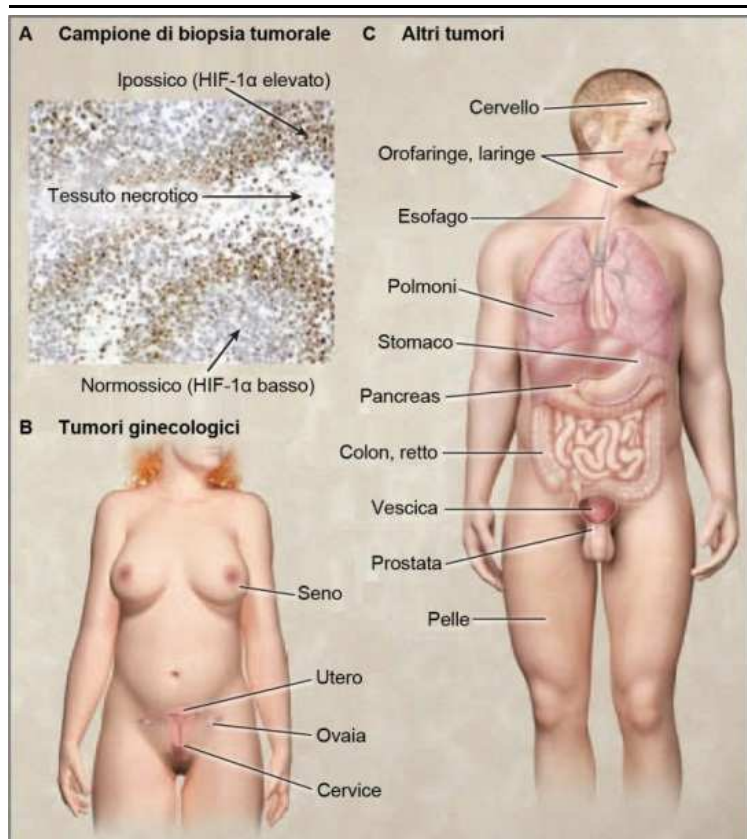


Figura 4. Ipossia, fattore 1 indotto dall'ipossia (HIF-1) e cancro. Il riquadro A mostra una colorazione immunostochimica con un anticorpo per HIF-1 α in un campione di biopsia prelevato da un tumore. Le zone bianche rappresentano il tessuto necrotico in cui le cellule sono morte a causa della loro eccessiva distanza da un vaso sanguigno per ricevere sufficiente ossigeno. Le zone blu-grigiastre rappresentano le cellule tumorali che sono ben ossigenate (normossiche). La colorazione marrone indica le cellule che esprimono livelli elevati di HIF-1 α , che sono le cellule vitali più lontane da un vaso sanguigno e sono quindi le più ipossiche. Livelli maggiori di proteina HIF-1 α in campioni biopsici diagnostici sono associati ad un maggiore rischio di morte in pazienti affetti da tumori ginecologici (riquadro B) e da altri tipi di tumore (riquadro C).

ADATTAMENTO EVOLUTIVO DEI TIBETANI AD ELEVATE ALTITUDINI

Per migliaia di anni gli esseri umani hanno vissuto sull'altopiano tibetano ad altitudini che superano i 3000 m. Rispetto a coloro che risiedono a livello del mare, dove la PO₂ atmosferica è di 150 mm Hg, i residenti dell'Altopiano Tibetano, dove la PO₂ è di 110 mm Hg o inferiore, vivono in condizioni di ipossia cronica e hanno sviluppato un adattamento unico al loro ambiente. Normalmente, se i polmoni sono sottoposti ad ipossia per alta quota, un maggiore tono vascolare polmonare diventa la risposta maladattiva che porta a ipossemia e a insufficienza cardiaca.

