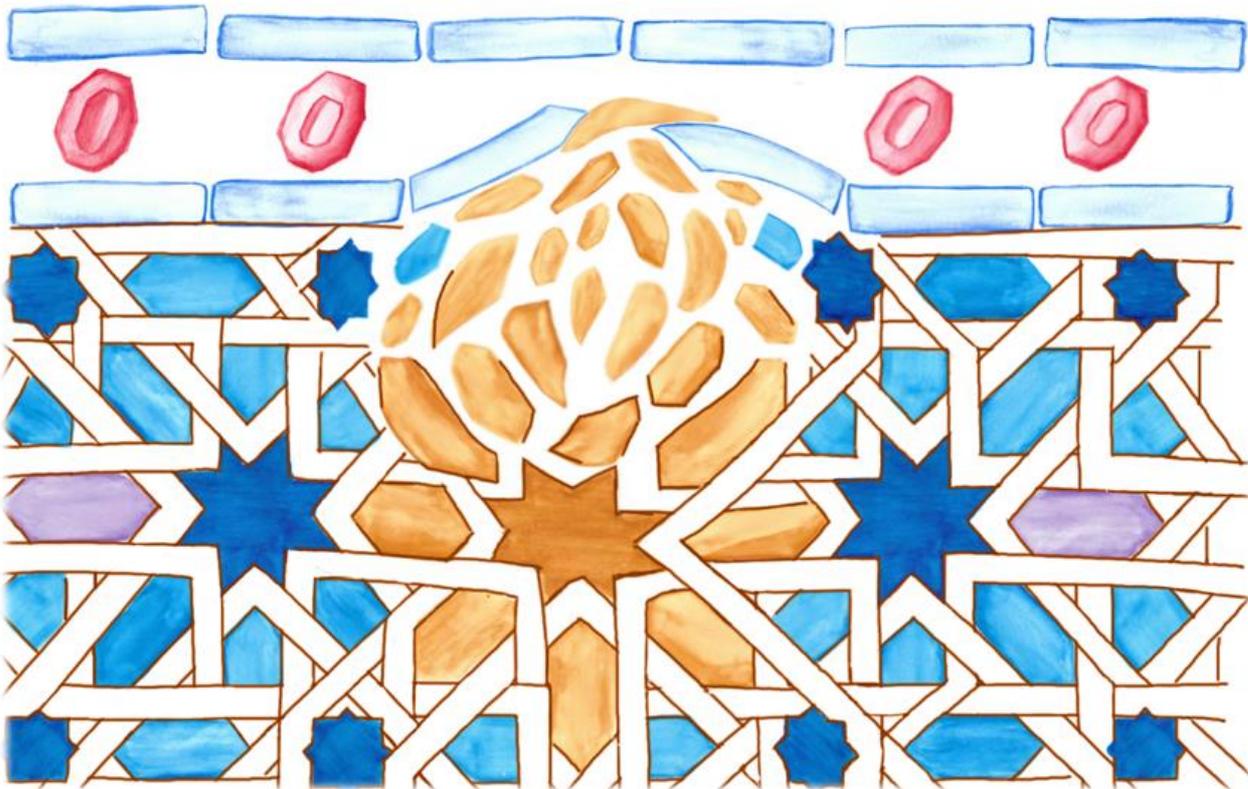


TESIS DOCTORAL

RELACIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS PARP-1 Y HIF-1 $\alpha$   
DURANTE LA RESPUESTA A HIPOXIA TUMORAL

JUAN MANUEL MARTÍ MARTÍN-CONSUEGRA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA (B11.56.1)



**Editor:** Universidad de Granada. Tesis Doctorales

**Autor:** Juan Manuel Martí Martín-Consuegra

**ISBN:** 978-84-1117-013-0

**URI:** <http://hdl.handle.net/10481/70440>



# TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Biomedicina (B11.56.1)

## RELACIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS PARP-1 Y HIF-1 $\alpha$ DURANTE LA RESPUESTA A HIPOXIA TUMORAL

**Juan Manuel Martí Martín-Consuegra**

INSTITUTO DE PARASITOLOGÍA Y BIOMEDICINA "LÓPEZ NEYRA"  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA

**Universidad de Granada**

**2021**







“Instrucciones relativas a los tumores protuberantes en el pecho:

El tratamiento no existe.”

*Adaptado de: Papiro de Erwin Smith (3000 A.C.).*

*Primera referencia escrita a la enfermedad del cáncer [381].*



## Agradecimientos:

En primer lugar, agradecer este trabajo a mi director de Tesis Fco. Javier Oliver Pozo. Gracias por la guía y paciencia. El trabajo en investigación es arduo y los frutos se obtienen a muy largo plazo. Gracias por no desesperar en los momentos duros y saber acompañarme. Gracias por las buenas ideas, pero sobre todo, gracias por la empatía, el cariño y la calidad humana.

Gracias a mis compañeros del laboratorio 105. A Laura, por su amistad que trasciende el trabajo, gracias por esos cafés en los que nos hemos ayudado y compartido tanto. Gracias a Esteban, por las risas y la complicidad, ha sido un placer verte aprender y crecer desde que llegaste al laboratorio. Gracias a Dani, por tu compañerismo y capacidad para estar ahí siempre que alguien necesitaba ayuda. A Mónica, gracias por tu energía y capacidad para señalar lo que es injusto. Gracias a Ángel, por estar siempre ahí para escuchar y echar una mano a todo aquel que lo necesitase. Gracias a Ana Belén, por tu simpatía y alegría, te deseo mucha suerte en este viaje que empieza. Gracias también a Jose, porque con tu vuelta el laboratorio recupera a un buen investigador, y a alguien que siempre está dispuesto a echar una mano a quién lo necesite.

Al resto de compañeros y trabajadores del López Neyra. A Blanca, por su simpatía. A Cristina, por el cariño, las conversaciones y los abrazos. A María, con la que descubrí el swing, nunca dudes de ti misma. A Antonio Antonio, por ser cercano y atento. A Julia, por su simpatía y capacidad de tener los pies en el suelo. A David por su creatividad y capacidad de levantar los pies del suelo. A Nacho, porque calla, pero también otorga. A Pepe, por su sentido del humor y su deseo de ayudar.

Gracias también al resto de investigadores y trabajadores que hacen funcionar el López Neyra. Desde dirección, servicios generales, secretaría, conserjería y servicio de limpieza. Sin ellos el López Neyra no podría funcionar.

Gracias a mi madre, por darme su amor y mostrarme el valor del trabajo y esfuerzo. Gracias a Jesús, por su empatía y cariño. Gracias a Miguel, por su originalidad y capacidad para pensar diferente. Gracias a mi padre por ayudarme a respetar mi voz. Gracias a Yolanda por su capacidad para reír con mi sentido del humor. Gracias a Pablo, por su capacidad para hacerme reír y por ese amor que compartimos hacia la astrofísica y la investigación espacial. Gracias a Yolita, por su empatía y capacidad para escuchar, ánimo en esta aventura que es la investigación.

Gracias a mis amigos, a Gemma, por quererme y acompañarme desde que éramos críos. Gracias a Raquel, por todas las risas y llantos que hemos compartido estos años. Gracias a Laura, por las charlas filosóficas y las noches de Vogue, gracias por la empatía y las largas charlas dónde hablábamos de todo lo que importa. Gracias a Iván y a nacho, por las risas y las noches improvisadas por Pedro Antonio.

Gracias a Iván, a Juanpe, a Luis, a Javi y a Luis, ojalá pronto volvamos a salir de tapas y de fiesta. Gracias a Manuel, por estar ahí para ayudarme en los momentos duros.

Last but not least, thanks to Johnny and his family. Because they see the best in me, thanks for what we are building together.



## Tabla de contenido

Summary .....	5
Introducción .....	9
Situación actual de la enfermedad de cáncer .....	9
El impacto mundial de la enfermedad.....	9
Epidemiología de los cánceres más frecuentes .....	12
Factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer.....	15
El origen de la enfermedad de cáncer .....	21
El cáncer, un compañero ancestral.....	21
Los pilares de la multicelularidad .....	24
El cáncer esculpe a la evolución.....	28
La evolución esculpe al cáncer.....	29
El microambiente tumoral. Aquí no hay quien viva. ....	32
Actividad de PARP en el contexto tumoral. ....	36
La familia PARP .....	36
Características de PARP-1 .....	37
El ciclo de vida de PAR .....	39
La actividad de PARP-1 durante la tumorigénesis .....	41
Los inhibidores de la familia PARP en clínica .....	44
La respuesta a la hipoxia celular. ....	46
La familia de los Elementos Inducidos en Hipoxia (HIFs).....	47
La actividad de HIF-1 $\alpha$ durante la tumorigénesis. ....	51
Resistencia a las terapias en el contexto de la hipoxia tumoral. ...	55
Inhibidores y activadores de la respuesta a hipoxia. ....	57
Objetivos .....	60
Materiales y métodos .....	62
Células y medios de cultivo.....	62
Tratamientos y reactivos .....	63

Anticuerpos.....	64
Hipoxia .....	65
Irradiación .....	65
Silenciamiento/sobreexpresión .....	65
Western Blot .....	66
Subfraccionamiento .....	67
Inmunoprecipitación.....	68
Ensayo Pull Down.....	69
PCR cuantitativa (qPCR) .....	70
Inmunofluorescencia .....	72
Inmunohistoquímica .....	73
Medida de especies reactivas de oxígeno .....	74
Obtención de células knockout mediante CRISPR-Cas9 .....	75
ChIP-Seq.....	75
Síntesis de <sup>32</sup> P-PAR para el ensayo de PARilación de los péptidos.	77
Ensayo de unión de polímero a los péptidos.....	78
Consumo de oxígeno .....	78
Ensayo de glucólisis.....	79
Proliferación.....	79
Cierre de herida .....	80
MEME análisis .....	80
Tabla de ensayos clínicos.....	81
Uso de cBioportal.....	81
Resultados.....	83
La estabilidad de HIF-1 $\alpha$ es dependiente de la actividad de PARP-1 .....	83
La inducción de ROS durante hipoxia conlleva una activación de PARP-1 y acumulación de HIF-1 $\alpha$ .....	85
PARP-1 interacciona con el dominio C-terminal de HIF-1 $\alpha$ regulando la estabilidad de la proteína. ....	88

HIF-1 $\alpha$ es modificado por poli(ADP-ribosa) en su C-terminal .....	91
El C-ter de HIF-1 $\alpha$ presenta secuencias de aminoácidos sustrato de modificación por poli(ADP-ribosa).....	93
La ausencia de PARP-1 altera el reclutamiento de HIF-1 $\alpha$ de manera dependiente de la función del gen diana. ....	95
La ausencia de PARP-1 reduce y altera el patrón de localización de HIF-1 $\alpha$ a la cromatina, especialmente en torno a los TSS. ....	100
La inhibición/ ausencia de PARP-1 impactan el fitness celular durante hipoxia.....	102
El estudio clínico de la inhibición de PARP-1 en eventos relacionados con la hipoxia.....	106
Discusión .....	111
Conclusions .....	121
Abreviaturas.....	123
Bibliografía .....	129



## Summary

Cancer is one of the most relevant diseases due to its social and economic impact. In 2018, 18.1 million new cases were diagnosed, and 9.6 million people died because of the disease. Considering that the number of patients is expected to increase up to a 60% on 2040, and the number of deaths up to a 70% compared to 2018, the interest in treating this disease is currently at its highest.

Cancer involves the disruption of multicellular coexisting routes. The cancer cell accumulates mutations that embarks it on a dedifferentiation process, in which single-cell survival pathways are overexpressed and become independent of multicellular regulation. Two of the main known survival routes are object of study on this Doctoral Thesis, those are the hypoxia response pathway and the DNA damage response pathway. During tumor progression, it is common to observe an induction of oxidative stress, as well as the appearance of areas with low oxygen concentration. In this aggressive microenvironment, selective forces will be generated selecting clones that overexpress both pathways, facilitating cell survival and disease progression.

The response to the hypoxic situation is one of the main events observed during the malignancy progression. When a tumor grows beyond a few cubic millimetres, oxygen limitation occurs in the central areas of the tumor mass. In this context, the stabilization and activation of the family of transcription factors known as hypoxia-inducible factors (HIFs) occurs, being HIF-1 $\alpha$  one of the best-known members of this family. These transcription factors induce genes related to activities related with the

adaptation to the hypoxic context, such as the activation of angiogenesis, enhancement of glycolysis, inhibition of oxidative respiration and global repression of transcription, among others.

On the other hand, one of the main components of the response to DNA damage (DDR) is the PARP-1 protein. In response to DNA damage and by consuming ATP and NAD<sup>+</sup>, PARP-1 generates a polymer of poly(ADP-ribose). Then PARP-1 binds this polymer to different proteins (including itself) modifying its activity and stability. PARP-1 participates in other activities independent of the DDR, such as the regulation of transcription, the conformation of chromatin and the response to inflammation, among others.

As indicated in the title of this Doctoral Thesis, in this work we explore the **“Relationship between PARP-1 and HIF-1 $\alpha$  proteins during tumor hypoxia”**. In our work we observe the overexpression of PARP-1 and HIF-1 $\alpha$  in melanoma, both at the protein level (in melanoma in situ), and at the mRNA level (in cutaneous, uveal and acral melanomas). On the other hand, we analyse in different tumor cell lines how treating with PARP inhibitors or with silenced PARP-1 causes a loss of stability on HIF-1 $\alpha$ . The opposite happens when silencing the PARG protein (which degrades the polymer), this leads to an increase on the stability of HIF-1 $\alpha$ .

Using different fluorescent probes for the determination of reactive oxygen species (ROS) we verify in tumor and non-tumor cell lines how ROS induction occurs during early hypoxia. When treating with antioxidants, we observe the same effect described when inhibiting PARP, the accumulation of poly (ADP-ribose) and the stability and activity of HIF-1 $\alpha$  decrease in both cases. This demonstrates how ROS production connects

with the activation of PARP-1, necessary for the stabilization and activation of HIF-1 $\alpha$  during early hypoxia.

Studies using different domains of HIF-1 $\alpha$  have allowed us to observe how it is the C-terminus domain of HIF-1 $\alpha$  the one that is susceptible of regulation via PARP-1. Using pull-down and immunoprecipitation assays we demonstrate how the C-ter domain of HIF-1 $\alpha$  binds to the self-modifying region of PARP-1. Using an in vitro PARylation assay we verified how, consequence of this physical interaction, the C-ter of HIF-1 $\alpha$  is modified by polymer in at least two amino acid sequences.

To conclude, we have performed a ChIP-Seq analysis in cells with PARP-1 WT or PARP-1 knockout obtained via CRISPR / Cas9. This assay allows us to observe how in the absence of PARP-1, HIF-1 $\alpha$  reduces its binding to the DNA and how this loss of recruitment occurs in a way that is dependent on the gene function. In the same way, we observe how the reduction of HIF-1 $\alpha$  occurs mainly in the promoter areas, especially one kilobase around the origin of transcription of the gene. We also verify how, even when HIF-1 $\alpha$  binds to its promoters, the absence of PARP-1 interferes with the correct expression of the genes.

Considering all the results described, we demonstrate the existence of a relationship between the DDR pathway and the response to hypoxia that could have a translational potential, since the HIF proteins lack specific inhibitors, while PARP inhibitors are already approved in the clinic.

A graphic of a DNA double helix, rendered in red and blue, forming a shape that resembles a pair of parentheses or a lens. The helix is oriented horizontally, with the strands curving inward to frame the central text.

INTRODUCCION

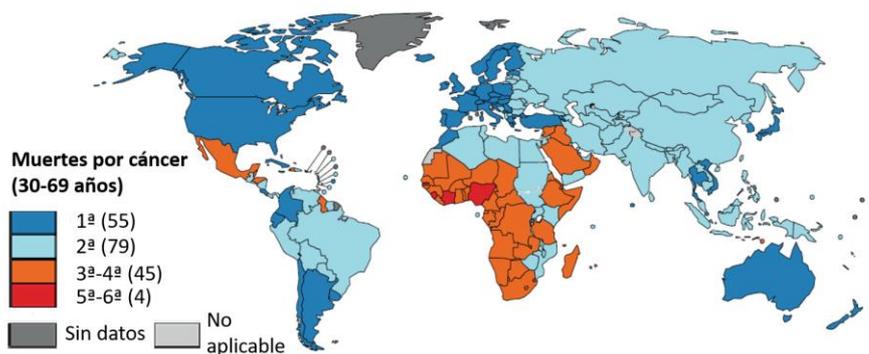


## Introducción

### Situación actual de la enfermedad de cáncer

#### El impacto mundial de la enfermedad.

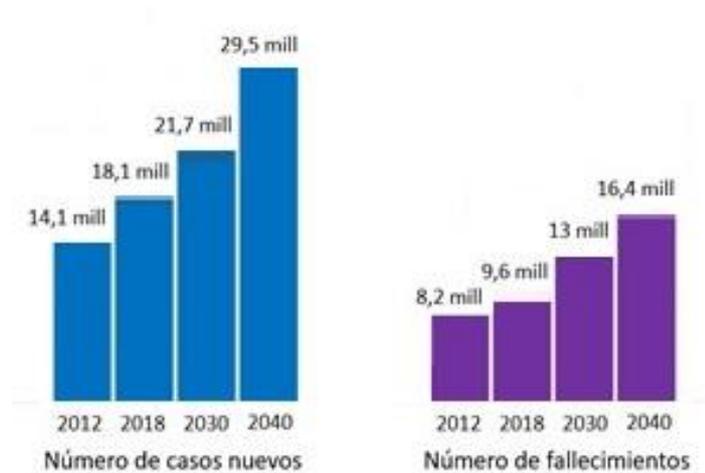
El cáncer es una enfermedad con un profundo impacto individual, social y económico. En el año 2018 se diagnosticaron 18,1 millones de nuevos casos y 9,6 millones de personas murieron a causa de la enfermedad en el mundo [1]. Actualmente el cáncer es la segunda causa de muerte global [2]. Una de cada seis muertes en 2018 se debió a la enfermedad de cáncer, siendo la primera o segunda causa de muerte prematura en 134 países y la tercera o cuarta en otros 45 (**Figura 1**) [3]. Además, la carga económica que supuso la patología ascendió a los 1,16 billones de dólares americanos a nivel mundial [4].



**Figura 1:** Mapa mundial mostrando la posición del cáncer como causa de muerte prematura (producida entre los 30 y 69 años). El número total de países para cada posición se encuentra indicado entre paréntesis. Adaptado de “*WHO Disease burden and mortality estimates, 2020*” [2].



Las perspectivas de futuro tampoco son alentadoras, basándose en la evolución demográfica se espera que el número de enfermos aumente en torno un 60% para 2040 (**Figura 2**) [5]. Por ello se estima que uno de cada ocho hombres y una de cada diez mujeres sufrirá la enfermedad a lo largo de su vida. Se prevén más de 15 millones de nuevos diagnósticos para la próxima década, incluso tras tomar buenas medidas de prevención [6]. Como consecuencia, se estima que para 2040 se incremente en un 50% la necesidad de fuerza de trabajo en el campo de la oncología, así como en la demanda de tratamientos [7]. Debido a este escenario, el interés por tratar y prevenir la enfermedad es de máxima relevancia hoy en día.



**Figura 2:** Expectativas en el incremento de número de casos y fallecimientos debidos al cáncer para los años 2030 y 2040 a nivel mundial. Adaptado de *“The Cancer Atlas, third edition”* [5].

En el pasado se ha considerado a la enfermedad de cáncer como una patología asociada a los países desarrollados o con alto IDH (índice de desarrollo humano). Sin embargo, durante los últimos 60 años el planeta ha experimentado profundos cambios demográficos. Estos cambios se han caracterizado por una reducción de la natalidad y un aumento general de la esperanza de vida. Esta transición

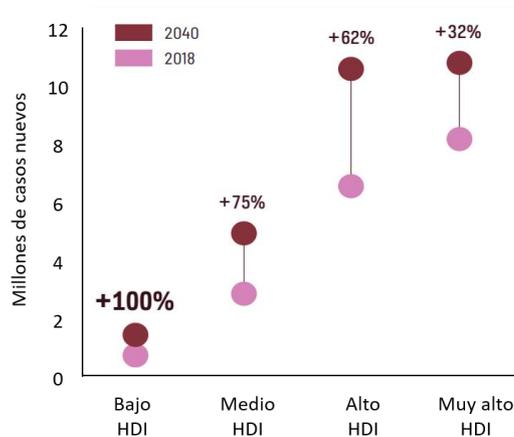


demográfica ha venido de la mano de una transición epidemiológica, caracterizada por una reducción de la mortalidad debida a causas infecciosas (gracias a mejoras en saneamiento, mayor acceso a antibióticos y vacunas) [3]. Debido a ello, se ha producido un incremento de la esperanza de vida principalmente en países poco desarrollados (con IDH bajo). Como consecuencia, ha aumentado la prevalencia de enfermedades crónicas ligadas a la tercera edad denominadas enfermedades no transmisibles (NCD, por sus siglas en inglés) como la diabetes, enfermedades cardiorrespiratorias, neurodegenerativas, y el cáncer. Las NCD fueron responsables de un 72% de las muertes mundiales en 2016 [3]. Por ello, estas enfermedades se han convertido en la principal causa de muerte a nivel mundial y la principal amenaza para vivir una vejez saludable. En respuesta a esta situación, la Organización de las Naciones Unidas se ha comprometido a reducir en un tercio las muertes causadas por las NCD en 2030 [8].

Observando los datos globales se puede afirmar que el cáncer es un problema que aumenta de forma global pero no homogénea (**Figura 3**). No debemos olvidar que las diferencias culturales y las desigualdades socioeconómicas afectan a la hora de prevenir y tratar la enfermedad. Existen profundas diferencias en incidencia, supervivencia y mortalidad dependiendo de la riqueza del país y de las clases sociales (especialmente en el caso de los países que carecen de un Sistema de Salud público y gratuito). Los mecanismos de prevención y vigilancia son deficientes en países con un menor IDH. Lo mismo sucede en cuanto al acceso a servicios quirúrgicos, presentes en el 95% de países con alto IDH pero sólo en un 25% de los que no [9]. En África se estima sólo hay equipamiento radiológico para dar cobertura al 18% de la población [10] y tan sólo 22% de sus países tienen acceso a medicación antitumoral [11]. La consecuencia es inevitable, mientras la mortalidad



del cáncer en países desarrollados es del 45%, en países con bajo IDH asciende hasta el 70% [1].



**Figura 3:** Número de nuevos diagnósticos cáncer esperados para 2040 basados en la prevista evolución demográfica de los países según su HDI. Adaptado de *“The Cancer Atlas, third edition”* [5].

## Epidemiología de los cánceres más frecuentes

Actualmente los cánceres más frecuentes diagnosticados a nivel mundial son: El cáncer de pulmón, mamá, colorrectal, próstata, estómago y cervical (**Figura 4**).

- **Pulmón:** Es el cáncer con mayor incidencia en el planeta (2.1 millones de nuevos diagnósticos en 2018) y también el que presenta mayor mortalidad (1.8 millones de muertes en el mismo año) [1]. Su supervivencia es aún limitada y su aparición se relaciona principalmente con el consumo de tabaco y sus derivados (entre un 80-85% de estos tumores se originaron con tabaquismo) [12]. A nivel global el tabaquismo se considera responsable del 63% de las muertes por cáncer de



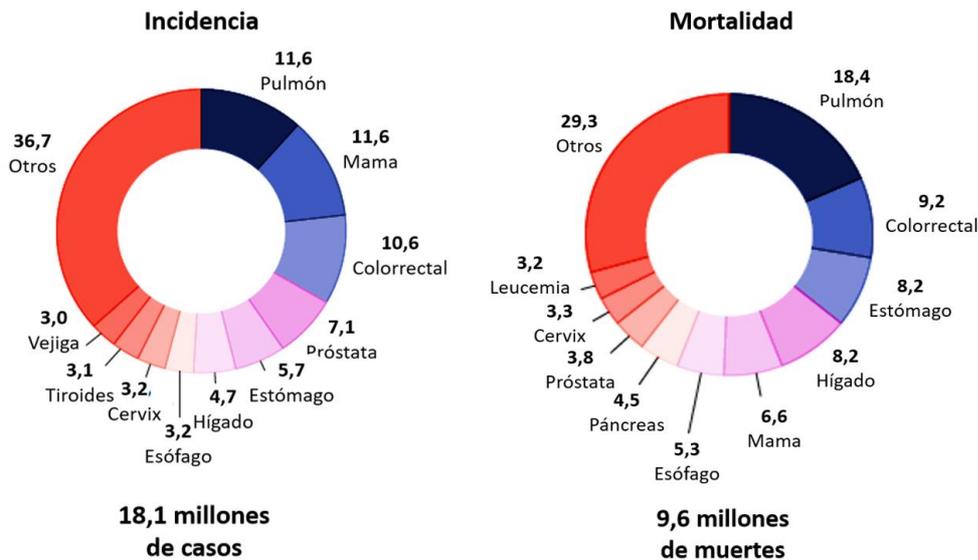
pulmón, ascendiendo este porcentaje al 90% en países donde fumar es prevalente para ambos sexos [13].

- *Mama*: Es el tipo de tumor más frecuente detectado en mujeres (2.1 millones de diagnósticos en 2018) y la principal causa de muerte femenina por cáncer (627.000 fallecimientos ese mismo año) [1]. Se relacionan con la aparición de esta enfermedad el retraso a la hora de tener el primer embarazo, la reducción en el número de hijos, así como cambios en la dieta, aumento en el consumo de alcohol, mayor sobrepeso y reducción de la actividad física [14]. Una mejora en los sistemas de detección y tratamiento, junto con una reducción de los comportamientos de riesgo, se consideran necesarios para mejorar estos datos. Esto es especialmente relevante en países en desarrollo. En ellos, el cambio hacia un estilo de vida occidental está aumentando considerablemente la prevalencia de este tipo de enfermedad [15].
- *Colorrectal*: Es el tercer cáncer más común en número de diagnósticos (1.8 millones de nuevos casos en 2018) y el segundo en términos de mortalidad (880.000 muertes durante el mismo año) [1]. La baja mortalidad comparada con la diagnosis refleja que este tipo de cáncer tiene una mejor prognosis. Programas para la mejora de la dieta, detección temprana, retirada y análisis de pólipos, son factores que explican la mejora en los datos de mortalidad en países con alto HDI en los últimos años. Sin embargo, de forma similar al cáncer de mama, países que están adoptando estilos de vida similares al nuestro están experimentando un incremento en este tipo de tumores. Por ello es recomendable para ellos aumentar la vigilancia y tratamiento [16].
- *Próstata*: Es el segundo más frecuente diagnosticado en hombres (1.3 millones de nuevos casos en 2018) y 360.000 muertes en ese año [1]. Su supervivencia ha



mejorado mucho al realizarse más pruebas de screening que permiten detectar casos asintomáticos o en estadios tempranos. Factores como la dieta y la falta de ejercicio físico se han relacionado con una mayor incidencia de la enfermedad [17][18].

- *Estómago*: Presentó en 2018 un millón de casos diagnosticados y 783.000 muertes [1], por ello actualmente se considera de supervivencia baja. En torno al 75-90% de los casos se relacionan con la cronificación de la infección por *Helicobacter Pylori* adquirida comúnmente durante la infancia [19]. Un aumento en las campañas para la detección de la bacteria, así como mejoras en la alimentación (principalmente relacionadas con el mejor transporte, almacenaje y desinfección de los alimentos) han ayudado a reducir el impacto de esta infección en el ser humano, especialmente en países con alto HDI [20].
- *Cervical*: Es el cuarto más común en mujeres tanto en diagnóstico (570.000 nuevos casos en 2018) como en mortalidad (311.000 fallecimientos en 2018) [1]. Se estima que la totalidad son consecuencia de la infección por virus del papiloma humano (VPH), especialmente los tipos 16, 18, 31 y 45 [21]. En las últimas décadas se ha observado un decline en la tasa de mortalidad debido al mayor screening y vigilancia [22]. Por ello la OMS ha lanzado campañas para potenciar la detección, mejorar la educación sobre educación sexual e higiene íntima, así como facilitar la vacunación entre otras medidas [23].



**Figura 4:** Incidencia y mortalidad de los tumores más frecuentes para 2018. Modificado de: “WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all” [24].

### Factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer

Se consideran como factores de riesgo a aquellos factores que contribuyen a la aparición de una enfermedad. Estos factores pueden ser químicos (tabaco, etanol), físicos (radiación UV, elementos radioactivos), biológicos (ciertos microorganismos patógenos) o incluso culturales (dieta, sedentarismo, número de hijos, o edad del primer embarazo entre otros). Consideraremos como cánceres asociados a un factor de riesgo a aquellos tumores que no se habrían desarrollado de haberse evitado la exposición a dicho elemento perjudicial.

Teniendo en cuenta su impacto sobre la salud humana, los principales agentes de riesgo a nivel global son: El tabaquismo, el consumo de alcohol, la obesidad y ciertas infecciones.



- *Tabaco*: Es la principal causa prevenible de cáncer a nivel mundial y está asociado con el desarrollo de al menos 20 tipos distintos de cáncer (pulmón, cavidad oral, faringe, estómago, hígado, páncreas y ovario entre muchos otros) [25][12]. El tabaco y sus productos derivados causan 2.4 millones de muertes al año a causa de cáncer [13]. A pesar de no ser objeto de esta Tesis Doctoral, es relevante mencionar los 3.1 millones de muertes que causa por enfermedades vasculares al año, o los 1.5 millones de fallecimientos ligados a enfermedades pulmonares crónicas [13]. Es por ello urgente aumentar los esfuerzos para reducir la lacra que supone el tabaquismo. En esta dirección, durante la “*WHO framework Convention on Tobacco Control*” 181 países se comprometieron a reducir el consumo de tabaco en un 30% para 2025 [26]. Este esfuerzo ha de realizarse con mayor intensidad en países con HDI medio o bajo, donde se consume aproximadamente el 80% del tabaco y sus derivados a nivel mundial y donde la capacidad de dar tratamiento al cáncer de pulmón es más limitada [27].
- *Alcohol*: De gran impacto en la salud humana, se relaciona directamente con un 4.2% de las muertes ligas al cáncer (376.200 muertes en 2016) [28]. Este impacto sin embargo depende del rango de edad, teniendo mayor relevancia entre la población joven (13.9% de las muertes por cáncer para el rango de 30-34 años) y más reducida en la tercera edad (responsable de un 2.7% de las muertes en el rango de los 80-84 años) [29].

El alcohol se relaciona con la inducción de la tumorigénesis mediante la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) y moléculas carcinogénicas como el cetaldehído. Estas moléculas se generan a través del procesamiento del etanol durante el metabolismo hepático [30]. Dejando de lado otras enfermedades, el alcohol está relacionado directamente con el desarrollo de cáncer de cavidad oral, laringe, faringe, esófago, colon, recto, hígado y mama entre otros [31]. Otras



asociaciones han sido puestas en duda debido a que el consumo de alcohol suele ir ligado a otras conductas de riesgo (dietas desequilibradas y consumo de tabaco principalmente).

Entre al año 2010 y 2016 el impacto del alcohol sobre la mortalidad en cáncer no se redujo, sino que se estabilizó o aumentó ligeramente (pasando del 4.1 al 4.2% respectivamente) [28]. Por ello, los estados han de seguir impulsando medidas para la prevención y reducción de su consumo. Entre estas acciones se recomienda el aumento de su precio mediante impuestos, restringir su acceso en comercios, o limitar su publicidad entre otras medidas [32].

- *Obesidad, nutrición y ejercicio:* Un exceso de masa grasa se relaciona con el desarrollo de diversos tipos de cáncer. Un ejemplo son el cáncer de esófago, gástrico, colon, recto, vesícula biliar, hígado, páncreas, tiroides, riñón, endometrio, ovario y mama postmenopáusico entre otros [33]. Este problema es especialmente relevante en países con alto o muy alto IDH, en ellos el cáncer atribuido a la obesidad es de dos a tres veces superior al observado en países con HDI medio o bajo. Por ello, dependiendo del país, habrá que hacer esfuerzos para evitar que la obesidad se convierta en un problema endémico o generar programas para reducirla en caso de que ya lo sea [34].

En 2015 la IARC describió las carnes procesadas como *carcinógenas* y las carnes rojas como *posiblemente carcinógenas* [35]. Comer frutas y verduras es beneficioso, aunque su efecto positivo sobre el cáncer es menos intenso de lo previsto. Sí han presentado un claro efecto protector frente al cáncer (y enfermedades cardio metabólicas) el consumo de cereales integrales y la ingesta de proteínas y grasas de origen vegetal [36]. Una vez el tumor se ha desarrollado, la dieta parece tener un valor incierto en la prognosis, ésta parece depender mucho



del tipo de tumor. Es relevante sin embargo destacar como en pacientes con cáncer de colon en estadio III, la adherencia a las recomendaciones nutricionales de la sociedad americana contra el cáncer se relacionó con un 42% menos de muerte durante el periodo de estudio mejorando un 31% la supervivencia libre de enfermedad [37].

Al igual que con otros factores de riesgo, realizar asociaciones entre nutrición y cáncer es complejo, pues siempre hay estilos de vida asociados que pueden desvirtuar los resultados. Por ejemplo, en la década de 1970 varios estudios relacionaron el consumo de café con el cáncer de vejiga o páncreas. Estas conclusiones se diluyeron al observarse la relación existente entre el consumo de café y de tabaco. Hoy en día se ha descrito que el café reduce el riesgo de sufrir cáncer de endometrio [36] y otros tipos tumorales [38].

La actividad física se ha visto reduce de forma significativa el riesgo de padecer cáncer [39]. Reduce especialmente aquellos de orofaringe, riñón, vejiga, colon, mama y endometrio [36]. Varias hipótesis para explicar este hecho serían la reducción del tejido adiposo, reajustes en el balance hormonal, o la mejor regulación de procesos oxidativos [40].

Los niveles de inactividad física van en aumento día a día, estando presentes en un 24% a nivel global [41]. Desarrollar programas para evitar el sedentarismo tendría un impacto sobre la prevalencia de NCD, incluyendo el cáncer.

- *Infecciones:* Se estima que un 13% de los cánceres que se diagnostican al año tienen como responsable un agente infeccioso [42]. Hoy en día se han descrito 11 agentes infecciosos relacionados con la aparición de cáncer. Incluyen la bacteria *Helicobacter pylori*, 7 virus (VPH, virus de la hepatitis B y C, EBV, KSHV, HTLV-1 y



VIH) y 3 macroparásitos (*Schistosoma haematobium*, *Opisthorchis viverrini* y *Clonorchis sinensis*) [43].

La prevalencia es diferente entre países según su índice de desarrollo. Países con HDI alto o muy alto presentan un 21% de cánceres atribuibles a causas infecciosas, mientras que en países con HDI medio o bajo este valor asciende al 47% [21]. Por áreas geográficas se observa como en Eurasia, Europa y Norteamérica menos del 5% de los tumores presentan un origen infeccioso, mientras que en el África subsahariana un tercio de los tumores tienen su origen en la infección por algún patógeno [44]. Con todo ello no es de extrañar que aquellos países con menor IDH acumulen dos tercios de los diagnósticos de cáncer asociados a infecciones [21]. Es de vital importancia aumentar la accesibilidad a vacunas y el desarrollo de programas de detección y tratamiento temprano.

- **Radiación:** Uno de los principales factores de riesgo a la hora del desarrollo de melanoma es la exposición excesiva a la radiación ultravioleta, siendo la fuente más común en nuestro día a día la procedente del sol. En 2018 se diagnosticaron 290.000 nuevos casos, y fallecieron a causa de esta enfermedad 61.000 personas [1].

La exposición solar presenta claros beneficios para la salud (favorece la liberación de serotonina, la regulación del ciclo de la melatonina, o la activación de la vitamina D entre otros) [45]. Sin embargo, un exceso de exposición a esta fuente de radiación ultravioleta conlleva riesgos como el aumento de fotolesiones en el ADN, proceso ligado al desarrollo de carcinogénesis [46]. Dado que la concentración de radiación UV en superficie es altamente variable, dependiendo de la latitud, altitud, hora del día y condiciones atmosféricas (cubierta de nubes, partículas en suspensión, etc.) [47]. Por ello, la OMS recomienda reducir cualquier exposición innecesaria al sol, especialmente en los meses de verano y en las horas centrales del día, cuando esta



radiación es más intensa [48]. Históricamente el melanoma ha tenido una prevalencia baja. Sin embargo, debido a cambios culturales en los últimos 50 años su incidencia ha experimentado un aumento superior al de otros tipos de cáncer [49].

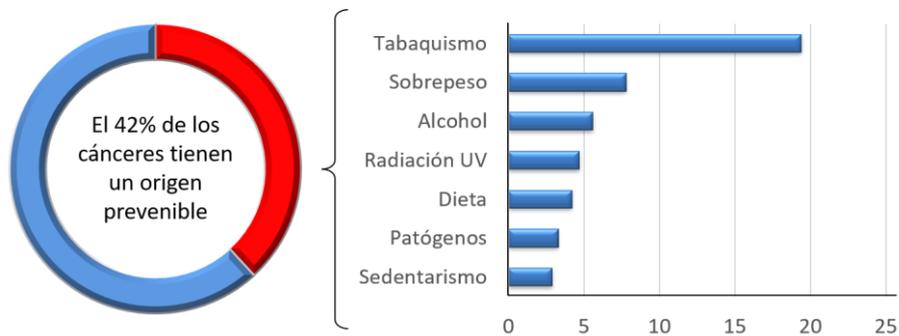
La exposición continuada a radiación UV se relaciona con la acumulación de mutaciones ligadas a la carcinogénesis. Se han estudiado dos causas principales: La excitación directa de nucleótidos mediada por los UVB (280-315 nm), y la inducción de estrés oxidativo e inflamación continuada causada por los UVA (315-400 nm). A pesar de que muchas investigaciones iniciales se centraron en el efecto de la radiación UVB sobre el ADN [50], hoy se considera más relevante el estado inflamatorio cronicado producido por los rayos UVA. Incluyen la generación de ROS e NOS, causando la activación de NFκB, AP1 y STAT entre otros. Ello resulta en un estado inflamatorio que de ser sostenido ayudará en el proceso de carcinogénesis [51][52].

Habiéndose descrito la exposición solar excesiva pero intermitente en el tiempo como el mayor factor de riesgo a la hora de sufrir un melanoma, es de vital importancia aplicar medidas de educación en prevención para la población. Cambiar hábitos de ocio, legislar contra las cámaras de bronceado en aquellas zonas donde aún son permitidas [53], evitar siempre que sea posible la exposición al Sol cuando su intensidad es mayor, especialmente entre las 9:00 y las 15:00, usar fotoprotección siempre que sea posible y luchar contra falsas creencias como que los días nublados o los días fríos son de menor riesgo [54].

Estos datos muestran cómo, a pesar de la idea generalmente extendida, la aparición de cáncer no es un fenómeno inevitable. De hecho, un 42% de los casos de cáncer diagnosticados en EEUU en 2018 podrían haberse evitado (**Figura 5**).



Siendo responsables del total de tumores: Tabaquismo (19%), sobrepeso (7,8%), alcohol (5,6%), radiación UV (4,7%), infecciones (3,1%) y sedentarismo (2,9%).



**Figura 5:** Porcentaje de tumores asociados a un factor de riesgo que podría haber sido evitado en los EEUU para 2018. Adaptado de *“Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States, 2018”* [55].

## El origen de la enfermedad de cáncer

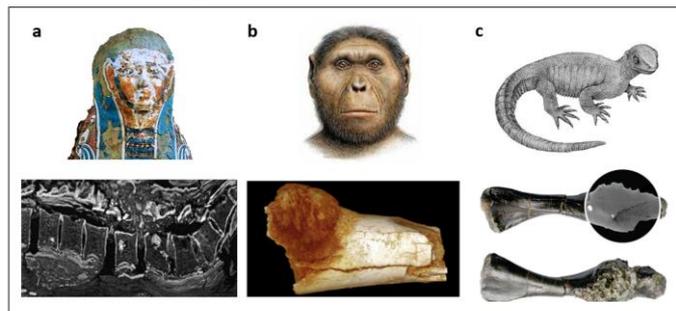
### El cáncer, un compañero ancestral.

El cáncer es una enfermedad compleja y dinámica, caracterizada por la malignización progresiva, invasión de órganos distantes, y generación de resistencia a los tratamientos. Por ello el abordaje de la enfermedad es complejo, y de no tratarse, la supervivencia baja.

Comprender las dinámicas detrás de la alta adaptabilidad del cáncer, y cuál es el origen de su versatilidad, es clave para poder decidir las estrategias para hacer frente a la enfermedad. Es muy difícil, si no imposible, curar aquello que no se comprende.



Si queremos comprender el origen del cáncer, hemos de contradecir una idea comúnmente extendida: que el cáncer es una enfermedad de origen reciente. Ya hemos explicado los motivos que causan su incremento hoy en día, principalmente el aumento de la esperanza de vida y el envejecimiento general de la población. Sin embargo, aunque tuviera menos prevalencia en el pasado, el cáncer ha sido compañero de los seres vivos desde tiempo ancestral (**Figura 6**). En humanos ha sido frecuente encontrar mención a esta enfermedad en registros médicos antiguos [56][57]. De forma directa se ha observado en tejidos blandos de restos momificados [58]. El registro más antiguo en homínidos se ha descrito para un osteosarcoma aparecido hace 1,7 millones de años en Sudáfrica [59]. Lógicamente esta enfermedad no solo afecta al ser humano, el registro más antiguo de malignización corresponde a un tumor óseo perteneciente a un *Pappochelys rosinae*, antecesor de las tortugas que habitó la Tierra hace 240 millones de años, durante el Triásico [60], antes de que los dinosaurios dominaran la Tierra.



**Figura 6:** El cáncer no es una enfermedad moderna. (a) Restos momificados en Egipto (285–30 AC) presentando lesiones metastásicas en la columna vertebral. (b) Primer cáncer detectado en homínidos, osteosarcoma el 5º metatarso en un ejemplar de *Paranthropus robustus* (1,7 MA). (c) Registro más antiguo de cáncer detectado en el registro fósil, perteneciente a un ejemplar de *Pappochelys rosinae*. (240 MA).



A parte del registro fósil, observamos enfermedades similares al cáncer (caracterizadas por la desdiferenciación celular, división descontrolada, formación de una masa, etc.) en los siete clados del árbol evolutivo en los que se ha desarrollado la multicelularidad celular; metazoa, ascomicetos, basidiomicetos, embriofitas, clorófitas, rodocios y feofitas. El hecho de que grupos que divergieron evolutivamente hace millones de años presenten similares alteraciones, refleja la ubicuidad y persistencia de este tipo de enfermedades a lo largo del tiempo, así como la estrecha relación que existe entre la multicelularidad y la enfermedad del cáncer [61].

Dentro de los clados que desarrollaron multicelularidad, parece existir una mayor incidencia de cáncer en el grupo de los animales (metazoa). Esta incidencia puede ser debida al tipo de organización multicelular que presentan; en el grupo de los animales se observa una mayor tasa metabólica cuando se compara con otros organismos, poseen mayor diversidad funcional (con gran diversidad de células especializadas), y la tasa de división y reposición celular es mayor que en otros grupos pluricelulares. Todo ello junto con un sistema circulatorio que no sólo transporta nutrientes, sino también tipos celulares, favorece procesos de migración y metástasis durante la malignización [62].

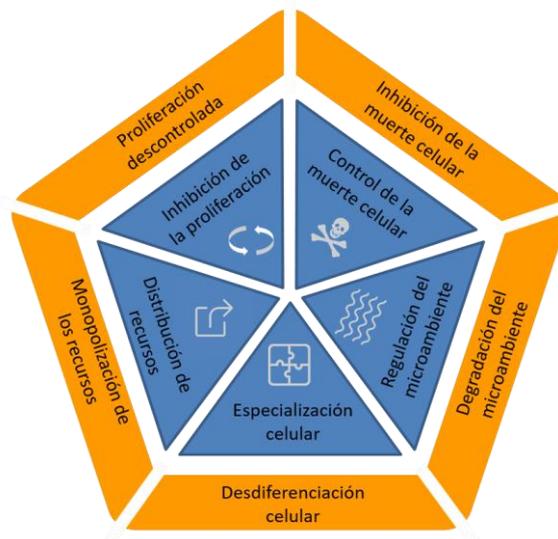
Dentro del estudio del cáncer en el clado de los metazoa, observamos como en los animales el estudio de la enfermedad posee un claro sesgo antropocéntrico. Desde hace ya varias décadas la inmensa mayoría de estudios oncológicos se centran en humanos o ratones [63][64]. Una minoría de trabajos ha estudiado a otros grupos de animales en cautividad [65] y casi ningún estudio ha analizado la prevalencia de la enfermedad en animales salvajes [66][67]. Ello ha permitido la comprensión de la enfermedad en el ser humano, pero a nivel ecológico el impacto de la enfermedad en las poblaciones salvaje sigue siendo ampliamente desconocido.



## Los pilares de la multicelularidad

La aparición de la multicelularidad implicó una enorme ventaja evolutiva sobre los organismos unicelulares [68]. El hecho de que una célula no dependiera únicamente de sí misma para realizar todas sus funciones vitales permitió la aparición de la diferenciación y especialización celular, gracias a la cuál distintas células pasaron a encargarse de diferentes procesos. Como consecuencia se consiguió; un aumento del tamaño, se refinó la recepción y respuesta a estímulos, se mejoró la capacidad de desplazamiento, se incrementaron las opciones nutricionales y también la acumulación de sustancias de reserva. Todo ello permitió aumentar enormemente la diversidad y posibilidades de supervivencia de estos nuevos individuos/multiindividuo [69][70].