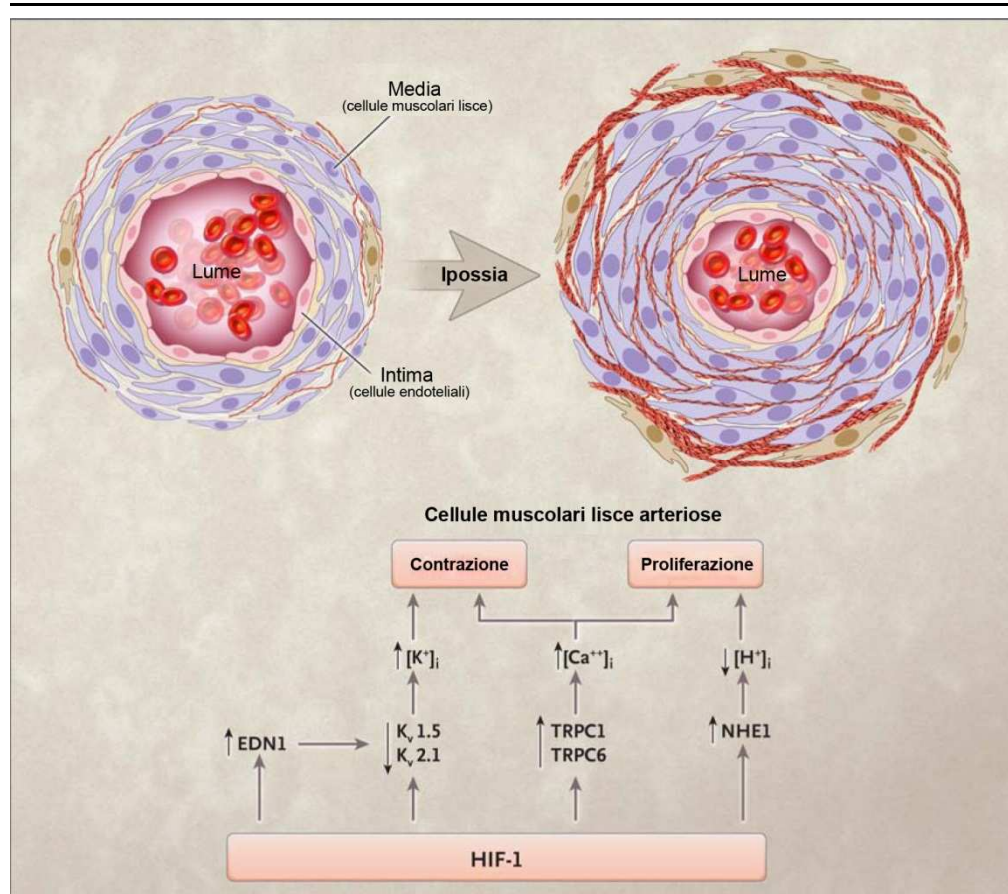


Figura 5. Patogenesi dell'ipertensione polmonare ipossica.

L'ipossia alveolare (dovuta a malattia polmonare cronica o residenza ad elevate altitudini) causa l'attività del fattore 1 indotto dall'ipossia (HIF-1) nelle cellule muscolari lisce vascolari (SMC), portando a una minore espressione dei canali voltaggio-dipendenti per il sodio (Kv1,5 e Kv2,1), una maggiore espressione di canali di calcio recettori di potenziale transitorio - Transient Receptor Potential (TRPC1 e TRPC6) e una maggiore espressione dello scambiatore sodio-idrogeno 1 (NHE1). Le risultanti alterazioni di concentrazione intracellulare di ioni di potassio, calcio e idrogeno innescano l'ipertrofia delle cellule muscolari lisce, proliferazione e depolarizzazione e contrazione, che portano ad un aumento della resistenza vascolare polmonare. L'endotelina 1 (EDN1), prodotta dalle cellule vascolari ipossiche in modo HIF-dipendente, contribuisce anche alla ridotta espressione dei geni dei canali Kv.

Quando l'ipossemia è dovuta ad anemia, l'eritrocitosi è una risposta adattiva, mentre quando è dovuta a ipossia ambientale, ulteriori aumenti della massa di globuli rossi non possono correggere il problema e anzi potrebbero peggiorarlo, a causa dell'iperviscosità associata alla policitemia. Nei tibetani adattati queste risposte all'ipossia sono attutite e molti tibetani sono caratterizzati da normali livelli di pressione arteriosa polmonare e emoglobina. Inoltre, i tibetani che si sono adattati con successo possiedono un normale metabolismo tissutale aerobico nonostante l'ipossemia.⁹² Con l'avvento di potenti metodi di sequenziamento del DNA è divenuto possibile identificare i loci in cui si è

verificata la selezione genetica in montanari tibetani rispetto alla popolazione di pianura da cui sono originati. Eccezionalmente, la testimonianza maggiore di selezione è stata trovata nell'HIF-2 α che codifica per il locus.⁹³⁻⁹⁵ È stata inoltre fornita testimonianza della selezione in PHD2 che codifica per i loci, fattore di inibizione di HIF-1 (FIH-1) e geni target di HIF.^{95,96} Non è tuttavia noto come le varianti genetiche selezionate alterino la funzione di queste proteine. Tali varianti possono portare a una ridotta attività di PHD2 e HIF-2 α , il cui effetto finale sarebbe quello di alterare l'equilibrio tra HIF-2 α , che media le risposte vascolari e eritropoietiche all'ipossia e HIF-1 α , che media sia le risposte metaboliche sia quelle vascolari.