Los organismos multicelulares han de enfrentarse a dos grandes desafíos: Por un lado han de responder a las amenazas externas, tales como la escasez de recursos, presencia de depredadores, etc. Por otro lado han de resolver la amenaza interna que supone el mantener la propia integridad y cooperación celular. Para ello la multicelularidad posee cinco pilares básicos que garantizan la convivencia y supervivencia celular [71]. Los pilares son: inhibición de la proliferación celular [72], regulación de procesos de muerte celular [73], diferenciación para la realización de tareas [74], transporte de recursos [75] y creación y mantenimiento de un ambiente intercelular no agresivo [76]. Estos pilares son los que se alteran o pierdan de forma progresiva durante el proceso de carcinogénesis (**Figura 7**).



**Figura 7:** Los 5 pilares de la multicelularidad son presentados en azul. En naranja se presentan las alteraciones en estos cinco pilares, necesarios durante el proceso de tumorigénesis. Adaptado de *“Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity”* [61].

Estos pilares están codificados bajo la forma de estrechas rutas metabólicas y de señalización que permiten a las células vivir en un ambiente interno protegido y estrechamente regulado. El único precio a pagar consiste en reducir el “bienestar” celular en favor del “bienestar” del individuo. Es decir, la supervivencia del individuo multicelular pasa a ser más importante que la supervivencia de las células que lo componen [72][77].

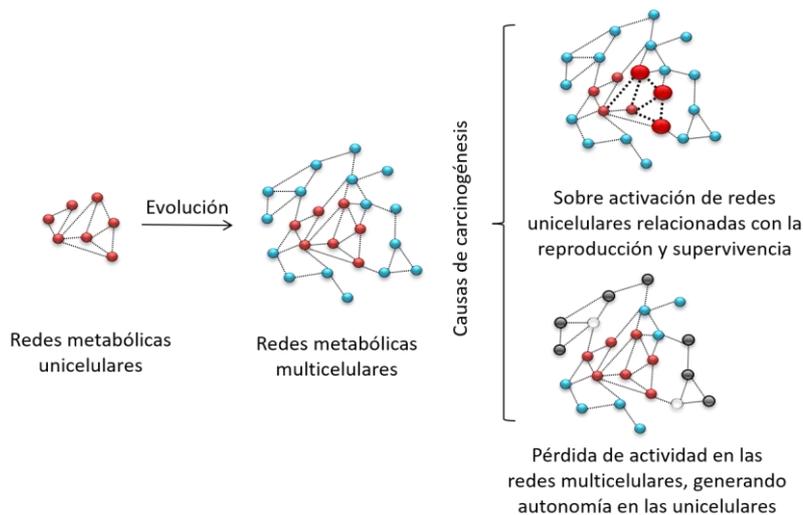
El aumento de complejidad que supone la convivencia multicelular vino de la mano de un aumento en la complejidad genética. Sobre las redes primitivas que codificaban las estrategias de supervivencia básica unicelulares (relacionadas con procesos como la glucólisis, daño al ADN, respuesta a hipoxia, supervivencia a cambios en pH o capacidad de movilidad entre otras), surgieron nuevas redes orientadas a la supervivencia no ya de la célula, sino del organismo (rutas de



diferenciación, comunicación intercelular, inhibición de la proliferación celular o regulación de los procesos de muerte entre otras). De esta forma se fueron seleccionando los cinco pilares de la multicelularidad y se garantizó la coordinación entre células [78].

Estas redes de coordinación celular han ido apareciendo y seleccionándose a lo largo de cientos de millones de años. Su robustez permite la cooperación y supervivencia de los organismos multicelulares. Sin embargo, estas redes presentan zonas vulnerables (ciertos elementos que regulan procesos sensibles, o que coordinan ciertas rutas claves simultáneamente). Es por ello que son mutaciones en estos “nodos” sensibles, y no cualquier mutación al azar en el genoma, los que inician el camino de la tumorigénesis [79]. Un 91% de los tumores analizados en el estudio *“Pan-Cancer análisis of whole genomes”* presentan al menos una mutación en alguno de estos “nodos”, generando mutaciones iniciadoras de la tumorigénesis [80]. La media de elementos claves mutados en todos los tumores estudiados es de 4,6 alteraciones. Estas mutaciones afectan a elementos clave para el mantenimiento de la multicelularidad como p53, BRCA1, BRCA2, ATM entre otros.

De esta forma en los procesos tumorales estas redes de coordinación genética se desarticulan, se rompe la comunicación y la colaboración establecida durante la multicelularidad y por ello la célula tumoral recupera cierta “autonomía”. Las redes multicelulares pierden su capacidad de control y en consecuencia las redes primitivas de supervivencia permiten a la célula crecer y reproducirse sin control externo [81] (**Figura 8**).



**Figura 8:** A lo largo de la evolución multicelular, las redes metabólicas unicelulares pasaron a ser reguladas por nuevas redes de convivencia multicelular. Durante la carcinogénesis estas redes unicelulares son capaces de recuperar su autonomía. Adaptado de “How the evolution of multicellularity set the stage for cancer, 2018.” [82].

Al ir degradándose los pilares de la multicelularidad, las células tumorales se desdiferencian y comienzan a presentar características propias de organismos unicelulares. Entre otras similitudes encontramos el uso de estrategias de competición frente a las de colaboración, dependencia en procesos fermentativos, elevada tasa de división, alta inestabilidad genómica, etc. [83]. Según la hipótesis atávica estas similitudes no serían fruto de la casualidad, sino consecuencia de la toma de control de las redes primitivas durante el desarrollo del cáncer [84]. De hecho, la célula tumoral enfrenta muchos de los desafíos para los que los organismos unicelulares están adaptados para sobrevivir, entre ellos se destacan la falta de nutrientes, aumento del estrés oxidativo, situaciones de pH bajo, necesidad de movilidad, adaptación al daño en el ADN, o falta de oxígeno entre otros [85].



A la hora de tratar la enfermedad es importante hacer hincapié en que estas redes primitivas, al ser imprescindibles para la supervivencia celular, presentan una gran resistencia a los tratamientos. Esto es debido a dos características principales: Por un lado estas redes presentar redundancia, es decir, las rutas pueden conducir la misma información por distintas redes en paralelo [86]. Por otro lado estas rutas también presentan plasticidad, según la cual los elementos de la red se pueden reconfigurar para transportar la información [87]. Ello explica lo difícil que resulta acabar con la célula tumoral una vez se ha perdido la regulación por las redes multicelulares.

### El cáncer esculpe a la evolución.

Mantener y regular la convivencia de las  $3,72 \times 10^{13}$  células que se estima un cuerpo humano adulto posee (o lo “poseen”) [88] es una tarea enormemente compleja que requiere de mecanismos de regulación altamente seleccionados y del consumo de una gran cantidad de recursos. Es por ello que es raro encontrar casos de cáncer durante las primeras etapas de la vida, pues durante la evolución se han seleccionado potentes mecanismos que garantizan la cooperación celular hasta alcanzar la maduración sexual del individuo. Tras el descenso de la eficacia reproductiva, ya no es posible transmitir nuevos mecanismos de control a las nuevas generaciones. Por este motivo se produce un declive progresivo del organismo [89]. Este declive metabólico aumenta debido, entre otros factores, a la acumulación de mutaciones somáticas [90][91] y al descenso de la actividad de las células madre de tejido [92][93]. Este deterioro continúa progresivamente hasta concluir con el fallo irreversible de algún órgano vital o con la ruptura de la cooperación celular y la aparición de células tumorigénicas.



Los mecanismos destinados a la regulación de la cooperación multicelular que se van perdiendo al aumentar la edad pueden ser intracelulares o sistémicos:

- *Intracelulares:* Son todos aquellos mecanismos celulares que facilitan el mantenimiento de la cooperación. Entre ellos están los puntos de control (o *check points*) del ciclo celular [94], rutas de señalización y reparación del daño al ADN que garantizan la integridad del material genético celular [95], mecanismos de muerte celular programada como la apoptosis en caso de que las alteraciones en una célula sean irreparables [96], inducción de procesos de senescencia para evitar la reproducción de células alteradas [97] o protección de la estructura cromosómica mediante telómeros [98].
- *Sistémicos:* Son todos aquellos sistemas que velan por la cooperación celular. Un ejemplo es el sistema inmunitario, que realiza funciones de vigilancia eliminando aquellas células que presentan proteínas extrañas en su superficie [99]. Otro tipo de defensas frente a los procesos de malignización proceden de la configuración tisular: Desde la estrecha regulación de los nichos para las células madre de tejido [100], hasta la organización tisular en módulos con un limitado número de divisiones somáticas permitidas [101].

### La evolución esculpe al cáncer.

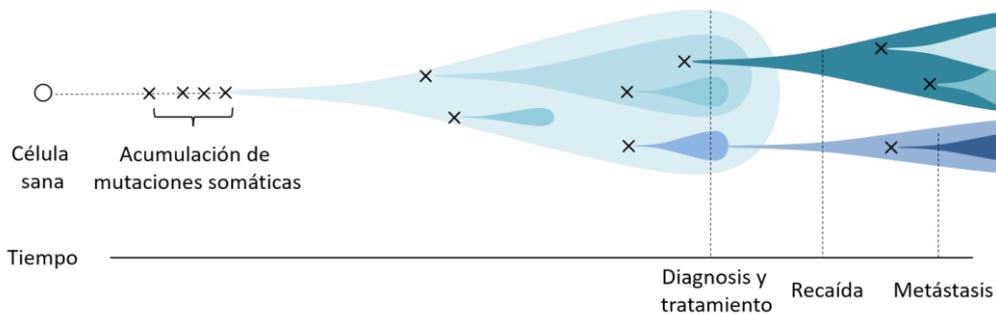
Como ya hemos señalado, al avanzar la edad del individuo se van acumulando mutaciones. Cada mitosis posee un número de mutaciones basal y algunas no se resuelven. Por ello el cáncer parece un precio a pagar resultado del aumento de la longevidad [102], lo mismo sucede para otras enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas asociadas al aumento de la inestabilidad genómica observadas en la tercera edad [103][104][105].



Hemos descrito cómo cáncer y evolución son dos procesos íntimamente ligados, siendo imposible entender uno sin el otro. Desde que en la década de 1970 se hipotetizó que el cáncer era un proceso evolutivo, múltiples trabajos han demostrado esta idea [106]. De la misma forma en que durante la evolución de la multicelularidad se seleccionaron mecanismos para evitar la aparición de células independientes, durante la progresión tumoral se seleccionarán aquellos clones celulares con una agresividad mayor [107].

Cuando una mutación no es detectada y reparada, pasa a la nueva generación. Estas mutaciones pueden no tener efecto, causar un fenotipo deletéreo que acabe con la célula, o en la minoría de los casos, causar una ventaja adaptativa y una expansión clonal de estas células. De esta forma comienza una competición entre ellas y el entorno. Esta competición posee características similares a la observada durante la evolución de los organismos. Durante el desarrollo tumoral se producirá una variabilidad heredable, deriva genética y selección darwiniana. De esta forma se irán seleccionando clones cada vez más agresivos [108][109].

No es por ello de extrañar que en un contexto de alta inestabilidad genómica (este concepto incluye a todas las alteraciones genéticas, desde cromosómicas a nucleotídicas) se acumulen nuevas mutaciones o alteraciones de forma habitual. Esta heterogeneidad genética observada en la mayoría de los tumores es un ingrediente necesario para el proceso de malignización. Las células tendrán que enfrentarse a los mecanismos antitumorales intracelulares y sistémicos descritos anteriormente, así como a la competición por los recursos con las células colindantes. Ello genera numerosos cuellos de botella (**Figura 9**) [110], los cuales impulsan una evolución en las poblaciones celulares presentes durante la malignización [111][112][113].



**Figura 9:** La evolución tumoral se caracteriza por la aparición progresiva de mutaciones. Ello genera subpoblaciones celulares que compiten entre sí disparando la progresión tumoral y supervivencia a los tratamientos. Adaptado de *“Evolution of the cancer genome”* [114].

Por otro lado, no solo la competición entre las células tumorales es importante. El ambiente tumoral jugará un papel crucial durante la selección celular. La presencia de moléculas oxidativas, situaciones de hipoxia, limitación de nutrientes, alteraciones en el pH, acción inflamatoria del sistema inmunitario, etc. Por ello, debido a las enormes fuerzas selectivas en juego, durante esta lucha por la supervivencia las células que retienen más características multicelulares acaban muriendo, mientras que aquellas que rescatan fenotipos unicelulares se vuelven más resistentes y terminan por desplazar a aquellas menos transformadas [115][84]. Esta variabilidad genética permite que un mínimo de células pueda seleccionarse en cada etapa y expandirse, produciéndose el auge y caída de diferentes poblaciones en el proceso de progresión tumoral. Por fortuna, de partida ninguna célula del tumor está equipada con la maquinaria necesaria para sobrevivir a todos los desafíos que se le presentarán. Durante la tumorigénesis el cáncer irá adaptándose generando las características distintivas de la enfermedad; inestabilidad genómica, producción de señales de proliferación, evasión de los



supresores de proliferación, evitación/inactivación del sistema inmunitario, inmortalización, inflamación crónica, angiogénesis, evasión de la muerte celular, alteración del metabolismo y activación de la capacidad invasiva [64]. Por ello, la progresión tumoral es un proceso que requiere tiempo (habitualmente de meses a años), tiempo suficiente en la mayoría de los casos para realizar un diagnóstico y decidir el abordaje más adecuado de la enfermedad.

Por ello podemos concluir que la carcinogénesis se ve esculpida por la evolución. Del mismo modo, la evolución de los organismos multicelulares los ha seleccionado para evitar la aparición de esta enfermedad [107].

### El microambiente tumoral. Aquí no hay quien viva.

El estudio del ambiente tumoral ha ido ganando relevancia en las últimas décadas. Desde que la heterogenicidad intratumoral fue descrita [106], la comprensión del cáncer ha cambiado radicalmente; de entender el tumor como una única unidad homogénea, se ha pasado a entenderlo como un ecosistema altamente diverso y con una alta complejidad espacio temporal. En este microambiente encontramos una alta diversidad de tipos celulares, que conviven en distintos nichos caracterizados por la presencia de una variedad de macromoléculas, afectando todos estos elementos a las propiedades biológicas y físicas del entorno tumoral (**Figura 10**).

Entre los principales componentes celulares del microambiente tumoral distinguimos las células tumorales propiamente y las células sanas del organismo. Se estima que hasta un 50% de las células contenidas en la masa tumoral no son de origen canceroso [116]. Entre estas células no transformadas encontramos a las



células propias del tejido, células vasculares y células del sistema inmunitario. Todos estos tipos celulares (no solo los tumorales) pueden participar en la progresión de la enfermedad.

- *Células tumorales:* Son un grupo celular heterogéneo que presenta distintas mutaciones y por ello diferentes grados de transformación. Son seleccionadas de forma distinta según las características del nicho que las contiene.
- *Células sanas del tejido:* Contienen al tumor y presentan distintas características dependiendo del tejido de origen.
- *Células vasculares:* La irrigación es uno de los elementos más importantes en la progresión tumoral. El rápido crecimiento tumoral genera vasos inmaduros y desestructurados, que son poco eficientes a la hora de transportar nutrientes y retirar desechos. Su alta permeabilización facilita la intravasación celular y la formación de metástasis [116].
- *Células del sistema inmunitario:* Ya en el Siglo XIX se hipotetizó que el cáncer poseía las características de una inflamación crónica. Desde entonces se ha comprendido cómo una gran variedad de tipos celulares inmunitarios juegan distintos papeles en el desarrollo del tumor [117]. *Linfocitos T:* Son células encargadas de la destrucción de células tumorales inmunogénicas. Su infiltración se relaciona con una mejor prognosis [118][119]. Sin embargo, en estadios avanzados de la enfermedad su eficacia puede verse reducida por la selección de clones tumorales que evadan la respuesta inmune [120] o potencien el reclutamiento de células Treg inmunosupresoras [121]. *Linfocitos B:* Son células encargadas de la producción y secreción de anticuerpos. Su rol en la carcinogénesis es poco comprendido [122]; se ha relacionado con la resistencia a las terapias y con la inmunosupresión [123]. Ligado a su actividad, generan un depósito de inmunoglobulinas relacionado con el mantenimiento de un estado inflamatorio y generación de angiogénesis [124]. Todo ello se relaciona con una promoción del crecimiento tumoral, la metástasis y



la peor prognosis [125][126]. *Macrófagos*: Su rol es dual, inicialmente eliminan a los clones tumorales más inmunogénicos [127], al cronificarse la enfermedad pasan a tener un rol pro-tumoral al estimular la angio y linfoangiogénesis [128], aumentar la transición epitelio mesénquima [129], remodelar la matriz extracelular facilitando la proliferación y metástasis [130]. Además, generan inmunosupresión al impedir la actividad de linfocitos T efectores e inhibiendo a células dendríticas [131]. *Neutrófilos*: Son las primeras células inmunitarias en llegar a la lesión y se cree que contribuyen a la aparición y mantenimiento de la inflamación tumoral [132]. Al generar la liberación de elastina, VEGF y MMP9 entre otras, se ha relacionado con un aumento de la angiogénesis, invasión, y proliferación tumoral [133][134]. *Fibroblastos*: Se relacionan con la generación de metástasis al facilitar la migración de células tumorales a los vasos sanguíneos mediante el remodelado de la matriz extracelular [135]. *Natural Killer*: Se encargan de la destrucción de células transformadas gracias a su actividad citotóxica [136]. Se ha descrito que tienen un marcado rol antitumoral [137]. Su presencia en el tumor está ligada a una reducción del riesgo de metástasis y una mejora de la prognosis [138]. *Células dendríticas*: Son células especializadas en conectar la respuesta inmunitaria innata y adaptativa mediante la presentación de antígenos a las células T. Dependiendo del contexto inflamatorio y las señales coactivadoras, las células pueden activar la respuesta inmunitaria o ser inmunosupresoras. Su rol en el tumor necesita ser más estudiado [139][140][141].

Por otro lado, una masa tumoral no son sólo células. Todas ellas se encuentran embebidas en una matriz extracelular caracterizada por la presencia de agua, gases, sales minerales, macromoléculas fibrosas (laminina, elastina, colágeno), proteoglicanos, polisacáridos y factores de crecimiento entre otros. Este entorno afecta a la comunicación intercelular, capacidad de adhesión, velocidad de migración y proliferación celular [142][143]. Es relevante destacar cómo la interacción entre las distintas líneas celulares y la matriz que las rodea genera



alteraciones en ciertas características clave del entorno como la concentración de oxígeno, cantidad de nutrientes, acumulación de material de desecho, bajada del pH, aparición de estrés oxidativo, etc.

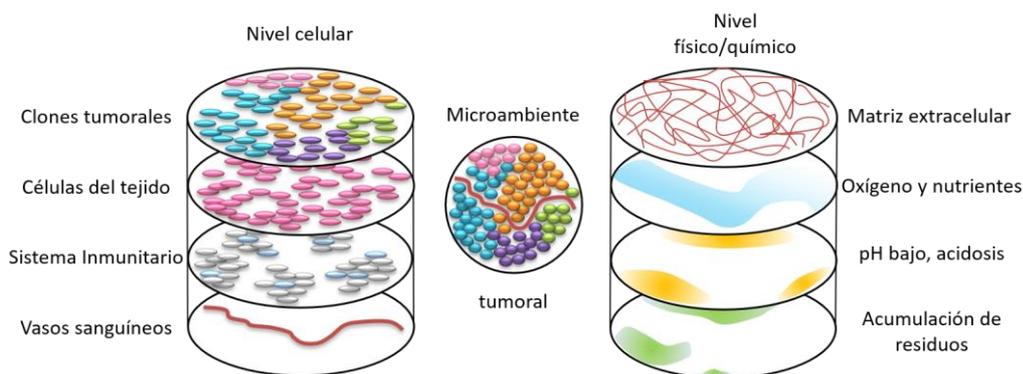
Por ello, desde hace algunos años se ha comprendido que no sólo las mutaciones o alteraciones genéticas son relevantes para entender esta enfermedad, el microambiente tumoral es de enorme importancia. No podemos olvidar que durante la selección clonal, es el ambiente el que selecciona los fenotipos que presentan una mejor capacidad adaptativa .

Esta estrecha relación entre la progresión tumoral y el microambiente alterado plantea la cuestión de qué se genera antes; las mutaciones pretumorales; o la alteración del microambiente celular. Se ha constatado que en ciertos tumores no son los clones transformados los que alteran el microambiente celular, sino que es un microambiente celular crónicamente alterado el que dispara el proceso mutagénico y tumoral. Al igual que sucede a nivel macroscópico, la destrucción de un hábitat es siempre una oportunidad para la llegada de nuevas especies [144].

A raíz de este hecho, hoy en día se consideran como agentes carcinógenos a aquellos elementos que inducen mutaciones en el ADN o bien que alteran la homeostasis del microambiente tisular. Alteraciones crónicas en el tejido como la inflamación sostenida, el desbalance hormonal o la vascularización desorganizada favorecen tanto la aparición como la selección de mutaciones. La progresión tumoral por tanto será más probable en un ambiente celular estresante que en un ambiente donde las necesidades de las células están cubiertas y por ende apenas existen fuerzas selectivas que presionen para mejorar la supervivencia celular. No debemos olvidar que los procesos de selección darwiniana actúan sobre los fenotipos y no los genotipos de los individuos. Por ello, el estudio del microambiente tumoral resulta fundamental en la comprensión del proceso de



carcinogénesis. Es central tener en cuenta que es el contexto en el que se seleccionan las poblaciones celulares.



**Figura 10:** El microambiente tumoral es un entorno altamente dinámico en el que una multitud de elementos conviven, modificándose unos a otros. Diferenciamos entre los componentes celulares y los componentes fisicoquímicos del entorno.

## Actividad de PARP en el contexto tumoral.

### La familia PARP

La familia de las poli(ADP-ribosa) polimerasas (o PARPs) es una familia de 17 miembros caracterizada por la presencia de una secuencia de 50 aminoácidos denominada “dominio PARP” [145]. Gracias a esta secuencia algunos miembros de esta familia sintetizan y transfieren poli(ADP-ribosa) (PAR) a un gran número de sustratos mediante un proceso denominado poli(ADP-ribosilación).

La presencia del dominio PARP no basta para realizar una clasificación funcional, por ello la familia PARP se divide en cinco grupos atendiendo a la actividad enzimática de sus miembros así como a su arquitectura [146][147]:



- *PARPs dependientes del ADN:* Se activan en respuesta al daño al ADN, gracias a la presencia de dedos de zinc en su estructura y a su localización nuclear. Este es el caso de las proteínas PARP-1 (ARTD1), PARP-2 (ARTD2) y PARP-3 (ARTD3).
- *Tankirasas:* Se caracterizan por presentar un repeticiones de anquirina responsable de mediar interacciones proteína-proteína. Son característicos también de este grupo los dominios SAM. Son miembros de esta categoría las Tankirasa-1 (PARP-5A, ARTD5) y Tankirasa-2 (PARP-5B, ARTD6).
- *PARPs CCCH:* Contienen motivos CCCH del tipo CX7–11CX3–9CX3H, los cuáles se relacionan con la unión al ARN. Son miembros de este grupo la PARP-7 (ARTD7), PARP-12 (ARTD12) y PARP-13 (ARTD13).
- *PARPs Macro:* Se caracterizan por presentar dominios Macro que actúan interaccionando con (y en algunos casos retirando) residuos de poli(ADP-ribosa) en proteínas modificadas. Son miembros de esta categoría las BAL1 (PARP-9, ARTD9), BAL2 (PARP-14, ARTD8) y BAL3 (PARP-15, ARTD7).
- *Otras PARP:* Son proteínas que no encajan en ninguna de las categorías anteriores, son las PARP-4 (ARTD4), PARP-6 (ARTD17), PARP-8 (ARTD16), PARP-10 (ARTD10), PARP-11 (ARTD11) and PARP-16 (ARTD15).

### Características de PARP-1

PARP-1 es el primer miembro descrito de la familia. Descubierta en 1963 por Chambon et al [148], es el miembro más activo de la familia PARP. Genera hasta un 85-90% del polímero detectado en la célula, siendo el 10-15% restante sintetizado por PARP-2.

PARP-1 es una proteína nuclear de 114 KDa. Posee tres dominios principales [149]: *Dominio de unión al ADN:* Posee 3 dedos de zinc mediante los cuales la proteína reacciona con el ADN. *Dominio de automodificación:* La proteína PARP1 se modifica

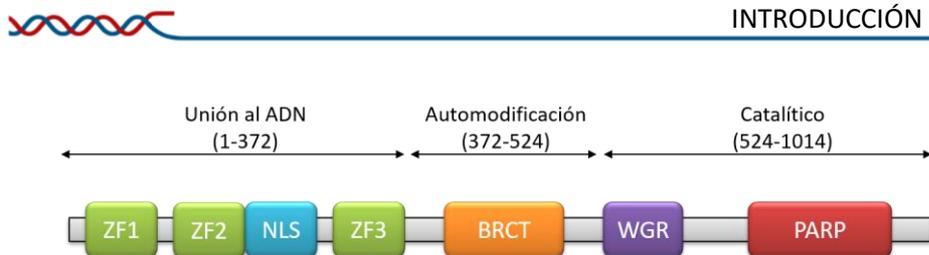


a sí misma con polímero en este dominio. *Dominio catalítico*: Realiza la actividad catalítica encargada de la generación del polímero a partir del consumo de ATP y NAD<sup>+</sup> (**Figura 11**).

PARP-1 reconoce daño al ADN de cadena simple (SSB, por sus siglas en inglés) [150] y cadena doble (DSB, por sus siglas en inglés) [151], se une a este daño y se automodifica por polímero. La síntesis de este polímero genera la formación temporal de un compartimento celular carente de membrana, el cuál promoverá el reclutamiento de un gran número de factores en lo que se ha venido a denominar “condensaciones biomoleculares” [152]. Entre los principales factores reclutados podemos destacar a miembros de distintas rutas de reparación como BRCA1, XRCC1, ALC1 o MRE11 entre otros [153].

Además de la activación canónica inducida por el daño al ADN, PARP-1 se puede activar de forma independiente a través de modificaciones postraduccionales, un ejemplo son las fosforilaciones mediadas por diversas quinasas. PARP-1 es fosforilada por las proteínas ERK1/2 en sus serinas 372 y treonina 373 [154]. Del mismo modo, c-Met fosforila a PARP-1 en su tirosina 907 [155]. Por otro lado existen fosforilaciones que pueden conducir a la inhibición de PARP-1, este es el caso de la quinasa AMPK al fosforilar a PARP-1 en la serina 177 [156] y el de la protein quinasa C [157].

PARP-1 puede sufrir otros tipos de modificaciones, como las acetilaciones mediadas por la P300/CBP en las lisinas 498, 505, 508, 521, 524 [158]. PARP-1 también presenta ubiquitinaciones en las lisinas 486 y 203 realizadas por la E3 ligasa [159]. PARP-1 se modifica también por PARilación en las serina 499 [160].



**Figura 11:** Estructura de PARP-1. PARP-1 Presenta un dominio de unión al ADN con 3 dedos de zinc y una secuencia de localización nuclear. Presenta un dominio de automodificación donde PARP-1 se modifica por polímero. Presenta también un dominio catalítico caracterizado por la presencia de la “marca PARP”, que sintetiza la poli(ADP-ribosa). Adaptado de *“Regulation of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 functions by post-translational modifications”* [161].

## El ciclo de vida de PAR

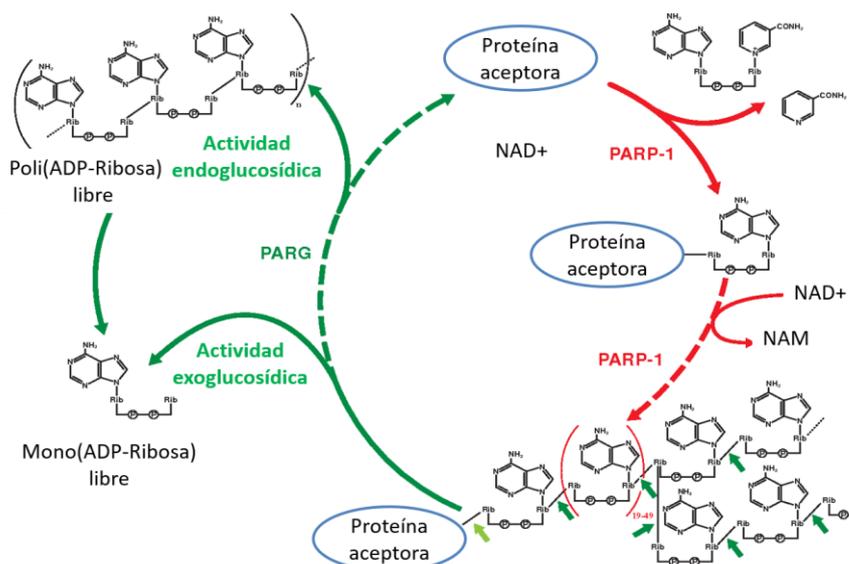
La generación de polímero de poli(ADP-ribosa) sigue las siguientes fases (**Figura 12**) [162][163]:

- **Iniciación:** En primer lugar, la actividad poli(ADP-ribosa) sintetasa rompe el enlace glicosídico que une a la nicotinamida y ribosa en el NAD<sup>+</sup>. A continuación, el monómero de ADP-ribosa se une covalentemente a ciertos aminoácidos (glutamato, aspartato o lisina) de una proteína aceptora.
- **Elongación y ramificación:** La reacción de obtención y transferencia de ADP-ribosa se repite de forma secuencial, generando un polímero lineal que puede presentar ramificaciones cada 20-25 unidades de ADP-ribosa.
- **Degradación:** Las proteínas poli(ADP-ribosa) glicohidrolasas (PARGs) median la separación del polímero de las proteínas modificadas y lo degradan de nuevo hacia ADP-ribosa.
- **Reciclaje:** El consumo de ATP y NAD<sup>+</sup> durante la síntesis de polímero es alto, por ello los monómeros de ADP-ribosa son degradados a AMP y ribosa 5-fosfato por



acción de la ADP-ribosa pirofosfatasa. A continuación, serán reciclados como ATP y NAD<sup>+</sup>.

El polímero puede realizar sus funciones biológicas de tres maneras: 1. Puede modificar a proteínas de manera covalente (tal y como hemos descrito anteriormente); 2. Puede reclutar a proteínas por afinidad electrostática. Éste es el caso del reclutamiento de factores de respuesta al daño al ADN. Las proteínas de unión a ácidos nucleicos presentan una alta afinidad hacia la poli(ADP-ribosa) debido a dos factores principales: por un lado, su elevada carga negativa [164] y por otro, debido a las similitudes que PAR presenta con la estructura de ácidos nucleicos. Al polímero se le ha venido incluso a denominar como un tercer ácido nucleico celular (junto con el ADN y ARN) pero carente de información genética [165]. 3. Por otro lado, el polímero también puede funcionar de forma libre como molécula señalizadora en procesos celulares [166]. Por último, el polímero puede mediar procesos de muerte celular vía reducción de NAD<sup>+</sup> y ATP, siendo este proceso de muerte celular denominado "parthanatos" [167][168].





**Figura 12:** Ciclo de síntesis y degradación del polímero de poli(ADP-ribosa). Mediante el consumo de NAD<sup>+</sup> y ATP, PARP-1 modifica covalentemente a sus proteínas aceptoras. Posteriormente, este polímero es degradado por proteínas PARG, que presentan actividad exo y endoglucosídica. Adaptado de “*Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted*” [169].

## La actividad de PARP-1 durante la tumorigénesis

PARP-1 es una proteína que tiene una gran relevancia en el desarrollo tumoral. Está asociada con la supervivencia de las células tumorales y con la progresión de la enfermedad. PARP-1 colabora en numerosos procesos relacionados con una mala prognosis de la enfermedad.

- *PARP-1 y la reparación del daño al ADN:* En presencia de roturas de cadena simple o cadena doble se ha descrito como PARP-1 aumenta su actividad basal hasta 500 veces, siendo las lesiones al ADN señalizadas en menos de 30 segundos [170]. Por ello la presencia de agentes alquilantes y estrés oxidativo (en forma de ROS o RNS) pueden disparar la acumulación de PAR en la célula casi al instante [171]. Del mismo modo, la presencia de configuraciones anómalas en el ADN (como el ADN cruciforme, torsionado o establemente desapareado) se ha descrito pueden disparar la actividad de PARP-1 [172]. En este contexto, las células tumorales sobreexpresan PARP-1, lo cual es un marcador de mala prognosis debido a la elevada capacidad de estas células para señalar y reparar el daño al ADN inducido por las distintas terapias [173][174].
- *PARP-1 y la respuesta a la hipoxia:* Profundizar en el estudio de la relación entre PARP-1 y la respuesta a hipoxia tumoral es el objetivo de esta Tesis Doctoral. PARP-1 se ha descrito como agente necesario en la regulación de la estabilidad y actividad de los factores de transcripción mediadores de esta respuesta (HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ )



[175][176]. Las bases moleculares de esta interacción no se conocen y hasta ahora no se había descrito si HIF-1 $\alpha$  sufre modificación por polímero o si interacciona físicamente con PARP-1 en el contexto de la hipoxia fisiológica. Semejante interacción sería plausible dado que se ha descrito en otros contextos no relacionados con la limitación de oxígeno como la infección por virus de Epstein Barr [177]. La respuesta a la hipoxia tumoral será abordada en profundidad posteriormente en la introducción de esta Tesis Doctoral, brevemente mencionar en este apartado que al colaborar PARP-1 con la correcta adaptación a la hipoxia empeora la prognosis de la enfermedad, pues la respuesta a hipoxia se relaciona con la supervivencia celular, la metástasis y resistencia a los tratamientos [178].

- *PARP-1, angiogénesis y el mimetismo vasculogénico:* La capacidad de irrigar el tumor es imprescindible durante la malignización tumoral, siendo un porcentaje muy reducido el de tumores capaces de progresar sin inducir la formación de vasos sanguíneos que aporten oxígeno y nutrientes a las células tumorales [179]. En este aspecto se ha visto cómo el uso de inhibidores de PARP reducen in vivo e in vitro la angiogénesis [180][181]. Un mecanismo alternativo para el aporte de gases y nutrientes es el desarrollo de mimetismo vasculogénico. Este proceso consiste en la formación de pseudovasos, generados a partir de células tumorales sin la participación de células endoteliales. Este proceso se relaciona con una mala prognosis de la enfermedad [182]. Al igual que con la angiogénesis, la inhibición de PARP disminuye la capacidad de formación de mimetismo vasculogénico [183].
- *PARP-1 y la respuesta inmunitaria:* Como hemos descrito previamente, la respuesta inmunitaria acaba conduciendo al aumento de la tolerancia y crecimiento tumoral. PARP-1 y PARP-2 intervienen en estos procesos, por lo que se está explorando el uso de sus inhibidores en combinación con inmunomoduladores. PARP-1 interacciona y regula la actividad de factores de transcripción y adhesión



relacionados con la liberación de citoquinas mediadoras de la inflamación como es el caso del factor de transcripción NFκB y las citoquinas inflamatorias TNFα, IL-1b, IL-12, CCL2. Por ello se ha descrito que PARP-1 participa en la activación de células relacionadas con la actividad inmunitaria como los linfocitos T, macrófagos, microglía, células dendríticas y fibroblastos [184][185].

- *PARP-1 y la autofagia:* La autofagia es un mecanismo que permite la supervivencia celular en situaciones de estrés entre las que destacan la escasez de nutrientes. Esta situación es muy habitual en el entorno tumoral, metabólicamente hiperactivo y con una vascularización ineficiente [186]. En este contexto la célula puede activar mecanismos que promuevan la degradación de componentes del citoplasma vía lisosomal, generando aminoácidos y ácidos grasos con los que contrarrestar la ausencia de nutrientes del exterior. Al promover la supervivencia celular, los tumores que sobreexpresan esas rutas presentan mayor supervivencia [187], un incremento en la resistencia a terapias [188] y mayor formación de metástasis [189], estando todo ello relacionado con un peor pronóstico de la enfermedad. PARP-1 se ha descrito interacciona y modifica por PARilación a elementos clave de esta ruta como AMPK. En presencia de inhibidores de PARP, el inicio de la autofagia se retrasa y aumenta el número de células apoptóticas que no sobreviven a la deficiencia de nutrientes [190][191].
- *PARP-1 y las células iniciadoras del tumor:* Las células iniciadoras del tumor (CSCs, por sus siglas en inglés) son una subpoblación celular dentro del tumor caracterizadas por tener capacidad de auto renovación, iniciación del tumor, diferenciación a distintos linajes tumorales y resistencia a la quimio y radioterapias [192]. Dadas estas características su presencia se considera de una mala prognosis y tiene profundas implicaciones a la hora de tratar el tumor [193]. Actualmente este tipo de células se han descrito en diversos tipos de cáncer como el de mama [194],



gliomas [195], próstata [196], melanoma [197], pulmón [198], colon [199], páncreas [200], hígado [201] y carcinoma renal entre otros [202]. La activación del programa pluripotencial implica la activación de los denominados “factores Yamanaka”, entre los que se incluye Oct4, Sox2, c-Myc y KLF4. PARP-1 se ha descrito juega un rol importante en esta transdiferenciación [203][204]. PARP-1 promueve la aparición de este tipo de células regulando la actividad de Sox2 y su diana KLF4 y ayudando en la expresión de la telomerasa [205][206]. Del mismo modo, PARP-1 altera el patrón de histonas hacia un fenotipo pluripotencial, facilitando la unión de Oct4 al ADN [207][208]. Las CSCs presentan una mayor actividad de PARP-1 y elevados niveles de polímero [209]. Por ello no es de extrañar que la inhibición de PARP se haya descrito reduce el fenotipo y supervivencia de las CSCs [210].

### Los inhibidores de la familia PARP en clínica

Desde que en 2005 aparecieran las primeras publicaciones señalando como los tumores BRCA mutados son sensibles a los inhibidores de PARP [211], un gran número de trabajos han venido a corroborar este hecho (denominado “letalidad sintética”) que se genera durante la inhibición de rutas alternativas de reparación al ADN (como la reparación por escisión de bases) en células que carecen de las rutas de recombinación homóloga. Esto es muy relevante, pues un 50% de los tumores carcinoma seroso de alto grado (HGSOC) presentan alteraciones en genes de recombinación homóloga y un 30% de ellos mutaciones para BRCA1/2 [212], causando una disminución en la capacidad celular para reparar ADN vía recombinación homóloga. Este suceso se relaciona con la inestabilidad genómica, favoreciendo la progresión tumoral.

Por ello, el cáncer de ovario y mama fueron los primeros en ser evaluados en ensayos clínicos frente a distintos inhibidores de PARP. A raíz de estos estudios se



han aprobado 4 inhibidores de PARP para el tratamiento de este tipo de tumores y se prevé que se amplíe su uso a otros tumores en el futuro. Estos inhibidores son el olaparib, rucaparib, niraparib y más recientemente el talazoparib. Todos ellos se han demostrado efectivos y bien tolerados, presentando efectos secundarios reducidos como náusea, fatiga o dolor abdominal [213]. Otro inhibidor de PARP que se espera sea aprobado es el veliparib, que ha demostrado su eficacia en ensayos clínicos de fase III [214].

El olaparib ha demostrado ser beneficioso en ensayos clínicos en los que se ha utilizado como segundo o posterior tratamiento [215][216][217]. En torno a un 30-50% de los tumores BRCA mutados respondieron de forma positiva, siendo aún mayor el efecto en pacientes sensibles a cisplatino. En otros ensayos clínicos en pacientes con cáncer de ovario en remisión tras terapia basada en el cisplatino, el tratamiento con olaparib mejoró la supervivencia libre de enfermedad y en aquellos pacientes BRCA mutantes se triplicó el tiempo hasta la progresión [217].

El rucaparib ha sido aprobado por la FDA como tratamiento en el cáncer de ovario BRCA deficiente para aquellos pacientes que ya han sido expuestos al menos a dos tratamientos quimioterapéuticos. Se ha observado una tasa de respuesta objetiva de un 80% en pacientes que presentaban una alta heterocigosidad intratumoral [218].

El niraparib es un inhibidor de la familia PARP recomendado tras el tratamiento quimioterapéutico. En mujeres con BRCA mutado el tratamiento con niraparib aumenta la progresión libre de la enfermedad casi cuatro veces más que en los pacientes tratados con placebo. Este efecto se reduce al triple si los pacientes son BRCA competentes pero deficientes para alguno de los otros componentes de la recombinación homóloga [219].



El talazoparib se aprobó a finales de 2018 para tratar a los pacientes con cáncer de ovario y mama BRCA mutado. En estudios clínicos se ha demostrado que reduce el riesgo de progresión tumoral en un 46% y aumenta la supervivencia libre de progresión en 3 meses [220][221].

Actualmente existen ensayos clínicos avanzados en otros tipos de tumores BRCA mutantes como próstata y páncreas [215]. Del mismo modo no sólo la pérdida de BRCA, sino también la de otras muchas proteínas, puede llevar a la pérdida de recombinación homóloga (como ATM, FANCA o FANCC). Por ello es de esperar que el uso de inhibidores de PARP se expanda a otros tipos de tumores que presenten no un tipo de mutaciones específico, sino una deficiencia en su capacidad de realizar recombinación homóloga [222][223].

Actualmente, gran cantidad de ensayos clínicos están buscando utilizar los inhibidores de PARP en combinación con otros tratamientos. La principal causa detrás de esto está en que el uso de inhibidores de PARP en monoterapia se ha descrito causa una regresión parcial del tumor, generándose resistencias aproximadamente al cabo del año. Estas resistencias se relacionan con la restauración de la recombinación homóloga mediante la aparición de mutaciones secundarias, activación de checkpoints del ciclo celular, protección de las hebras de ADN dañado, expresión de ciertos microRNAs o acumulación de bombas de expulsión activa de fármacos. Son varios de los mecanismos más habituales de resistencia [211].

### La respuesta a la hipoxia celular.

La concentración celular de oxígeno es uno de los principales factores a la hora de regular el metabolismo celular. El oxígeno es el aceptor final en la cadena



transportadora de electrones (CTE) y por tanto, imprescindible durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria [224].

Los tejidos presentan una concentración de oxígeno que oscila entre el 3-7% dependiendo del tejido en cuestión (situación conocida como fisoxia celular). La situación de hipoxia se produce cuando los niveles de oxígeno descienden por debajo del 2% [225]. Dado que el oxígeno es imprescindible para el metabolismo energético, cuando la concentración de oxígeno desciende por debajo de los rangos normales (situación de hipoxia), las células necesitan llevar a cabo numerosas adaptaciones para garantizar su adaptación y supervivencia.

De manera fisiológica, la capacidad para responder a las situaciones de hipoxia es imprescindible en la supervivencia del ser humano. El desarrollo embrionario sucede en hipoxia [226], la adaptación a la hipoxia también es necesaria en patologías como el EPOC [227] o relacionadas con el sistema cardiovascular [228], como el ictus [229], infarto de miocardio [230] y ciertas anemias [231]. La respuesta a hipoxia ha sido incluso fundamental para la colonización del planeta, permitiendo que hoy en día 140 millones de personas vivan a más de 2500 metros de altura, en atmósferas con oxígeno reducido [232].

### La familia de los Elementos Inducidos en Hipoxia (HIFs)

La respuesta a la limitación de oxígeno (o hipoxia) es un proceso fundamental para garantizar la supervivencia del individuo. Siendo premiado su descubrimiento con el premio Nobel de Medicina en 2019 [233]. La respuesta a la hipoxia ha de ser una respuesta rápida, para garantizar esto los factores de transcripción que la median se sintetizan y degradan de manera continua durante la situación de oxigenación

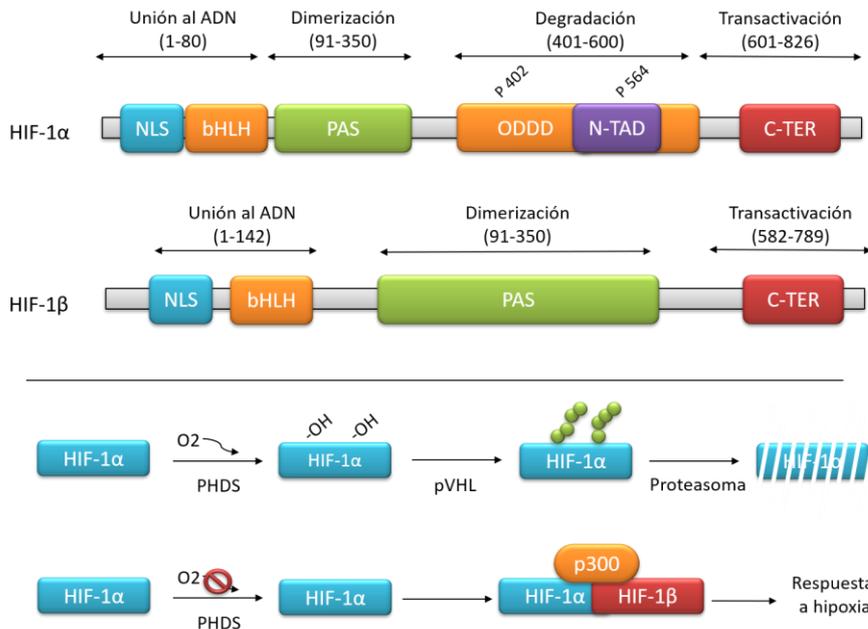


normal (normoxia). El que la evolución haya permitido el mantenimiento de este aparente derroche de energía, indica lo importante que es poder activar la adaptación a la hipoxia tan pronto como ésta se produce.