In ogni caso, tali risultati evidenziano il ruolo centrale del sistema PHD–HIF nel mantenere l'omeostasi dell'ossigeno.

CONCLUSIONI

La rilevazione di ossigeno e le risposte HIF-dipendenti all'ipossia sono essenziali per lo sviluppo prenatale e la fisiologia postnatale. Queste possono svolgere sia ruoli protettivi sia patogenici nelle malattie croniche che rappresentano la causa più comune di morte nella popolazione degli Stati Uniti, così come in molte altre patologie (compresa la neovascolarizzazione oculare^{97,98} e il

trapianto degli organi^{99,100}) che non possono essere qui discusse. L'azione sugli HIF e le PHD rappresenta una nuova strategia per il trattamento di queste patologie, a condizione che gli effetti terapeutici possano essere ottenuti senza effetti collaterali indesiderati. Queste condizioni saranno più facilmente raggiungibili se la terapia è locale, di breve durata e combinata con altri trattamenti che amplificano selettivamente le conseguenze di modulazione dell'attività dell'HIF nel tessuto malato.

Non è stato segnalato nessun potenziale conflitto di interessi rilevante per questo articolo.

I moduli per la divulgazione forniti dall'autore sono disponibili con il testo completo di questo articolo su NEJM.org.

BIBLIOGRAFIA

- Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 2011; 364:656-65.
- Weir EK, López-Barneo J, Buckler KJ, Archer SL. Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med* 2005;353:2042-55.
- Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005;105:659-69.
- Mole DR, Blancher C, Copley RR, et al. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA-binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* 2009;284:16767-75.
- Xia X, Lemieux ME, Li W, et al. Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4260-5.
- Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2010;2:336-61.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5510-4.
- Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 2008;30:393-402.
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 1998;12:149-62.
- Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998; 17:3005-15.
- Compernelle V, Brusselmans K, Franco D, et al. Cardiac bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor 1 α . *Cardiovasc Res* 2003; 60:569-79.
- Yoon D, Pastore YD, Divoky V, et al. Hypoxia-inducible factor-1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. *J Biol Chem* 2006;281:25703-11.
- Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2 α in development and disease. *Cell Death Differ* 2008;15: 628-34.
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006;3:177-85.
- Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006;3:187-97.
- Zhang H, Bosch-Marcé M, Shimoda LA, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 2008; 283:10892-903.
- Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:894-9.
- Yoon D, Ponka P, Prchal JT. Hypoxia. 5. Hypoxia and hematopoiesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300:C1215-C1222.
- Smith TG, Brooks JT, Balanos GM, et al. Mutation of von Hippel-Lindau tumour suppressor and human cardiopulmonary physiology. *PLoS Med* 2006;3(7):e290.
- Percy MJ, Zhao Q, Flores A, et al. A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:654-9.
- Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, et al. A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis. *N Engl J Med* 2008;358:162-8.
- Bosch-Marcé M, Okuyama H, Wesley JB, et al. Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia. *Circ Res* 2007; 101:1310-8.
- Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, et al. Stabilization of HIF-1 α is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:19426-31.
- Thangarajah H, Vial IN, Grogan RH, et al. HIF-1 α dysfunction in diabetes. *Cell Cycle* 2010;9:75-9.
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438:932-6.
- van Weel V, van Tongeren RB, van Hinsbergh VW, van Bockel JH, Quax PH. Vascular growth in ischemic limbs: a review of mechanisms and possible therapeutic stimulation. *Ann Vasc Surg* 2008; 22:582-97.