Descubierta por Semenza en 1992 [234], la familia de los factores inducidos en hipoxia (o HIFs, por sus siglas en inglés) está constituida por proteínas hélice-bucle-hélice de la familia de las Per-ARNT-Sim (PAS). En la familia se distinguen 3 cadenas alfa (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ ) y una cadena  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ) (**Figura 13**). Esta familia de factores de transcripción se activa mediante la formación de un complejo  $\alpha/\beta$ . Es decir, cuando HIF-1 $\beta$  se une a alguna de las tres subunidades  $\alpha$ . La regulación de la actividad de estos factores de transcripción está mediada por la regulación de la estabilidad de las cadenas  $\alpha$  durante normoxia. En presencia de oxígeno las cadenas  $\alpha$  son hidroxiladas en ciertos residuos de prolina por las proteínas prolin-hidroxilasas (PHDs) [235][236]. Estas prolinas son entonces reconocidas por las proteínas Von Hippel-Lindau (p-VHL), que las marcan con ubiquitina para su degradación vía proteasoma [237]. Por ello, aunque las cadenas  $\alpha$  y las  $\beta$  se expresan de forma constitutiva, sólo las  $\beta$  permanecen estables en normoxia. Durante hipoxia, se produce la acumulación y translocación al núcleo de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  [238], allí se generarán los heterodímeros  $\alpha/\beta$ . Éstos tendrán afinidad en el ADN sobre ciertas secuencias de nucleótidos (5'-RCGTG-3') denominadas HRE (Elementos de respuesta a hipoxia, por sus siglas en inglés) localizadas en los promotores de los genes a inducir en el contexto hipóxico [239] (**Figura 13**). HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  presentan un 60% de homología en sus secuencias, siendo por ello algunos de sus genes dianas comunes. Pero también presentan diferencias; por ejemplo, mientras que la expresión de HIF-1 $\alpha$  es ubicua, HIF-2 $\alpha$  se expresa principalmente en hepatocitos y células endoteliales; mientras ambos tipos son capaces de inducir angiogénesis, sólo HIF-2 $\alpha$  promueve la eritropoiesis [240].



## INTRODUCCIÓN



**Figura 13:** HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  presentan dominios de unión al ADN, dominios para la dimerización y dominios de transactivación. HIF-1 $\alpha$  presenta un dominio de degradación con prolinas que mediarán su degradación durante normoxia. Adaptado de *“Targeting tumour angiogenesis with small molecule inhibitors of hypoxia inducible factor”* [241].

La estrecha regulación de la respuesta a hipoxia hace que HIF-1 $\alpha$  requiera de la presencia de una cromatina relajada, con marcas H3K4me3 y RNA polimerasa unida al ADN [242]. Es por ello por lo que HIF-1 $\alpha$  precisa de la colaboración de complejos multi proteicos para realizar su actividad transcripcional. En este contexto, remodeladores de la cromatina se implican en el proceso. RUVBL1 [243], [244], SWI/SNF [245] o BRG1 [246] modifican la configuración de la cromatina en respuesta a hipoxia, facilitando el acceso de HIF y la maquinaria de transcripción a los promotores a inducir. En la misma dirección, el dímero HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  ha de unirse a histonas acetil transferasas como p300, CBP y TIP60 y coactivadores como



CREB-1, ATF-1 o ZMYND8 [247][248][249][250][251]. Estas proteínas modifican a HIF y a las histonas, facilitando el proceso de transcripción.

HIF-1 $\alpha$  se ha descrito que sufre numerosas modificaciones postranscripcionales, entre ellas destacamos fosforilaciones, acetilaciones, SUMOilaciones, metilaciones, ubiquitinaciones o s-nitrosilaciones. Ellas afectan a HIF-1 $\alpha$  afectando a su degradación, estabilización, inhibiéndola, transactivándola o afectando a su localización nuclear.

Sitios	Modificación	Proteína	Efecto
K10/11/12/19/21	Acetilación	-	Degradación
S31	Fosforilación	PKA	-
K32	Metilación	SET7/9	Inactivación
K32	Metilación	SET7/9	Degradación
T63	Fosforilación	PKA	Estabilización
S247	Fosforilación	CK16	Inhibición
K389	Acetilación	PCAF	Transactivación
K391	Metilación	Set9	Degradación
K391	SUMOilación	Ubc9/RanBP2	Estabilización
IC391	SUMOilación	Ubc9/RanBP2	Inhibición
K391	SUMOilación	Ubc9/RanBP2	Degradación
S419 ( <i>C. elegans</i> )	Fosforilación	AMPK	Degradación
T455	Fosforilación	PKA	
S465	Fosforilación	PKA	
K477	SUMOilación-1/2	Ubc9/RanBP2	Estabilización
K477	SUMOilación-1/2	Ubc9/RanBP2	Inhibición
K477	SUMOilación-1/2	Ulx9/RanBP2	Degradación
T498/S502/S505/T506/S510	Fosforilación	GSK3B	Degradación
K532	Acetilación	ARD1	Degradación
K532/S38/S47	Ubiquitinación	VHL	Degradación
K532/S35/S47	Ubiquitinación	VHL	Degradación
551/T555/S589	Fosforilación	GSK3B	Degradación
S576	Fosforilación	PLK3	Degradación
S641	Fosforilación	ERK1/2	Localiz. nuclear
S643	Fosforilación	ERK1/2	Localiz. nuclear
S657	Fosforilación	PLK3	Degradación
S668	Fosforilación	CDK I	Estabilización
K674	Acetilación	PCAF	Transactivación
K674	Metilación	G9a/GLP	Inhibición
S687	Fosforilación	CDKS	Estabilización
S692	Fosforilación	PKA	Estabilización
S696	Fosforilación	ATM	Estabilización
S700	Fosforilación	PKA	-



	K709	Acetilación	p300	Estabilización
	S727	Fosforilación	PKA	-
	S760	Fosforilación	PKA	-
	S761	Fosforilación	PKA	-
	C800	S-Nitrosilación	-	Transactivación
	C800	S-Nitrosilación	-	Inhibición
	S809	Fosforilación	PKA	-

Tabla mostrando las modificaciones postraduccionales conocidas para HIF-1 $\alpha$ .  
*Modificado de Davis. L et al [252].*

### La actividad de HIF-1 $\alpha$ durante la tumorigénesis.

En el contexto fisiológico, la respuesta a hipoxia induce la expresión de genes relacionados con la glucólisis, la inhibición de la actividad mitocondrial, la angiogénesis y la eritropoiesis entre otras. Una respuesta a hipoxia regulada y ordenada favorece la supervivencia del individuo. Lo contrario sucede durante el desarrollo tumoral, debido a la alta tasa de reproducción celular, elevado metabolismo y vascularización desorganizada, se generan amplias zonas hipóxicas en las que la activación de HIF induce cambios metabólicos, transición epitelio mesénquima (EMT), aumento de la vascularización inmadura (permeable a células tumorales) e inmunosupresión entre otros eventos. Todo esto conduce a la supervivencia, crecimiento y malignización del cáncer. En el contexto tumoral la respuesta a hipoxia está ligada a una peor prognosis de la enfermedad, reduciendo el tiempo de supervivencia e induciendo el desarrollo de metástasis [253][254][255][256]. Los principales efectos de HIF-1 $\alpha$  durante la malignización son los siguientes:

- *HIF-1 $\alpha$  y las rutas metabólicas:* En condiciones de normoxia las células convierten glucosa en piruvato, el cuál entra en el ciclo de Krebs donde mediante la



fosforilación oxidativa mitocondrial se genera ATP. En el contexto tumoral se observa un cambio hacia el metabolismo glucolítico conocido como efecto Warburg [257]. Este fenómeno se observa especialmente durante la hipoxia, durante la cual la mitocondria es inhibida para evitar la producción de ROS [258][259]. En este contexto HIF potencia la glucólisis modulando la expresión de GLUT1, GLUT3, PFK, GAPDH y LDHA entre otros [260]. Durante hipoxia este cambio metabólico inducido por HIF genera una acumulación de CO<sub>2</sub> y lactato, que pueden alterar el pH intracelular de forma peligrosa [261][262]. Para reducir su toxicidad HIF-1 $\alpha$  induce a CAIX y a CAXII, las cuales transforman el CO<sub>2</sub> en bicarbonato y protones [263]. También se acumula NHE1, un excretor de protones al medio extracelular [264]. Por último, HIF-1 $\alpha$  induce también la síntesis de MCT4, el cuál libera al exterior el exceso de lactato [265]. Por todo ello el pH citoplasmático se mantiene en valores tolerables a costa de una acidificación del entorno intercelular. Esto sucede especialmente en zonas hipóxicas [266], en las que la ausencia de riego impide la retirada de estas moléculas de deshecho. Esta acidificación se relaciona con la progresión tumoral [267], peor prognosis, mayor movilidad celular, metástasis [268][269] y menor eficacia del sistema inmunitario [270][271].

- *HIF-1 $\alpha$  y la transición epitelio mesénquima:* El proceso de transición epitelio mesénquima es muy importante a la hora de potenciar la malignización tumoral. Durante este proceso las células pierden marcadores epiteliales de superficie como la E-Cadherina (bloqueada por factores como SNAIL, SLUG, TWIST o ZEB) [272] a la vez que aumentan la expresión de marcadores mesenquimales como N-Cadherina, fibronectina o vimentina. HIF-1 $\alpha$  modula ciertas rutas relacionadas con la inducción de ésta .



HIF-1 $\alpha$  activa a TGF- $\beta$ , implicado en la EMT al unirse a sus receptores TGFR1 y TGFR2. Lo cual activa y genera trímeros de Smad2, Smad3 y Smad4. Este complejo se transporta al núcleo donde actúa sinérgicamente con SNAIL, ZEB y TWIST, causando la expresión de los genes inducibles por TGF- $\beta$  [273]. Del mismo modo, HIF-1 $\alpha$  induce la EMT a través de la expresión de Notch, la mayor expresión de Notch se ha relacionado con la aparición de características CSC y contribuye a la EMT al regular a SNAIL. A través de HIF-2 $\alpha$  se ha descrito que la hipoxia puede inducir EMT activando el eje PI3k/Akt y con ello la expresión de  $\beta$ -catenina. Esto activa la cascada de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, relacionada con la expresión de genes relacionados con la malignización celular. Por último, NF- $\kappa$ B es activado del mismo modo durante hipoxia de una manera tanto dependiente como independiente de HIF.

- *HIF-1 $\alpha$  y la inducción de angiogénesis:* La angiogénesis es indispensable para el crecimiento y desarrollo tumoral. Al crecer más allá de los 2-3 mm<sup>3</sup> un tumor requerirá de la formación de nuevos vasos para progresar [274]. La respuesta a hipoxia es un elemento imprescindible en la inducción de esta angiogénesis. HIF-1 $\alpha$  tiene como dianas a los genes de VEGF [275], ANGPT2 [276], SDF1 [277] y SCF [278] entre otros. Con ello, HIF-1 $\alpha$  induce la formación vascular, mientras que HIF-2 $\alpha$  está más involucrada con los procesos madurativos de esos vasos [279]. Del mismo modo la hipoxia induce linfoangiogénesis, proceso también relacionado con la metástasis. La respuesta mediada a través de los factores HIFs induce la formación de nuevos vasos linfáticos bien de forma directa vía c-Met, o de manera indirecta a través de la familia de los VEGF [280].
- *HIF-1 $\alpha$  y el sistema inmunitario:* La adaptación a la hipoxia presenta un desafío para la respuesta inmune, jugando HIF un papel importante en la regulación de distintos subtipos celulares. Si bien en algunas situaciones HIF-1 $\alpha$  puede colaborar con el



sistema inmunitario, de forma global se puede afirmar que la hipoxia dificulta y empeora la efectividad de este sistema para luchar contra la enfermedad.

HIF-1 $\alpha$  se ha descrito que reduce la capacidad de las células dendríticas (CD) para capturar antígenos, alterando su producción de quimioquinas y su diferenciación [281].

Los macrófagos asociados a tumor (TAM) están relacionados con la inmunosupresión, neovascularización, incremento de la metástasis, resistencia a terapias y por todo ello con una menor supervivencia [131][282]. Dentro de los nichos hipóxicos se han detectado un subtipos de TAMs tipo M2, relacionados con la resistencia a tratamientos, recaídas de la enfermedad y peor pronosis [283][284].

Los linfocitos B asociados al tumor se ha comprobado que son necesarios para mejorar la respuesta a los tratamientos [285]. Sin embargo, el rol que HIF-1 $\alpha$  puede jugar en ellos está aún poco claro. En algunos casos en los que los linfocitos B se han relacionado con un empeoramiento de la enfermedad, la eliminación de HIF-1 $\alpha$  ha revertido este efecto [286]. Se sabe que HIF-1 $\alpha$  participa en la reprogramación de los linfocitos B durante la progresión en los linfomas de células B [287]. Del mismo modo se ha demostrado que HIF-1 $\alpha$  es imprescindible para la correcta maduración de los linfocitos B y T en la médula ósea [288].

Los linfocitos T son importantes a la hora de eliminar células tumorales, la reducción de oxígeno se ha asociado a una menor efectividad de los linfocitos T CD8+ [289]. De manera similar, la hipoxia afecta a los linfocitos T CD4+ inhibiendo su actividad y promoviendo la actividad T reguladora inmunosupresora asociada a un empeoramiento de la enfermedad [290].



Las células citotóxicas natural killers (NK) son también relevantes en el contexto tumoral, eliminan células transformadas y liberan citoquinas para amplificar la respuesta inmunitaria. Se ha descrito que la hipoxia altera en gran medida la expresión génica de estas células [291], estos cambios se ha descrito reducirían la presencia de receptores activadores limitando la capacidad de la célula para eliminar células transformadas [292].

Por último, HIF se relaciona con la migración y activación de células supresoras derivadas de mieloides en el microambiente tumoral [293]. La presencia de estas células implica un mayor escape de las células tumorales de la respuesta inmune, mayor invasión y metástasis [294].

### Resistencia a las terapias en el contexto de la hipoxia tumoral.

Se ha descrito que la hipoxia genera resistencia a los tratamientos con cisplatino, doxorubicina, etopósido, melfalan, 5-fluorouracilo, gemcitabina, fenretinida y docetaxel entre otros [295].

Una de las principales causas de escape a los tratamientos en cáncer es la aparición de las denominadas bombas para la salida de fármacos. Estas proteínas disminuyen la concentración de fármacos en el interior celular y con ello se reduce la eficacia de los tratamientos, obligando al aumento de la dosis. Una de estas bombas de eflujo están codificadas por el gen MDR1 que codifica para la denominada p-glicoproteína [296]. HIF-1 $\alpha$  se ha descrito que se asocia a la resistencia a la quimioterapia mediante la inducción de esta p-glicoproteína durante hipoxia [297].



Del mismo modo, la inhibición de HIF-1 $\alpha$  se ha comprobado que restaura la efectividad de los quimioterapéuticos al reducir la expresión de MDR1 en cáncer de colon [298].

HIF-1 $\alpha$  genera resistencia a la quimioterapia al afectar a las dianas del tratamiento. Por ejemplo, HIF-1 $\alpha$  media la reducción de la proteína topoisomerasa II, necesaria para la inducción de daño al ADN durante los tratamientos con etopósido [299].

Otro mecanismo por el que HIF-1 $\alpha$  puede mediar la resistencia a quimioterapia es mediante la inducción de resistencia a la apoptosis tras los tratamientos [300]. Por ello es necesario el uso de fármacos secundarios que cancelen esta resistencia [301].

Por último, HIF-1 $\alpha$  puede inducir una autofagia protectora en respuesta a ciertos quimioterapéuticos. De este modo, la fenretinida induce apoptosis durante normoxia en células tumorales, mientras que durante la hipoxia se evita la muerte celular al inducirse una autofagia dependiente de HIF-1 $\alpha$  [302].

Por otro lado, la radioterapia induce una acumulación masiva de ROS y a diferencia de la producción fisiológica de ROS, supera cualquier capacidad de adaptación celular. En hipoxia la limitación de oxígeno característica del microambiente limita la efectividad de este tipo de tratamientos, triplicando la resistencia a la radioterapia [303]. Parece ser importante también la inducción de la glucólisis y moléculas antioxidantes durante hipoxia, ello limita la acumulación de ROS [304][305]. También durante hipoxia, HIF-1 $\alpha$  se ha visto imprescindible para mantener nichos de células madre tumorales quiescentes, altamente resistentes a ROS, y que repoblarán el tumor tras los tratamientos [306][307].

La condensación de la cromatina durante la hipoxia puede proteger al núcleo del daño oxidativo. No hay que olvidar que, durante la hipoxia temprana, el desacoplamiento de la ETC en la mitocondria genera un pico fisiológico de ROS al



que la célula responde y se adapta. Se ha descrito que HIF-1 $\alpha$  colabora en la reparación del daño al ADN sobre expresando componentes de rutas de reparación [308][309].

### Inhibidores y activadores de la respuesta a hipoxia.

Existen situaciones en las que aumentar la estabilidad/actividad de HIF puede ser muy beneficioso. Se están probando actualmente activadores que podrían ser útiles a la hora de tratar la anemia asociada a la enfermedad renal crónica [310][311], enfermedad inflamatoria intestinal [312][313], infarto de miocardio [314][315] y accidentes cerebrovasculares [316][317].

Por otro lado, como hemos descrito para el caso del cáncer, la activación de HIF es caótica y está puesta al servicio de la supervivencia del tumor. Por ello, en esta situación la inhibición de la respuesta a hipoxia es más que deseada. Actualmente existen distintos inhibidores en estudios clínicos. Estos inhibidores afectan a la expresión del ARNm de HIF-1 $\alpha$  (EZN-228), la síntesis de la proteína (2ME2-NCD y CRLX101), incrementan su degradación (*tanespimycin* y vorinostat) o limitan la dimerización con las cadenas HIF-1 $\beta$  y la unión al ADN (PT 2385). Todos estos inhibidores han mostrado resultados desiguales en ensayos clínicos de Fase II finalizados. Actualmente existen nuevos ensayos de Fase II que siguen evaluando la eficacia de estos fármacos en monoterapia o combinación [318]. Tan sólo un inhibidor, y para HIF-2 $\alpha$ , se encuentra en ensayos clínicos de fase III en pacientes con cáncer renal [319].

No hay ensayos clínicos en fase III para inhibidores directos de HIF-1 $\alpha$ . Es por ello por lo que el uso de inhibidores indirectos (que afecten a HIF-1 $\alpha$  a través de la acción de otra proteína) es un abordaje que consideramos interesante. Sobre todo



si ese fármaco ya ha demostrado su eficacia, bioseguridad y es de uso común en el campo de la oncología. Este es el caso de los inhibidores de PARP. Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es explorar el efecto, y posible beneficio, que la inhibición de la familia PARP puede tener sobre la respuesta mediada por HIF-1 $\alpha$ .





## Objetivos

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Analizar el efecto de la hipoxia sobre la producción de ROS y la activación de PARP.
2. Estudiar la asociación en la expresión de PARP-1 y HIF-1 $\alpha$  en pacientes con melanoma.
3. Analizar el efecto de la actividad de PARP-1 sobre la estabilidad y actividad de HIF-1 $\alpha$ .
4. Estudiar si existe una interacción física entre PARP-1 y HIF-1 $\alpha$  y si la misma conduce a la modificación de HIF-1 $\alpha$  por polímero.
5. En caso de existir modificación postraducciona, identificar que dominios o secuencias de HIF-1 $\alpha$  son modificados.
6. Estudiar las características del reclutamiento de HIF-1 $\alpha$  al ADN durante la ausencia de PARP-1.
7. Observar el impacto que la hipoxia tiene sobre la respuesta de daño al ADN durante la inhibición/ausencia de PARP-1.
8. Evaluar el impacto que la inhibición/ausencia de PARP-1 tiene sobre la viabilidad celular en hipoxia.
9. Analizar los ensayos clínicos que utilizan a inhibidores de PARP en combinación con otros inhibidores que pueden impactar la respuesta a hipoxia.





## Materiales y métodos

### Células y medios de cultivo.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en un incubador celular (Thermo HEPA filter) a 37°C, 21% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>.

Las células HEK293T WT y PARP-1 knockout se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) bajo en glucosa (1 g/L) al que se añadió suero fetal bovino inactivo 10% (Life Technologies. Carlsbad, CA), L-glutamina 2mM (Life Technologies. Carlsbad, CA), junto con aminoácidos no esenciales 0,1mM (Life Technologies. Carlsbad, CA).

Las células HepG2 se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) alto en glucosa (4.5 g/L) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivo (Life Technologies. Carlsbad, CA).

Las células Hela se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) bajo en glucosa (1 g/L) que fue suplementado con suero fetal bovino inactivo 10% (Life Technologies. Carlsbad, CA), L-glutamina 2mM (Life Technologies. Carlsbad, CA), y aminoácidos no esenciales 0,1mM (Life Technologies. Carlsbad, CA). Las células Hela shPARG y shVector fueron suplementadas con el antibiótico de selección higromicina B (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO) a 150µg/ml.

La línea celular COS se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) bajo en glucosa (1 g/L) suplementado con suero fetal bovino inactivo 10% (Life Technologies. Carlsbad, CA).

En todos los medios se alternó el uso de gentamicina 50mg/l (Life Technologies. Carlsbad, CA) con el uso de una combinación de penicilina 100mg/l y estreptomina 500U (Laboratories PAA. Westborough, MA) para evitar la aparición de resistencias.



Los cultivos se mantuvieron a una confluencia media del 75% mediante distintos pases semanales, evitando el estrés causado tanto por el sobrecrecimiento como por la dilución excesiva. Los pases se realizaron mediante la retirada del medio, adición de tripsina 0,25% (Life Technologies. Carlsbad, CA), despegado de las células, neutralización de la tripsina con el doble de medio y centrifugación a 420 xg durante 5 minutos. Las células se pasaron entonces a nuevas placas.

Periódicamente las líneas celulares fueron sometidas a pruebas de detección de micoplasma mediante PCR. Los primers fueron obtenidos mediante un servicio de síntesis de oligonucleótidos (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO), siendo las secuencias utilizadas las siguientes:

Sense: 5'-GATGTCAAGAGTGGGTAAGGTT-3'

Antisense 5'-GATGTTTAGCCGGGTCGAGAG-3'

### Tratamientos y reactivos

Se utilizaron dos inhibidores de la familia de PARP: PJ34 10 $\mu$ M (Enzo. Farmingdale, NY) y olaparib AZD2281 5 $\mu$ M (Selleckchem. Houston, TX). Las células se trataron con los inhibidores durante 90 minutos antes de ser expuestas a hipoxia.

El inhibidor de ROS N-(2-Mercaptopropionyl) glicina, también conocido como MPG-2 (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO) se utilizó a 300 $\mu$ M 1 hora antes de la exposición a la hipoxia.

El agua oxigenada (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO) se utilizó a 600 $\mu$ M durante 15 minutos como control positivo de la inducción de daño al ADN por estrés oxidativo. La hidroxurea (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO) se utilizó a 2mM durante 2 horas como control positivo de la inducción de estrés replicativo.



## Anticuerpos

Se presentan a continuación en forma de tabla los anticuerpos utilizados para la realización de esta Tesis Doctoral:

Nombre	Huésped	Concentración	Casa comercial
$\alpha$ -Tubulina	Ratón	1:10000 WB	Sigma-Aldrich. St. Louis, MO
$\beta$ -Actina	Ratón	1:10000 WB	Sigma-Aldrich. St. Louis, MO
PARP-1	Conejo	1:5000 WB	Enzo. Farmingdale, NY
Poly(ADP-ribose)	Conejo	1:1000 WB; IHQ	Trevigen. Gaithersburg, MD
Poly(ADP-ribose)	Ratón	IP 1 $\mu$ g	Trevigen. Gaithersburg, MD
HIF-1 $\alpha$	Conejo	1:5000 WB; 1:100 IF IP 1 $\mu$ g; IHQ 1:300	Bethyl. Montgomery, TX
HIF-1 $\alpha$	Conejo	5 $\mu$ g ChIP-Seq	Abcam. Cambridge, MA
RPA	Ratón	1:5000 WB	Cell Signaling. Danvers, MA
p-RPA	Conejo	1:1000 WB	Bethyl. Montgomery, TX
P53	Ratón	1:5000 WB	Santa Cruz. Dallas, Texas
p-P53	Conejo	1:1000 WB	Millipore. Burlington, MA
H2AX	Conejo	1:1000 WB	Millipore. Burlington, MA
p-H2AX	Ratón	1:1000 WB	Millipore. Burlington, MA
Kap1	Ratón	1:5000 WB	Abcam. Cambridge, MA
p-Kap1	Conejo	1:1000 WB	Abcam. Cambridge, MA
Histone H1	Ratón	1:1000 WB	Santa Cruz. Dallas, Texas
Lamin B	Conejo	1:5000 WB	Abcam. Cambridge, MA
53BP1	Ratón	1:100 IF	Millipore. Burlington, MA
Flag	Ratón	IF 1:100	Sigma-Aldrich. St. Louis, MO
GST	Cabra	1:5000 WB	Bethyl. Montgomery, TX



## Hipoxia

Las exposiciones a hipoxia se realizaron utilizando una cabina de hipoxia *INVIVO 300* (Ruskin. Grandview, MO). Las células fueron expuestas a distintos tiempos de hipoxia en condiciones de 1% O<sub>2</sub> y 5%CO<sub>2</sub> a 37 °C.

## Irradiación

Los cultivos celulares fueron irradiados en una cabina RS225 (Xstrahl. Camberley, UK). Las células fueron expuestas a rayos X con un voltaje de 195 kV y a una intensidad de 1.6 Gy/min hasta alcanzar una dosis final de 5 Gy sobre la muestra.

## Silenciamiento/sobreexpresión

Los silenciamientos y sobreexpresiones transitorios se generaron mediante el uso de ARNs de interferencia y plásmidos de sobreexpresión. En ambos casos se utilizó el reactivo *JetPRIME* (Polyplus. Strasbourg, France) como vehículo para introducir los ácidos nucleicos en las células.

Se sembraron distintas cantidades de células dependiendo de los requerimientos de la técnica. A las 24 horas se preparó una mezcla con el *Buffer de JetPRIME* y el ácido nucleico. Tras una breve agitación con vórtex se añadió a esta mezcla la cantidad de *JetPRIME* indicado por los proveedores. Se dejó incubar el *JetPRIME* con los ácidos nucleicos durante 10 minutos.

A continuación, se añadió la mezcla al medio de cultivo de cada pocillo. Tras 24 horas incubando se cambió el medio y se esperó otro día. Tras estas 48 horas se realizaron los experimentos de interés.

Para el silenciamiento transitorio se utilizaron las siguientes secuencias:



Silenciamiento	Secuencias
siMock	Sense: 5'-CCUACAUCCCGAUCGAUGAUG- 3' Antisense: 5'-CAUCAUCGAUCGGGAUGUAGG- 3'
siPARP-1	Sense: 5'-GAAGAUGGUGGACCCGGAG- 3' Antisense: 5'-CUCCGGGUCCACCAUCUUC- 3'

A continuación, tabla especificando las cantidades de reactivos y ácidos nucleicos a añadir según la cantidad de células requeridas por el experimento.

Placa	Nº de células	Vol. final de medio (ml)	Vol. de JetPRIME Buffer (µl)	Vol. de JetPRIME (µl)	µg de cDNA	µM de siRNA (nM)
6 well	2.10 <sup>5</sup>	2	200	2	1	40
P60	5.10 <sup>5</sup>	5	200	4	2	60
P100	1.10 <sup>6</sup>	10	500	10	5	80

## Western Blot

Al finalizar los experimentos las células fueron lisadas en Buffer TR3 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, SDS 3%, Glicerol 10% y H<sub>2</sub>O destilada). Tras ser recogidas, las muestras se sonicaron durante 10 segundos en un sonicador mecánico VC-300 (Vibra-Cell. Newtown, CT). Tras esto se utilizó el método Lowry para medir la concentración de proteína [320]. Para ello se siguieron las instrucciones del kit DC *protein assay* (Biorad. Hercules, CA). Una vez cuantificada la concentración de proteínas, se añadió a las muestras buffer de carga Laemmli modificado (250mM de Tris-HCl (pH



7,5), glicerol 20%, SDS 10%, 1,4M de mercaptoetanol y azul de bromofenol al 1%). Por último, las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos. Con este paso se obtuvo la linealización de las proteínas, que pasaron a conservar únicamente su estructura primaria.

A continuación, las proteínas se separaron según su peso molecular mediante electroforesis realizadas en geles de acrilamida al 7,5 ó 12% dependiendo del peso molecular a observar. Las muestras fueron transferidas a posteriori a una membrana de PVDF (Amersham. Chicago, IL) utilizando el método de transferencia húmeda (Biorad. Hercules, CA) a 100V durante 90 minutos.

Una vez transferidas, las membranas fueron bloqueadas durante una hora utilizando PBS 1x con Tween al 1% y leche en polvo desnatada al 5%. Se dejaron incubar durante la noche con los anticuerpos primarios de interés. Al día siguiente se realizaron 3 lavados en agitación con PBS 1x Tween al 1%. Tras ello se incubaron las membranas con los correspondientes anticuerpos secundarios durante noventa minutos.

Tras ello se repitieron 3 lavados con PBS 1x Tween 1% y las proteínas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia utilizando los siguientes reactivos:

ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham. Chicago, IL) y Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore. Burlington, MA). Por último, la señal fue obtenida mediante la exposición de películas fotosensibles CP-PLUS X-ray (Agfa. Mortsel, Bélgica), reveladas y fijadas en un procesador de películas CURIX60 (Agfa. Mortsel, Bélgica).

## Subfraccionamiento

Otra técnica para estudiar la diferente localización de las proteínas dentro de célula es el subfraccionamiento celular. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células por condición. Al finalizar el experimento, las células se lisaron con el *buffer de lisis citoplasmático*



(sacarosa 250mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, Tris-HCl 50mM (pH7,4) y NP-40 al 0,25%) suplementado con cóctel inhibidor de proteasas (Roche. Basilea, Suiza). Tras incubar 10 minutos en una noria a 4°C, las muestras se centrifugaron a 500 xg durante 5 minutos. El sobrenadante se separa entonces como fracción citosólica.

Para minimizar la contaminación entre fracciones, el pellet celular se resuspende en *buffer de lavado* (sacarosa 1M, MgCl<sub>2</sub> 5Mm and Tris-HCl 50mM a pH 7,4) a 4°C. Se centrifuga a 3000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante se descarta.

El nucleoplasma se aísla añadiendo un *buffer de lisis nuclear* (NaCl 0,4 M, Tris-HCl 20mM (pH 7,4), glicerol 15%, Triton X-100 1.5%). Se aplica un vórtex y se deja incubar en noria durante 30 minutos a 4°C. Tras lo cual se centrifuga a 5000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante se separa conteniendo las proteínas solubles en el nucleoplasma.

El pellet se resuspende a continuación en un buffer preparado a partir del buffer de lisis nuclear (al que se añadió CaCl<sub>2</sub> 5mM y nucleasa microcócica 4000U). Se aplica un vórtex y se deja incubar en noria durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifuga a 16000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante contiene la fracción proteica ligada a la cromatina.

Se añade entonces a las muestras el buffer Laemmli modificado (250mM de Tris-HCl (pH 7,5), glicerol 20%, SDS 10%, 1,4M de mercaptoetanol y azul de bromofenol al 1%), y se cargaron en geles de acrilamida tal como se especificó en el apartado anterior.

## Inmunoprecipitación

Se utilizó esta técnica para analizar la interacción entre proteínas y su posible modificación por poli(ADP-ribosa). Se sembraron 2x10<sup>6</sup> células por condición, se sometieron a las distintas condiciones experimentales y a continuación se lisaron las células en hielo durante veinte minutos en *buffer de lisis* (NP-40 al 1%, NaCl



100mM, ortovanadato sódico 1mM, NaF 10mM, EGTA 1mM (pH 8,0), Tris-HCl (pH 7,4), PMSF 500mM y cóctel inhibidor de proteasas (Roche. Basilea, Suiza)). Los lisados se incubaron con proteína A sefarosa durante dos horas, con ello se redujo la unión inespecífica de proteínas en pases posteriores. Las muestras se centrifugaron a 16400 xg durante 5 minutos a 4°C, los sobrenadantes se incubaron entonces durante la noche a 4°C con proteína A sefarosa en combinación con el anticuerpo primario para HIF-1  $\alpha$  y Poly(ADP-ribosa).

A continuación, las muestras se centrifugaron a 16400 xg durante 5 minutos a 4°C, en el pellet encontramos la proteína A sefarosa unida al anticuerpo y nuestra proteína de interés.

Las muestras se sometieron a 5 lavados salinos (NaCl 100mM, Tris-HCl 20mM, (pH 8,0), NP-40 al 0,5% EDTA 1mM, Inhibidor de proteasas) entre lavado y lavado se realizaron centrifugaciones a 16400 xg durante 1 minuto a 4°C.

Para preparar las muestras al western blot, se añadió a las muestras buffer Laemmli modificado (250mM de Tris-HCl (pH 7,5), glicerol 20%, SDS 10%, 1,4M de mercaptoetanol y azul de bromofenol al 1%).

### Ensayo Pull Down

Para este ensayo las células fueron sembradas a una concentración de  $2 \times 10^6$  por condición en placas de p100. Fueron a continuación cotransfectadas con el C-ter de HIF-1 $\alpha$  y los distintos dominios de PARP-1. Para ello se utilizó *JetPRIME* (Polyplus. Strasbourg, France) tal como se indica en la sección de sobreexpresión. Las células se lavaron y recogieron en PBS 1x frío con inhibidor de proteasas (Roche. Basilea, Suiza). Se limpiaron de impurezas mediante centrifugación a 420 xg durante 5 minutos y a 4°C. Las células fueron lisadas en frío mediante el uso de *buffer de lisis* (NaCl 400mM, glicerol 20%, DTT 5mM, Tris-HCl (pH 7,5) y pefabloc (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO) en combinación con un cóctel inhibidor de proteasas).



Las muestras se centrifugaron a 420 xg durante 20 minutos a 4°C, se conservó el sobrenadante que contiene el extracto proteico. Para retener las proteínas marcadas con GST, los lisados se expusieron a glutatión sefarosa 4B (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO) durante 2 horas en agitación. Las muestras fueron lavadas 3 veces mediante el *buffer de lavado*, (NP-40 0,1%, Tris-HCl 20mM (pH 7,5) en presencia de coctel con inhibidor de proteasas (Roche. Basilea, Suiza) y tres concentraciones decrecientes de NaCl (500, 300 y 150mM)). Una vez limpias, las muestras fueron resuspendidas en buffer de carga. Las proteínas se separaron de la glutatión sefarosa y desnaturalizaron calentando las muestras a 95°C durante 5 minutos. Se añadió a las muestras buffer Laemmli modificado (250mM de Tris-HCl (pH 7,5), glicerol 20%, SDS 10%, 1,4M mercaptoetanol y azul de bromofenol al 1%). De esta forma las muestras quedaron preparadas para ser analizadas mediante western blot.

### PCR cuantitativa (qPCR)

Para estudiar los niveles de expresión de ciertos genes, se estudió la inducción de sus ARNm mediante qPCR. Para ello fue necesario realizar los siguientes pasos:

Extracción de ARN total. Obtenido siguiendo las instrucciones para el kit de columnas *RNAasy Mini Kit* (Qiagen. Hilden, Alemania).

Eliminación de los restos de ADN genómico y RNAsas. Para ello se añadieron DNAsa y RNAsin ( Invitrogen. Carlsbad, CA. Carlsbad, California) que se dejaron actuar a distintas temperaturas (37°C durante 15 minutos, luego 65°C durante 10 minutos). Para ello utilizamos un termociclador *T100 Thermal Cycler* (Biorad. Hercules, CA).

A continuación, se midió la cantidad y calidad del ARN obtenido mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop. Las ratios de absorbancia 260/280 y absorbancia 260/230 se consideraron para evaluar la pureza y calidad de la muestra.



El siguiente paso consistió en realizar la retrotranscripción de ARN a cDNA. A partir de 1µg de ARN se pasó a ADN complementario (cDNA). Para ello se incubó el ARN con transcriptasa inversa siguiendo las instrucciones del kit *ScriptcDNA Synthesis Kit* (Biorad. Hercules, CA).

Una vez obtenido el cDNA se realiza la reacción en cadena de la polimerasa. Se tomó 1µg de cDNA y se utilizó la *iTaq Universal SYBR Green supermix* (Biorad. Hercules, CA) junto con primers para los distintos genes. Las mediciones se realizaron en un termociclador *CFX96* (Biorad. Hercules, CA), las muestras se sometieron a 39 ciclos a 95°C 30 segundos, 60°C 1 minuto y 72°C 30 segundos.

Los primers utilizados poseen una temperatura de alineamiento 60°C, siendo sus secuencias las siguientes:

Gen	Secuencias
HIF-1α	Sense: 5'-CTGCAACATGGAAGGTATTGCA-3' Antisense: 5'-TACCCACACTGAGGTTGGTTACTG-3'
CAIX	Sense: 5'-TAAGCAGCTCCACACCCTCT-3' Antisense: 5'-TCTCATCTGCACAAGGAACG-3'
LDHA	Sense: 5'-TGGGAGTTCACCCATTAAGC-3' Antisense: 5'-AGCACTCTCAACCACCTGCT-3'
ANGPTL4	Sense: 5'-CGTACCCTTCTCCACTTGGG-3' Antisense: 5'-GCTCTTGGCGCAGTTCTTG-3'
GLUT-1	Sense: 5'-CAGTTTGGCTACAACACTGGAGT-3' Antisense: 5'-ATAGCGGTGGACCCATGTCT-3'
VEGF-A	Sense: 5'-GGGCAGAATCATCACGAAGT-3' Antisense: 5'-TGGTGATGTTGGACTCCTCA-3'
DDIT4	Sense: 5'-GGACCAAGTGTGTTTGTGTTTG-3' Antisense: 5'-CACCCACCCCTT CCTACTCTT-3'
UBE2M	Sense: 5'- ATGAGGGCTTCTACAAGAGTGG-3' Antisense: 5'- ATTGTCTCACACTTCACCTTGG-3'



36B4 (Normalizador)	Sense: 5'- CAGATTGGCTACCCAAGTGT-3' Antisense: 5'- GGCCAGGACTCGTTTGTACC-3'
------------------------	--

## Inmunofluorescencia

Gracias a la técnica de inmunofluorescencia se pudo observar la presencia y distribución intracelular de proteínas.

En placas 6-well se introdujeron cubreobjetos esterilizados. A continuación, se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células y se dejaron crecer durante 24 horas. Tras realizar los experimentos pertinentes las placas se lavaron con PBS 1x para retirar restos celulares y de medio.

Las células se fijaron entonces con 3% de paraformaldehído y sacarosa al 2% en PBS 1x durante 15 minutos a temperatura ambiente. Con ello se consiguió mantener la estructura intracelular inalterada. Los restos de buffer de fijación fueron retirados mediante lavados de PBS 1x.

A continuación, las células se preparan para la entrada de los anticuerpos, esto se consigue alterando su membrana mediante la exposición a un tensioactivo no iónico (Tritón X-100 al 0,25%) diluido en PBS 1x durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras lo cual las muestras fueron lavadas de nuevo con PBS 1x.

El siguiente paso fue bloquear las muestras con BSA al 2% en PBS 1x y en agitación suave durante una hora a temperatura ambiente. Con ello se pretende reducir la señal inespecífica que pueda generar el uso posterior de los anticuerpos.

Se pasó a continuación a incubar los cubreobjetos con el anticuerpo primario. Los anticuerpos en cuestión fueron diluidos con BSA al 2% en PBS 1x. La incubación se realizó durante 45 minutos y a 37°C. Tras esto se lavaron las muestras con PBS 1x para retirar los restos de anticuerpo primario.

Las células se incubaron con anticuerpos secundarios que emiten a distintas longitudes de onda: Contra conejo a 488nm (Invitrogen. Carlsbad, CA) o contra



ratón a 647nm (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los anticuerpos se diluyeron en PBS 1x con BSA al 2%. Se incubaron durante 20 con los cubreobjetos a 37°C. Tras esto se lavaron con PBS 1x para retirar los restos de secundario.

Por último, se realizó el montaje y marcaje de los núcleos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Los cubreobjetos se depositaron en portaobjetos con medio de montaje *Vectashield antifade mounting medium*, (LSBio, Seattle, WA) al que se añadió DAPI.

Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal *SP5* (Leica, Wetzlar, Alemania) o de fluorescencia *Axio Image A1* (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

## Inmunohistoquímica

Se obtuvieron secciones de 4 micras de grosor a partir de melanomas embebidos en bloques de parafina. A continuación, se retiró la parafina de los cortes mediante xileno y las muestras se rehidrataron en diluciones seriadas con alcohol. Los cortes se sumergieron en una solución con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 30 minutos, con ello se agotó la actividad peroxidasa endógena. Las secciones fueron entonces cubiertas con una reacción de bloqueo al 1% (Roche, Basilea, Suiza) en PBS Tween al 0,05%. De esta manera se evitaron las uniones inespecíficas cuando se añadieron los anticuerpos.

El anticuerpo anti PARP-1 (Enzo, Farmingdale, NY) se utilizó a 1:300 durante una hora y el de HIF-1 $\alpha$  (Bethyl, Montgomery, TX) a 1:100 durante la noche. Los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa se incubaron con las muestras, tras lo cual se añadió 3,3-diaminobenzidina para inducir la inmunoreactividad siguiendo el protocolo indicado por el proveedor (Dako, Berlin, Alemania). Por último, las células fueron teñidas con hematoxilina y montadas en “*DPX Mountant for histology*” (BDH Lab, Poole, UK). Se consideraron como control negativo aquellas muestras en las que se omitió la adición de anticuerpos primarios. Las



imágenes fueron adquiridas mediante el uso de un microscopio *BX-61* (Olympus, Tokyo, Japón) y analizadas por patólogos expertos del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla. La correlación fue medida como negativa (0%), débil (menos del 19%) y positiva (por encima del 20%).

## Medida de especies reactivas de oxígeno

Se midió la generación de especies reactivas de oxígeno mediante el uso de la sonda DCFDA. Para ello se utilizó el kit *DCFDA-Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit* (Abcam, Cambridge, MA). Se sembraron  $2,5 \times 10^4$  células en placas de 96 pocillos, a las 24 horas y siguiendo las instrucciones del fabricante, las células se lavaron con el *Buffer1x* incluido en el kit. A continuación, las células se tiñeron con DCFDA  $25 \mu\text{M}$  a  $37^\circ\text{C}$ . Se dejaron incubar en oscuridad durante 45 minutos.

De nuevo las células fueron lavadas con el *Buffer1x*, se añadió medio de cultivo sin rojo fenol y a continuación se realizaron los experimentos pertinentes.

Las placas se midieron entonces en un lector de placas *Infinite 200 PRO* (Tecan, Männedorf, Suiza) a una emisión de 535nm y una excitación de 485nm.

Para confirmar los resultados se replicó la medida de ROS utilizando un segundo método basado en el compuesto DHE (Dihydroethidium), una sonda no relacionada con el DCFDA. Para ello se utilizó el *DHE (Dihydroethidium) Assay Kit* (Abcam, Cambridge, MA). Siguiendo las instrucciones de los proveedores, se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células por punto de 96 pocillos. A las 24 horas las células fueron lavadas con PBS 1x y se añadió el DHE a  $5 \mu\text{M}$ . Se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  y oscuridad durante 90 minutos. A continuación, el DHE fue retirado y sustituido por medio sin rojo fenol. Se realizaron entonces los experimentos. Por último, las placas se midieron en el lector de placas *Infinite 200 PRO* (Teca, Männedorf, Suiza) a una emisión de 590nm y una excitación de 550nm.



## Obtención de células knockout mediante CRISPR-Cas9

Se obtuvieron células HEK293T PARP-1 K.O. mediante la tecnología CRISPR-Cas9. Utilizando el *Optimized CRISPR tool* (Zhang Lab. Berkeley, UC) se obtuvieron varios ARNs guía para el gen de PARP-1. Estos ARNs fueron clonados en el plásmido p-CRISPR.EFS.GFP (Addgene. Watertown, MA).

Las células fueron transfectadas mediante el uso de *JetPRIME* (Polyplus. Strasbourg, France). La capacidad de estas guías para realizar cortes en el genoma fue evaluada mediante el uso del kit *GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las guías 2 y 4 consiguieron mejor resultado en términos de inducción de irrupción alélica:

Guía 2: 5'-GAGTCGAGTACGCCAAGAGC- 3'

Guía 4: 5'-GCATCCCCAAGGACTCGCTC- 3'

Una vez seleccionadas las guías 2 y 4, las células fueron de nuevo transfectadas. Las células positivas para GFP fueron separadas mediante citometría de flujo y sembradas en placas de 96 pocillos de forma unicelular. Las células que crecieron y generaron colonias fueron analizadas y confirmadas como PARP-1 K.O. mediante secuenciación de Sanger y de forma funcional mediante western blot.