27. Dimmeler S. Regulation of bone marrow-derived vascular progenitor cell mobilization and maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1088-93.
28. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107:1164-9.
29. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* 2004;94:230-8.
30. Sarkar K, Fox-Talbot K, Steenbergen C, Bosch-Marcé M, Semenza GL. Adenoviral transfer of HIF-1 α enhances vascular responses to critical limb ischemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18769-74. [Erratum, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:513.]
31. Rey S, Lee K, Wang CJ, et al. Synergistic effect of HIF-1 α gene therapy and HIF-1-activated bone marrow-derived angiogenic cells in a mouse model of limb ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:20399-404.
32. Rey S, Luo W, Shimoda LA, Semenza GL. Metabolic reprogramming by HIF-1 promotes the survival of bone marrow-derived angiogenic cells in ischemic tissue. *Blood* 2011;117:4988-98.
33. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 2000;342:626-33.
34. Kido M, Du L, Sullivan CC, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:2116-24.
35. Habib GB, Heibig J, Forman SA, et al. Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans: results of phase I Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial. *Circulation* 1991;83:739-46.
36. Sabia PJ, Powers ER, Ragosta M, Sarembock LJ, Burwell LR, Kaul S. An association between collateral blood flow and myocardial viability in patients with recent myocardial infarction. *N Engl J Med* 1992;327:1825-31.
37. Resar JR, Roguin A, Voner J, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α polymorphism and coronary collaterals in patients with ischemic heart disease. *Chest* 2005;128:787-91.
38. Hlatky MA, Quertermous T, Boothroyd DB, et al. Polymorphisms in hypoxia inducible factor 1 and the initial clinical presentation of coronary disease. *Am Heart J* 2007;154:1035-42.
39. Cai Z, Zhong H, Bosch-Marcé M, et al. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 α . *Cardiovasc Res* 2008;77:463-70.
40. Eckle T, Köhler D, Lehmann R, El Kasmi K, Eltzschig HK. Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation* 2008;118:166-75.
41. Hyvärinen J, Hassinen IE, Sormunen R, et al. Hearts of hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase-2 hypomorphic mice show protection against acute ischemia-reperfusion injury. *J Biol Chem* 2010;285:13646-57.
42. Hölscher M, Silter M, Krull S, et al. Cardiomyocyte-specific prolyl-4-hydroxylase domain 2 knock out protects from acute myocardial ischemic injury. *J Biol Chem* 2011;286:11185-94.
43. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:1263-8.
44. Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, Semenza GL, Ferriero DM, Sharp FR. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol* 2000;48:285-96.
45. Siddiq A, Ayoub IA, Chavez JC, et al. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition: a target for neuroprotection in the central nervous system. *J Biol Chem* 2005;280:41732-43.
46. Freret T, Valable S, Chazalviel L, et al. Delayed administration of deferoxamine reduces brain damage and promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in the rat. *Eur J Neurosci* 2006;23:1757-65.
47. Harten SK, Ashcroft M, Maxwell PH. Prolyl hydroxylase domain inhibitors: a route to HIF activation and neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:459-80.
48. Faeh D, Gutzwiller F, Bopp M. Lower mortality from coronary heart disease and stroke at higher altitudes in Switzerland. *Circulation* 2009;120:495-501.
49. Ho TK, Rajkumar V, Ponticos M, et al. Increased endogenous angiogenic response and hypoxia-inducible factor 1 α in human critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 2006;43:125-33.
50. Rajagopalan S, Olin J, Deitcher S, et al. Use of a constitutively active hypoxia-inducible factor-1 α transgene as a therapeutic strategy in no-option critical limb ischemia patients: phase I dose-escalation experience. *Circulation* 2007;115:1234-43.
51. Kilian EG, Sadoni S, Vicol C, et al. Myocardial transfection of hypoxia inducible factor-1 α via an adenoviral vector during coronary artery bypass grafting: a multicenter phase I and safety study. *Circ J* 2010;74:916-24.
52. Milkiewicz M, Pugh CW, Egginton S. Inhibition of endogenous HIF inactivation induces angiogenesis in ischemic skeletal muscles of mice. *J Physiol* 2004;560:21-6.
53. Fraisl P, Aragonés J, Carmeliet P. Inhibition of oxygen sensors as a therapeutic strategy for ischemic and inflammatory disease. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:139-52.
54. Nagel S, Talbot NP, Mecnović J, Smith TG, Buchan AM, Schofield CJ. Therapeutic manipulation of the HIF hydroxylases. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:481-501.
55. Gordeuk VR, Prchal JT. Vascular complications in Chuvash polycythemia. *Semin Thromb Hemost* 2006;32:289-94.
56. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985;313:806-10.
57. Lin FK, Suggs S, Lin CH, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7580-4.
58. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *N Engl J Med* 1987;316:73-8.
59. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10526-31.
60. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4802-6.
61. Abdelrahman M, Sharples EJ, McDonald MC, et al. Erythropoietin attenuates the tissue injury associated with hemorrhagic shock and myocardial ischemia. *Shock* 2004;22:63-9.
62. Cai Z, Semenza GL. Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2004;109:2050-3.
63. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8:495-505.
64. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* 2009;40(12):e647-e656.
65. Jia L, Chopp M, Zhang L, Lu M, Zhang Z. Erythropoietin in combination of tissue plasminogen activator exacerbates brain hemorrhage when treatment is initiated 6 hours after stroke. *Stroke* 2010;41:2071-6.
66. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.
67. Vaupel P, Mayer A, Höckel M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* 2004;381:335-54.
68. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010;29:625-34.
69. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:281-90.
70. Bindra RS, Crosby ME, Glazer PM. Regulation of DNA repair in hypoxic cancer cells. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:249-60.
71. Lukashov D, Ohta A, Sitkovsky M. Hypoxia-dependent anti-inflammatory pathways in protection of cancerous tissues.