## ChIP-Seq

Las células se sembraron a una densidad  $2 \times 10^7$  por condición. Tras dejarse adherir durante 24 horas se sometieron a la exposición a hipoxia o normoxia. Concluido el experimento se fijaron en formaldehído al 36,5% durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo glicina a una



concentración final de 1,5X durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células entonces se lavaron con PBS 1X en hielo. Tras esto, las células son recogidas en 2 ml de PBS 1X con inhibidor de proteasas en frío. Se centrifugan a 2000 xg durante 5 minutos a 4°C y se descarta el sobrenadante.

A continuación, y siguiendo las instrucciones del kit *SimpleChip Enzymatic Chromatin IP Kit* (Cell Signaling, Danvers, MA) se lisaron los núcleos y la cromatina mediante 0,5 µl nucleasa microcócica durante 20 minutos a 37°C. Tras esto, se centrifugaron los núcleos a 16000 xg durante 1 minuto a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes.

Se expusieron las muestras a sonicación. Para ello se utilizó un sonicador *Diagenode Bioruptor* (Diagenode, Liège, Bélgica). Las muestras fueron sumergidas en agua y sometidas a 3 ciclos de 5 minutos de sonicación alternando 30 segundos de sonicación con otros 30 de descanso. Por último, se retiraron los restos nucleares centrifugando a 9400 xg durante 10 minutos a 4°C.

Se añadieron 5 µg del anticuerpo para HIF-1α por punto y se dejó incubar en rotación a 4°C durante la noche. Tras esto se incubaron las muestras con *CHIP-Grade Protein G Magnetic Beads* (Cell Signaling, Danvers, MA). Se añadieron 30 µl por punto y se incubaron en rotación durante 2 horas a 4°C.

Las esferas magnéticas se recuperaron colocando las muestras en una gradilla magnética, se realizaron distintos lavados siguiendo las instrucciones del kit. La cromatina se eluyó calentando en un vórtex durante 30 minutos a 65°C. Para finalizar, se realizó el separado del ADN añadiendo NaCl 5M y 2 µl de Proteinasa K. Todo ello se incubó durante 2 horas a 65°C.

Las muestras fueron entregadas al servicio de genómica del IPBLN, CSIC. Allí se obtuvieron las librerías a partir de 30ng de ADN usando el *NEBNext Ultra II DNA library preparation kit* de Illumina (NEB, Ipswich, MA). Se diluyeron 10 veces los adaptadores durante las reacciones de ligación, tal y como está recomendado para muestras lisadas con nucleasa microcócica. No se realizó selección por tamaño para



el híbrido adaptador-DNA durante la fase de limpieza. Se utilizaron 5 ciclos de amplificación para completar las secuencias adaptadoras, las librerías finales se cuantificaron utilizando un fluorómetro Qubit (Thermo Fisher. Waltham, MA). Mediante un Bioanalyzer HS DNA chip se verificó la calidad y distribución de las muestras. Se preparó una librería equimolecular que se diluyó y desnaturalizó siguiendo las instrucciones de *Illumina NextSeq 500 library preparation guide*. Se realizó en el secuenciador *NextSeq 500 sequencer* (Illumina. San Diego, CA) la secuenciación de los 75nt *single-end*. Se obtuvieron de media unos 24 millones de lecturas por muestra.

Por último, el servicio de Bioinformática del del IPBLN CSIC se encargó de analizar y procesar los datos. La evaluación de la calidad de los datos y el alineamiento de las muestras se realizó utilizando un miARma-Seq pipeline [321]. En detalle, se utilizó el programa *fastqc* para determinar la calidad de las secuencias y la posible acumulación de adaptadores. A continuación, las muestras fueron alineadas con el *Human GRCH38 genome* disponible en el portal GENCODE (version 28). Las muestras se alinearon utilizando el Burrows-Wheeler Aligner software [322]. Por último, todos los datos en crudo fueron subidos al repositorio *Gene Expression Omnibus* (GEO), donde son de público acceso bajo el código GSE144189.

## Síntesis de $^{32}\text{P}$ -PAR para el ensayo de PARilación de los péptidos.

El  $^{32}\text{P}$ -PAR se preparó de la siguiente manera: Se incubaron 20  $\mu\text{g}$  de PARP-1 humano (Alexis) en un medio con 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 0,15M NaCl, 0,5mM ADN tratado con DNasa I, 0,1% BSA, 0,4 mM NAD, 0,5 Ci [ $^{32}\text{P}$ ]-NAD<sup>+</sup> (800 Ci/mmol, 5 Perkin Elmer) en un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . Todo ello se incubó durante 1 hora a 32°C. A continuación se añadieron 2  $\mu\text{l}$  de 10 mg/ml DNasa I (Roche. Basilea, Suiza) y 2  $\mu\text{l}$  de 1M  $\text{CaCl}_2$ , todo se incubó a 1h at 37 °C. Tras esto se



añadieron 250  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 5  $\mu\text{l}$  20% SDS y 20  $\mu\text{l}$  de 10 mg/ml Proteinasa K. Todo ello se incubó durante 4 horas a 37°C. Las proteínas se extrajeron mediante fenol/ $\text{CHCl}_3$ : se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de fenol/ $\text{CHCl}_3$ , se aplicó un vórtex y se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C. En la fase superior se recuperó el polímero PAR mediante su precipitación al añadir 100  $\mu\text{l}$  de 3M de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$  y 1ml de alcohol isopropílico. La precipitación se realizó a -20°C durante la noche. Se centrifugaron a continuación las muestras a 20.000 xg a 4°C durante 1 hora. Se retiró la fase líquida y el pellet se lavó con 1 ml de etanol al 80%. El polímero PAR se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se resuspendió en 400  $\mu\text{l}$  de buffer TE.

## Ensayo de unión de polímero a los péptidos

Se sintetizaron los 4 péptidos biotinilados (Genscript. Piscataway, NJ). Los péptidos se resuspendieron en  $\text{H}_2\text{O}$  hasta alcanzar una concentración de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se tomaron 3  $\mu\text{g}$  de péptidos y se unieron a 15  $\mu\text{l}$  de una dilución de esferas magnéticas con estreptavidina (Millipore. Burlington, MA) en hielo durante 1 hora con agitación. Las esferas fueron entonces lavadas dos veces en 1 ml de PBS. Tras lo cual se incubaron con 50000 cpm  $^{32}\text{P}$ -PAR en 200  $\mu\text{l}$  de PBS durante 1 hora en hielo y agitación. A continuación, estas muestras se lavaron 3 veces en 1 ml de PBS. Tras el último lavado se retiró el sobrenadante. Para finalizar el ensayo, se detectó la radiación procedente de PAR unido a los péptidos mediante un contaje Cerenkov usando un contador Packard.

## Consumo de oxígeno

La medición del consumo de oxígeno se realizó siguiendo las instrucciones indicadas para el kit *Extracellular Oxygen Consumption Assay* (Abcam. Cambridge,



MA). El kit contiene un fluoróforo que se activa en presencia de oxígeno, informando de la tasa respiratoria y actividad mitocondrial. Se cultivaron  $8 \times 10^4$  células en placas de 96 pocillos y se dejaron a crecer durante la noche. Se añadieron entonces  $10 \mu\text{l}$  del reactivo *Extracellular oxygen consumption reagent*. A continuación se realizaron los experimentos pertinentes. Una vez finalizados, se sellaron los pocillos con  $100 \mu\text{l}$  del *High sensitivity mineral oil* a  $37^\circ\text{C}$ , evitando la formación de burbujas. Inmediatamente se llevan las muestras a un microscopio de fluorescencia, donde se realizan mediciones cada 5 minutos a lo largo de 60 minutos para una excitación de  $380 \pm 20 \text{nm}$  y emisión de  $650 \pm 20 \text{nm}$ .

## Ensayo de glucólisis

La medida de la glucólisis se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor para el kit *Glycolysis Assay [Extracellular acidification]* (Abcam, Cambridge, MA). Este kit cuantifica la acidificación extracelular debida a la producción de lactato durante la glucólisis, gracias al uso de un fluoróforo impermeable a la célula y sensible a cambio de pH. Se sembraron  $8 \times 10^4$  células en placas de 96 well y dejaron adherir durante la noche. Se purgaron de  $\text{CO}_2$  en un incubador libre de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 horas. A continuación, se añadieron  $150 \mu\text{l}$  del *Respiration Buffer* y  $10 \mu\text{l}$  del *Glycolysis Assay Reagent*. Se expusieron entonces las células a normoxia e hipoxia, tras ello se llevaron a un microscopio de fluorescencia, donde se realizan mediciones cada 5 minutos durante 60 minutos en total a una excitación de  $380 \pm 40 \text{nm}$  y emisión de  $620 \pm 10 \text{nm}$ .

## Proliferación

Se sembraron  $2 \times 10^5$  células en una p60 ( $t=0$ ), al día siguiente se añadieron los tratamientos de olaparib e hipoxia ( $t=24\text{h}$ ). Al día siguiente ( $t=48\text{h}$ ) y al siguiente



(t=72h) se midió el efecto de los diferentes tratamientos sobre la proliferación. La proliferación se midió mediante la tripsinización de las células y su contaje en cámara de Neubauer. Se sembraron diferentes placas por condición para poder realizar una medida por día. Con ello indicamos que cada placa se contó una vez, las células no fueron tripsinizadas, contadas, y resembradas para contar al día siguiente.

## Cierre de herida

Las células se sembraron a una concentración de  $5 \times 10^5$  en placas p60. Las células se dejaron crecer durante un día antes de realizar la herida. Se trataron con olaparib  $5 \mu\text{M}$  y tras 90 minutos se realizó el corte, se fotografiaron y se expusieron a hipoxia las condiciones que así lo requerían. Tras 24 horas se volvió a fotografiar las heridas. El cierre de herida se cuantificó usando el plugin *Wound Healing-Tool* para el programa *ImageJ*.

## MEME análisis

El análisis MEME se obtuvo utilizando la herramienta *MEME-ChIP Motif Analysis of Large Nucleotide Datasets*. El análisis ChIP-Seq generó información detallando las regiones del genoma en las que se detectó unión de HIF-1 $\alpha$ . Para cada pico de unión se detalló el número de cromosoma donde se localiza, así como el nucleótido de origen y final. Con ello se obtuvo la secuencia de nucleótidos contenido en cada pico en formato FASTA. La lista de secuencias se introdujo en el motor de análisis de la herramienta, el cuál analizó las secuencias buscando patrones repetidos y calculando la fuerza estadística de los mismos mostrada en forma de e-valor.



## Tabla de ensayos clínicos

Se utilizó el motor de búsqueda para ensayos clínicos disponible en la página web de la *U.S. National Library of Medicine*. Se seleccionaron aquellos ensayos clínicos actualmente activos. Para cada uno de ellos se detalla: El nombre del estudio, el tipo de cáncer a tratar, la combinación de medicamentos implicada, el número de pacientes enlistados, la fase en la que se encuentra el trabajo, y por último el número de identificación del mismo, presentado en forma de NTC (Number Clinical Trial) seguido de 8 dígitos.

## Uso de cBioportal

Para el estudio de la coexpresión de PARP-1 y HIF-1 $\alpha$  en distintos tumores se empleó el software de libre acceso *cBioportal for Cancer Genomics*. Mediante esta plataforma se analizaron los datos procedentes de la base de datos *The Cancer Genome Atlas (TCGA) PanCancer Atlas Studies* [323]. Con ellos, se estudió cómo para tres tipos de melanoma existía una correlación positiva entre la expresión del ARNm de ambas proteínas.

A graphic of a DNA double helix, rendered in red and blue, forming a central oval shape. The word "RESULTADOS" is written in black, uppercase letters across the center of this oval.

RESULTADOS



## Resultados

### La estabilidad de HIF-1 $\alpha$ es dependiente de la actividad de PARP-1

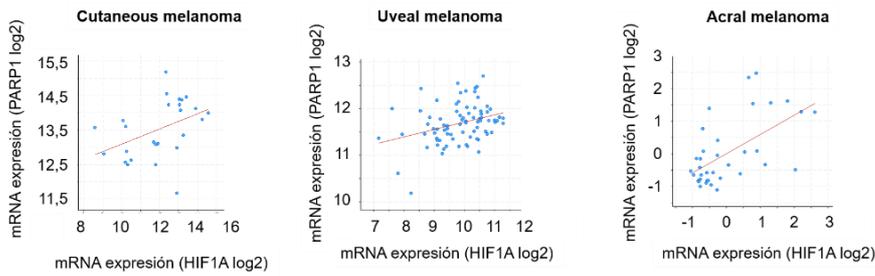
Para evaluar la relación de la expresión del ARNm de PARP-1 y HIF-1 $\alpha$  in vivo, utilizamos la base de datos pública cBioportal. Con ella observamos la expresión del ARNm en tumores para los que la hipoxia se ha descrito como relevante durante su progresión. Estos tumores son el melanoma metastásico, acral, y uveal. Para los tres casos vemos una asociación positiva entre la expresión del ARNm de PARP-1 y la de HIF-1 $\alpha$  (**Figura 1a**). Para reforzar esta idea se realizó a continuación un array de tejido, en él observamos la sobreexpresión conjunta de ambas proteínas en melanomas in situ. Esta sobreexpresión está ligada al proceso de malignización y tal como es de esperar no se observa en el tejido sano colindante (**Figura 1b**). La dependencia de HIF-1 $\alpha$  sobre la actividad de PARP-1 se evaluó en células de cáncer de cérvix, melanoma metastásico y melanoma uveal. En los tres casos la acumulación de HIF-1 $\alpha$  durante hipoxia se reduce cuando inhibimos a PARP (**Figura 1c**). Mediante un silenciamiento transitorio se pudo observar cómo, al igual que con el uso de inhibidores, la pérdida de la proteína PARP-1 genera una bajada en la acumulación de HIF-1 $\alpha$  (**Figura 1d**). Por último, para evaluar si HIF-1 $\alpha$  muestra una dependencia con respecto a la acumulación de poli(ADP-ribosa), observamos en células carentes de PARG (y que por tanto no pueden degradar la poli(ADP-ribosa)) como la acumulación de HIF-1 $\alpha$  aumenta durante la hipoxia en aquellas células que acumulan poli(ADP-ribosa) (**Figura 1e**).



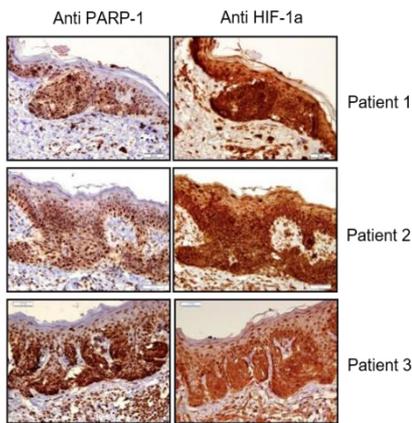
## RESULTADOS

Figure 1

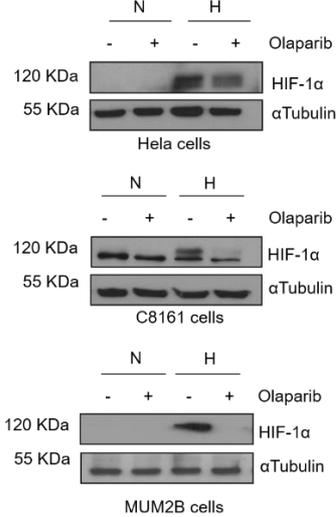
a



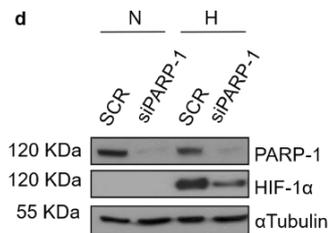
b



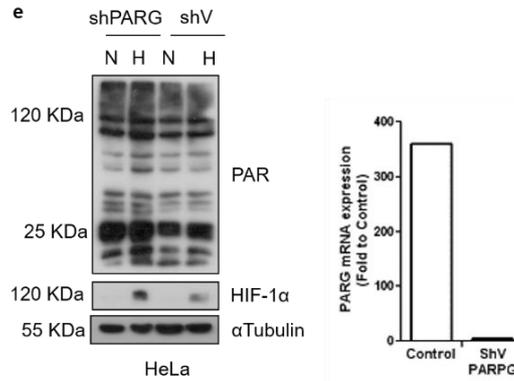
c



d



e



**Figura 1:** a Correlación in vivo de la expresión de PARP-1 y HIF-1α en pacientes con melanoma utilizando la base de datos de libre acceso “cBioportal”. Se evaluó para el melanoma metastásico (CM



Spearman: 0.50 ( $p=8.722 \times 10^{-3}$ ), Pearson :0.42 ( $p=0.0309$ )); para el melanoma uveal (UM Spearman: 0.30 ( $p=6.295 \times 10^{-3}$ ), Pearson: 0.33 ( $p=2.655 \times 10^{-3}$ )); y para el melanoma acral (AM Spearman: 0.55 ( $p=4.636 \times 10^{-4}$ ) Pearson: 0.59 ( $p=1.516 \times 10^{-4}$ )). **b** Array de tejido para tres pacientes con melanoma in situ, en el análisis inmunohistoquímico se observa la expresión de PARP-1 y HIF-1 $\alpha$  en cortes consecutivos. **c** Estudio de la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  tras la exposición al inhibidor de PARP olaparib. Tres líneas tumorales (MUM2B, C8161 y Hela) son expuestas a olaparib 5 $\mu$ M durante 90 minutos. A continuación, se someten a hipoxia (1%O<sub>2</sub>, durante 4 horas). **d** Silenciamiento transitorio para PARP-1 en células HEK293T expuestas a normoxia o hipoxia (1%O<sub>2</sub>, durante 4 horas). **e** En células Hela control o silenciadas para PARG, se midió la acumulación de poli(ADP-ribosa) y HIF-1 $\alpha$  tras una exposición a normoxia o hipoxia (1%O<sub>2</sub>, durante 4 horas).

## La inducción de ROS durante hipoxia conlleva una activación de PARP-1 y acumulación de HIF-1 $\alpha$

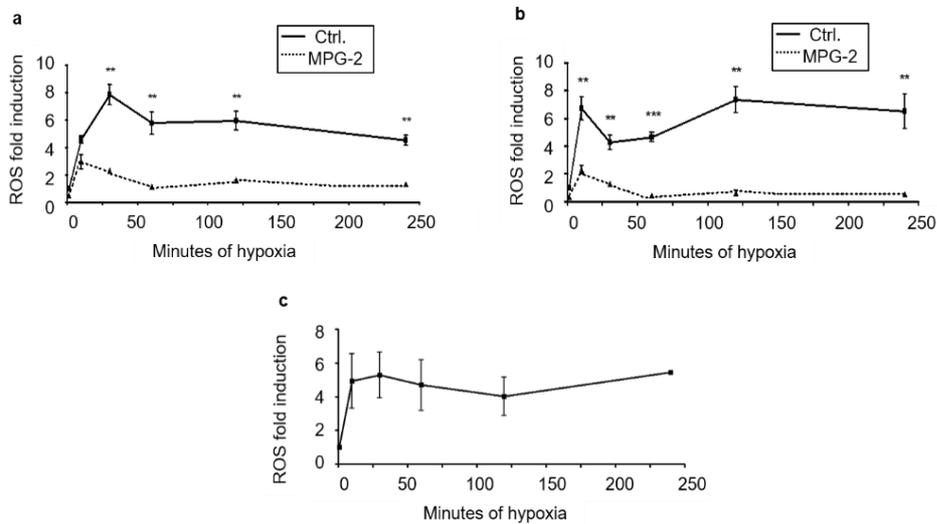
Para determinar el origen de la activación de PARP-1 durante la hipoxia se evaluó la producción de ROS, familia de moléculas previamente descrita como inductores de la actividad de PARP-1 [324]. Esta inducción se observó en las células HEK293T (**Figura 2a**) y en las HepG2 (**Figura 2b**), mediante el uso de la sonda DCFDA. En ambos casos se previene la acumulación de ROS al usar el antioxidante MPG-2 (N-(2-mercaptopropionil) glicina). El uso de una segunda sonda denominada DHE, corroboró cómo durante la hipoxia temprana existe un pico de producción de estas moléculas (**Figura 2c**).

En paralelo a la producción de ROS, durante la hipoxia temprana se observa una acumulación de PAR y HIF-1 $\alpha$ . En células HEK293T mediante la inhibición de PARP se consigue una reducción en los niveles de poli(ADP-ribosa) y una bajada en la acumulación de HIF-1 $\alpha$  (**Figura 2d**), observamos una situación similar mediante el uso de antioxidantes, éstos reducen la acumulación de poli(ADP-ribosa) y como consecuencia la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  se interrumpe (**Figura 2e**). El mismo efecto



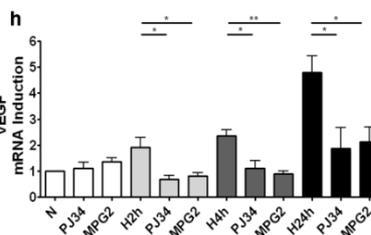
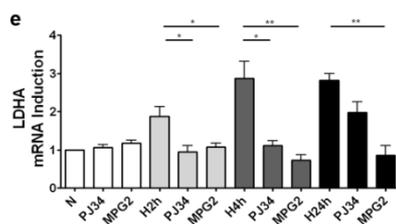
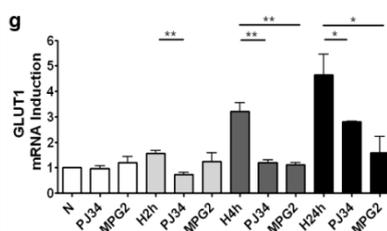
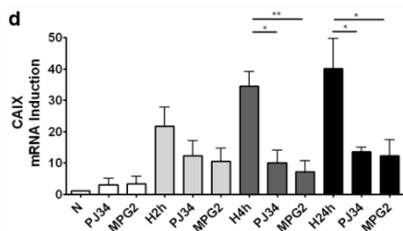
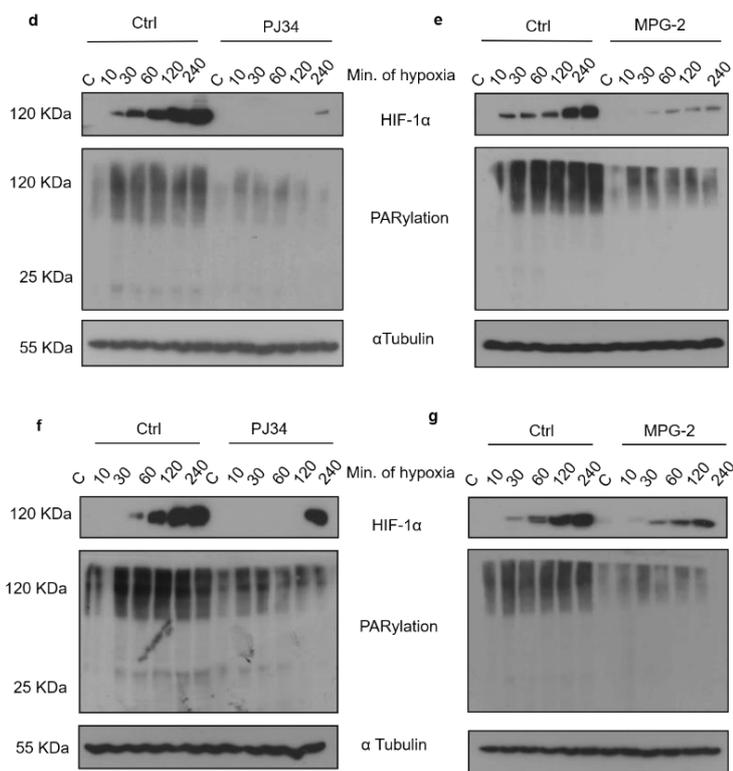
se observa en las células HepG2, tanto al inhibir PARP (**Figura 2f**) como al bloquear la producción de ROS (**Figura 2g**).