- Cancer Metastasis Rev 2007;26:273-9.
72. Gillies RJ, Gatenby RA. Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26:311-7.
73. Kim JW, Gao P, Dang CV. Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:291-8.
74. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:299-310.
75. Chan DA, Giaccia AJ. Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:333-9.
76. Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:319-31.
77. Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26:241-8.
78. Barnhart BC, Simon MC. Metastasis and stem cell pathways. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:261-71.
79. Kaelin WG Jr. Treatment of kidney cancer: insights provided by the VHL tumor-suppressor protein. *Cancer* 2009;115: Suppl:2262-72.
80. Melillo G. Targeting hypoxia cell signaling for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:341-52.
81. Zhang H, Qian DZ, Tan YS, et al. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:19579-86.
82. Shimoda LA, Fallon M, Pisarcik S, Wang J, Semenza GL. HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L941-L949.
83. Wang J, Weigand L, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA. Hypoxia-inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 2006;98:1528-37.
84. Whitman EM, Pisarcik S, Luke T, et al. Endothelin-1 mediates hypoxia-induced inhibition of voltage-gated K⁺ channel expression in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L309-L310.
85. Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, et al. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 α . *J Clin Invest* 1999;103:691-6.
86. Brusselmans K, Compennolle V, Tjwa M, et al. Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2 α protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *J Clin Invest* 2003;111: 1519-27.
87. Formenti F, Beer PA, Croft QP, et al. Cardiopulmonary function in two human disorders of the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway: von Hippel-Lindau disease and HIF-2 α gain-of-function mutation. *FASEB J* 2011;25:2001-11.
88. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, et al. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006;113:2630-41.
89. Fijalkowska I, Xu W, Conhair SA, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α regulates the metabolic shift of pulmonary hypertensive endothelial cells. *Am J Pathol* 2010;176:1130-8.
90. Archer SL, Marsboom G, Kim GH, et al. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* 2010;121:2661-71.
91. Bowers R, Cool C, Murphy RC, et al. Oxidative stress in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:764-9.
92. Beall CM. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high-altitude natives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:Suppl 1:8655-60.
93. Simonson TS, Yang Y, Huff CD, et al. Genetic evidence for high-altitude adaptation in Tibet. *Science* 2010;329:72-5.
94. Yi X, Liang Y, Huerta-Sanchez E, et al. Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science* 2010;329:75-8.
95. Beall CM, Cavalleri GL, Deng L, et al. Natural selection on EPAS1 (HIF-2 α) associated with low hemoglobin concentration in Tibetan highlanders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:11459-64.
96. Bigham A, Bauchet M, Pinto D, et al. Identifying signatures of natural selection in Tibetan and Andean populations using dense genome scan data. *PLoS Genet* 2010;6(9):e1001116.
97. Morita M, Ohneda O, Yamashita T, et al. HLF/HIF-2 α is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *EMBO J* 2003;22:1134-46.
98. Yoshida T, Zhang H, Iwase T, Shen J, Semenza GL, Campochiaro PA. Digoxin inhibits retinal ischemia-induced HIF-1 α expression and ocular neovascularization. *FASEB J* 2010;24:1759-67.
99. Bernhardt WM, Gottmann U, Doyon F, et al. Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogeneic kidney transplant model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:21276-81.
100. Jiang X, Khan MA, Tian W, et al. Adenovirus-mediated HIF-1 α gene transfer promotes repair of mouse airway allograft vasculature and attenuates chronic rejection. *J Clin Invest* 2011;121:2236-49.

Copyright © 2011 Massachusetts Medical Society

UN APP NEJM PER IPHONE

L'app NEJM Image Challenge porta una funzionalità popolare presente on-line nello smartphone. Ottimizzata per la visualizzazione su iPhone e iPod Touch, l'app Image Challenge ti permette di testare le tue capacità diagnostiche in qualsiasi momento e in qualsiasi posto. L'app Image Challenge seleziona casualmente una foto tra 300 foto cliniche pubblicate in NEJM, Con una nuova immagine pubblicata ogni settimana. Visualizza un'immagine, seleziona la tua risposta, ottieni un feedback in tempo reale e vedi come hanno risposto gli altri. L'app Image Challenge è disponibile sull'App Store iTunes.