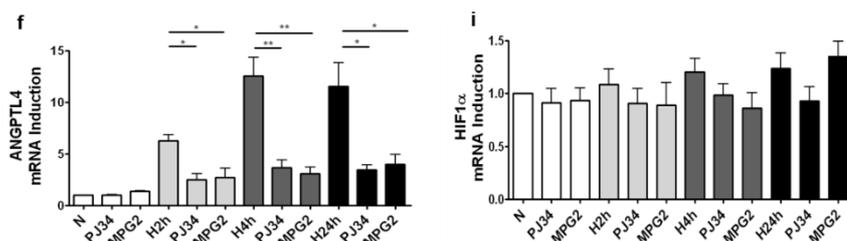
Para medir el impacto que la inhibición de PARP y ROS tienen sobre la respuesta a hipoxia, medimos la inducción de distintos genes de respuesta a hipoxia durante normoxia y distintos tiempos de hipoxia. Pudimos observar cómo de forma general, la inhibición de poli(ADP-ribosa) y de ROS generan una caída en la inducción de genes como CAIX, ANGPTL4, GLUT1, VEGF y LDHA (**Figura 2d-i**). El hecho de no observar una caída significativa en los niveles de expresión del ARNm de HIF-1 $\alpha$ , indica que la caída en la acumulación de la proteína podría ser debida a algún tipo de modificación postraduccional.





## RESULTADOS





**Figura 2:** La respuesta a hipoxia induce acumulación de ROS y PAR, siendo ambos procesos necesarios para la correcta acumulación y actividad de HIF-1 $\alpha$ . **a** Medición de ROS durante tiempos creciente de hipoxia (de 10 a 240 min.) en células HEK293T tratadas o no con el antioxidante MPG2 a 300  $\mu$ M, 1 hora pre-hipoxia. **b** Mismo experimento que en **a**, pero realizado en la línea de hepatocarcinoma HepG2. **c** Medición de la acumulación de ROS en células HEK293T durante los mismos tiempos crecientes de hipoxia (de 10 a 240 min.) se utilizó la sonda DHE (5 $\mu$ M, durante 90 minutos pre-hipoxia) para corroborar los resultados anteriores obtenidos con la sonda DCFDA. **d-e** Western blots mostrando la acumulación de poli(ADP-ribosa) y HIF-1 $\alpha$  en células HEK293T durante los mismos tiempos crecientes de hipoxia (de 10 a 240 min). Las células se expusieron al antioxidante MPG2 a 300  $\mu$ M, 1 hora previo a la hipoxia y al inhibidor de PARP PJ34 a 10  $\mu$ M, 90 minutos antes de la hipoxia. **f-g** Western blots mostrando los mismos experimentos, pero obtenidos en las células de hepatocarcinoma HepG2. **h-i** Acumulación de genes relacionados con la respuesta a hipoxia en células HEK293T. Se midió la inducción durante normoxia e hipoxia (2, 4 y 24 horas). Las células fueron tratadas con el antioxidante MPG2 a 300  $\mu$ M, 1 hora pre-hipoxia. y al inhibidor de PARP PJ34 a 10  $\mu$ M, 90 minutos pre-hipoxia.

## PARP-1 interacciona con el dominio C-terminal de HIF-1 $\alpha$ regulando la estabilidad de la proteína.

Se ha descrito como PARP-1 y HIF-1 $\alpha$  forman un complejo tras el tratamiento con miméticos de hipoxia como la ciclopiroxolamida y durante la infección por virus de Epstein Barr [175][177]. Sin embargo, no se ha estudiado aún qué dominios proteicos median la interacción, o si ésta sucede durante la hipoxia fisiológica (del



2 al 0.1% de O<sub>2</sub>), principal inductor de la actividad de HIF-1 $\alpha$  y proceso fundamental en el contexto tumoral.

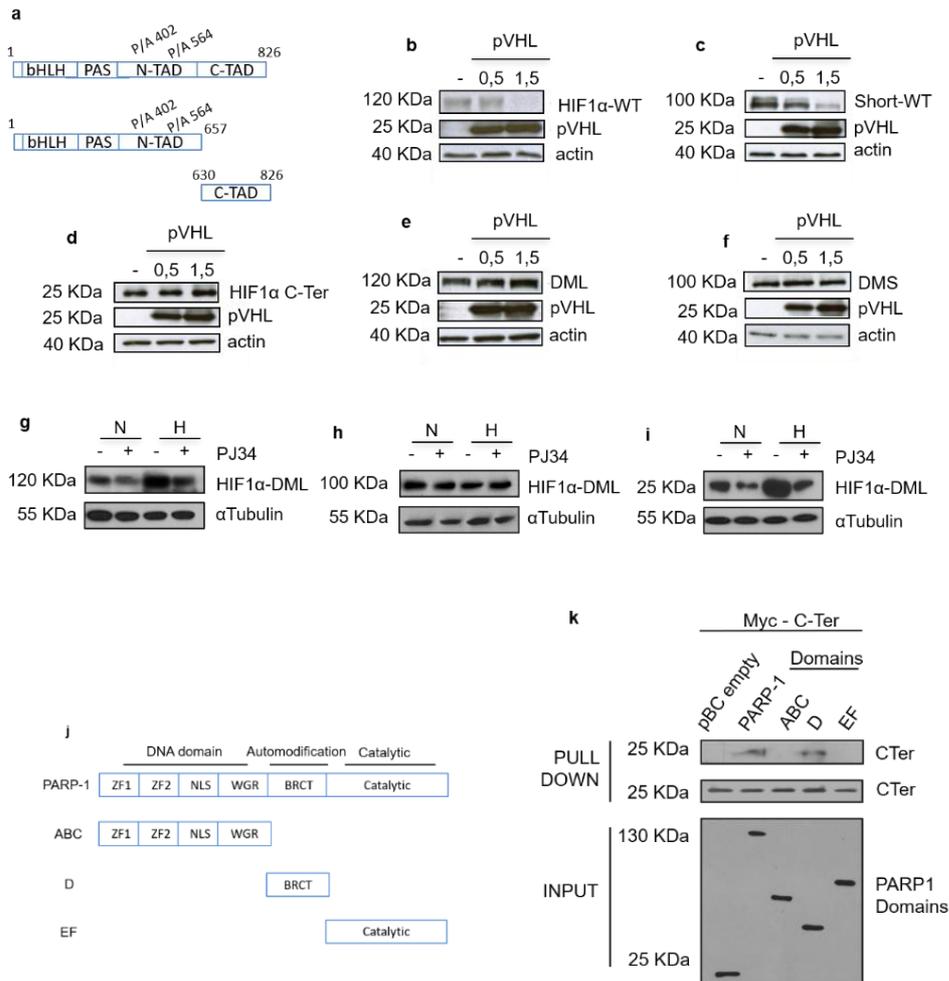
Para estudiar la interacción entre PARP-1 y HIF-1 $\alpha$  en normoxia e hipoxia, generamos un doble mutante para las regiones P402/546 reconocidas por las proteínas PHD, con ello conseguimos estabilizar y estudiar la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  en normoxia. Estas mutaciones se realizaron en dos plásmidos; el primero expresaba HIF-1 $\alpha$  completo (DML: 1-826 aminoácidos), mientras el segundo contenía un HIF-1 $\alpha$  truncado carente de C-terminal (DMS: 1-657 aminoácidos). Por otro lado, trabajamos con un tercer constructo que expresaba al C-terminal de HIF-1 $\alpha$  (C-ter: 630-826 aminoácidos), éste no fue mutado al carecer en su secuencia de estos dominios de reconocimiento por PHD (**Figura 3a**). Todos estos dominios se encuentran marcados con el péptido C-myc. Al sobreexpresar PVHL se observa como los dominios DML-WT y DMS-WT pierden su estabilidad, mientras el C-ter no se ve afectado (**Figura 3b, c y d**). Por otro lado, los DML y DMS mutantes se vuelven insensibles a esta sobreexpresión (**figuras 3e y f**).

Al expresar los dominios mutados y el C-ter, se puede observar cómo tras la inhibición de PARP, el DML y C-ter reducen su estabilidad tanto en normoxia como en hipoxia, permaneciendo el DMS inalterado (**Figura 3g-i**). Con ello concluimos que el dominio C-terminal de HIF-1 $\alpha$  (presente tanto en el dominio DML como el C-ter) es el responsable de mediar los cambios en la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  dependientes de la actividad de PARP-1.

A continuación, se coexpresa el dominio C-ter de HIF-1 $\alpha$  junto a diferentes dominios de PARP-1. Esto son; la proteína completa, el dominio de unión al ADN, el dominio de automodificación y el dominio catalítico. Todos ellos marcados con GST (**figura 3j**). Tras la coexpresión se realiza un ensayo pull-down con el que se observa cómo el dominio catalítico de PARP-1 es el que media la interacción con la región C-ter de HIF-1 $\alpha$  (**figura 3k**).



## RESULTADOS



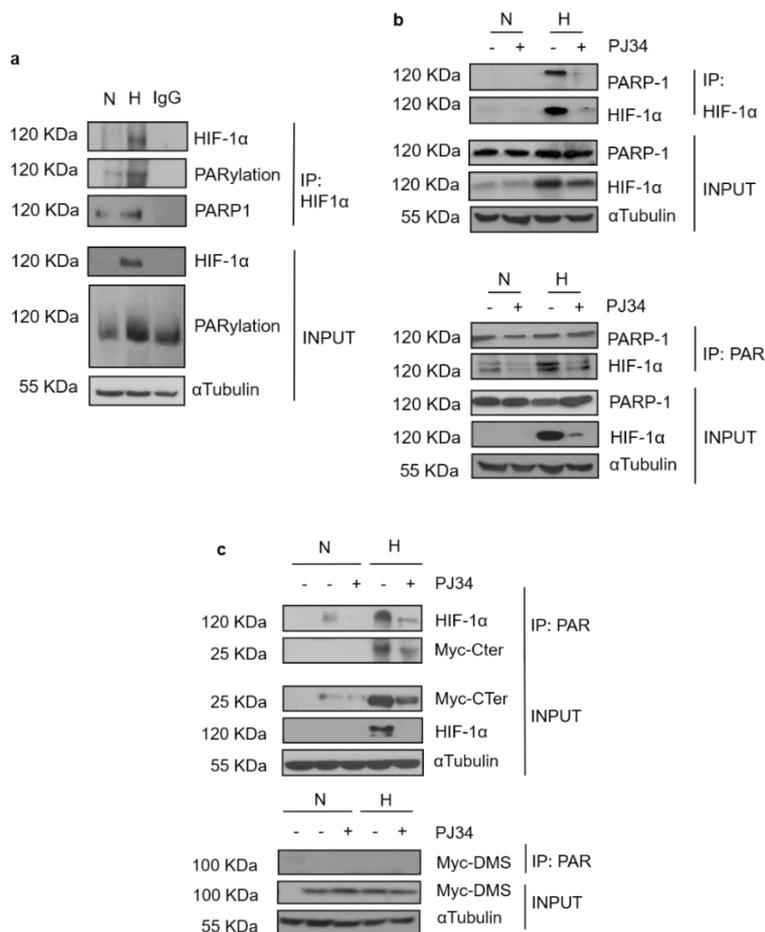
**Figura 3:** HIF-1 $\alpha$  interacciona en su dominio C-ter con PARP-1, ello regula su estabilidad. **a** Distintos constructos presentando la proteína completa de HIF-1 $\alpha$  (DML), la proteína carente del dominio C-ter (DMS), y el dominio C-ter por separado. **b-d** En células HEK293T, estudio de la estabilidad de los 3 constructos al aumentar la expresión de p-VHL. **e-f** En células HEK293T se lleva a cabo el mismo estudio de estabilidad, se realiza para los dominios DML y DMS mutados en las prolinas que median el reconocimiento por p-VHL. **g-i** Análisis del efecto de los inhibidores de PARP sobre los 3 dominios insensibles para p-VHL. En células HEK293T se sobreexpresan los dominios (DML, DMS y C-ter). Se



expusieron al inhibidor de PARP PJ34 a 10  $\mu$ M, 90 minutos pre-hipoxia. Y a continuación se compara su estabilidad en normoxia o hipoxia (1%O<sub>2</sub>, 4 horas). **j** Representación de los distintos dominios de PARP-1; proteína completa, dominio de unión al ADN, dominio de automodificación y dominio catalítico. **k** Pull-down en células COS en el que se expone a los distintos dominios de PARP-1 con el C-ter de HIF-1 $\alpha$ .

## HIF-1 $\alpha$ es modificado por poli(ADP-ribosa) en su C-terminal

Habiendo demostrado que PARP-1 y HIF-1 $\alpha$  interaccionan, el siguiente paso a seguir consistió en demostrar si esta interacción sucede en el contexto hipóxico y si conlleva una modificación postraduccional con poli(ADP-Ribosa). Realizando diferentes inmunoprecipitaciones confirmamos cómo, durante la hipoxia temprana, HIF-1 $\alpha$  y PARP-1 forman un complejo (**Figura 4a**) y cómo mediante el uso de inhibidores de PARP se pierde la interacción entre PARP-1 y HIF-1 $\alpha$ , evitándose la modificación por poli(ADP-ribosa) de HIF-1 $\alpha$  (**Figura 4b**). Por último, estudiamos la modificación por poli(ADP-ribosa) en células que sobreexpresan el dominio DMS y C-ter previamente descritos. Observamos como tanto el HIF-1 $\alpha$  endógeno como el dominio C-ter se modificaban por poli(ADP-ribosa) durante hipoxia, siendo esta modificación evitada durante la inhibición de PARP. El dominio DMS no presenta en ningún caso este tipo de modificación postraduccional (**Figura 4c**).



**Figura 4:** La interacción entre PARP-1 y el C-ter de HIF-1 $\alpha$  conduce a la PARilación del mismo. **a** Estudio de inmunoprecipitación de HIF-1 $\alpha$  en células HEK293T, las células se expusieron a normoxia e hipoxia (1%O<sub>2</sub>, 4 horas). **b** Ensayo de inmunoprecipitación de nuevo en células HEK293T. Las células fueron expuestas al inhibidor de PARP PJ34 a 10  $\mu$ M, 90 minutos pre-hipoxia. A continuación, la modificación postraduccional de HIF-1 $\alpha$  por poli(ADP-ribosa) fue evaluada en normoxia e hipoxia mediante inmunoprecipitaciones cruzadas frente a HIF-1 $\alpha$  y a poli(ADP-ribosa). **c** De nuevo en HEK293T, las células son tratadas con el inhibidor de PARP PJ34 a 10  $\mu$ M, 90 minutos pre-hipoxia en células que sobreexpresan el dominio DMS y C-ter de HIF-1 $\alpha$ . Las células fueron sometidas a normoxia e hipoxia (1%O<sub>2</sub>, 4 horas). A continuación, se estudia mediante una inmunoprecipitación de poli(ADP-ribosa) cómo se modifican estos dominios, así como el HIF-1 $\alpha$  endógeno de la célula.



## El C-ter de HIF-1 $\alpha$ presenta secuencias de aminoácidos sustrato de modificación por poli(ADP-ribosa)

Un estudio detallado de la región del C-ter nos permitió localizar dos regiones potencialmente modificables por poli(ADP-ribosa) (**Figura 5a**). Estas regiones se han descrito que presentan repeticiones de residuos de lisina y arginina [325]. En un plásmido codificante para HIF-1 $\alpha$  WT se procedió a mutar la primera región, la segunda, o se mutaron las dos simultáneamente. Los residuos de lisina y arginina fueron sustituidos por alaninas, aminoácidos no modificables por ADP-Ribosa.

Desafortunadamente, al sobreexpresar estos plásmidos en la célula se observa cómo las mutaciones en el C-terminal impiden la entrada de HIF-1 $\alpha$  en el núcleo (**Figura 5b**). Una exhaustiva búsqueda bibliográfica mostró que esas regiones del C-ter habían sido descritas como una secuencia para la localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) secundaria y bipartita [326].

Dada la imposibilidad de evaluar *in vivo* si estas regiones eran PARilables por PARP-1 (cuya localización es exclusivamente nuclear), decidimos realizar una serie de experimentos para evaluar la capacidad de HIF-1 $\alpha$  para modificarse por poli(ADP-ribosa) *in vitro*. En primer lugar, observamos como HIF-1 $\alpha$  purificado y expuesto a PARP-1 en presencia de coactivadores es modificado por poli(ADP-ribosa) (**Figura 5c**). En segundo lugar, las dos secuencias peptídicas del C-ter candidatas a ser modificadas fueron sintetizadas en su forma WT o mutadas a alaninas (**Figura 5d**). Los cuatro péptidos fueron sometidos a un ensayo de PARilación *in vitro*, que muestra cómo ambas secuencias WT (aunque más notablemente la segunda) se modifican por poli(ADP-ribosa), y cómo esta modificación desaparece en caso de mutar las secuencias a alaninas (**Figura 5e**).



a

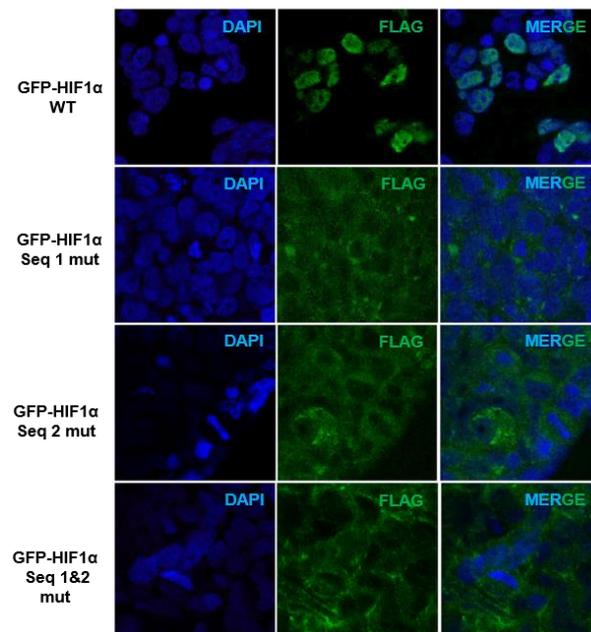
HIF1a C-Terminus aminoacids wild type

```
RMEDIKILIASPSPTHIHKETTSATSSPYRDTQSR  
TASPNRAGKGVIEQTEKSHPRSPNVLSVALSQR  
TTVPEEELNPKILALQNAQKRVKMEHDGSLFAV  
GIGTLLQQPDDHAATTSLSWKRVKGCKSSSEQN  
GMEQKTIILIPSDLACRLLGQSMDESGLPQLTSY  
DCEVNAPIQGSRNLLQGEELLRALDQVN
```

HIF1a C-Terminus aminoacids mutated.

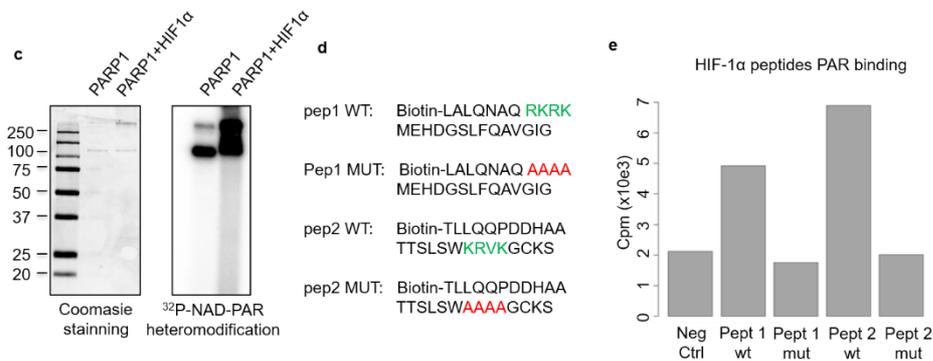
```
RMEDIKILIASPSPTHIHKETTSATSSPYRDTQSR  
TASPNRAGKGVIEQTEKSHPRSPNVLSVALSQR  
TTVPEEELNPKILALQNAQAAAAAMEHDGSLFAV  
GIGTLLQQPDDHAATTSLSWAAAAAGCKSSSEQN  
GMEQKTIILIPSDLACRLLGQSMDESGLPQLTSY  
DCEVNAPIQGSRNLLQGEELLRALDQVN
```

b





## RESULTADOS



**Figura 5:** **a** Secuencia de aminoácidos en el dominio C-ter de HIF-1 $\alpha$ . Localización de dos secuencias PARilables y sustitución de éstas por alaninas. **b** Ensayo de inmunofluorescencia en células HEK293T sometidas a hipoxia (1%O<sub>2</sub>, 4 horas). Se sobreexpresa la proteína HIF-1 $\alpha$  WT y HIF-1 $\alpha$  con la primera secuencia "PARilable" del C-ter mutada, con la segunda mutada, o con ambas mutadas. **c** Estudio de PARilación in vitro. HIF-1 $\alpha$  y PARP-1 son incubados en presencia de coactivadores (NAD<sup>+</sup>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> y ADN tratado con DNAsa I), la presencia de HIF-1 $\alpha$  modificado por poli(ADP-ribosa) es detectada a posteriori mediante autoradiografía. **d** Secuencia de 4 péptidos que se secuenciaron para continuar el estudio in vitro de la PARilación sobre el C-ter de HIF-1 $\alpha$ . Los péptidos presentan las dos secuencias WT y las dos secuencias mutadas en alaninas. **e** Los cuatro dominios fueron incubados con PARP-1 y coactivadores. A continuación, se realizó un conteo de la radiactividad asociada a cada condición (cpm) de los elementos radioactivos marcados (32P-PAR).

## La ausencia de PARP-1 altera el reclutamiento de HIF-1 $\alpha$ de manera dependiente de la función del gen diana.

Una vez evaluada en profundidad las características de las interacciones entre PARP-1 y HIF-1 $\alpha$ , pasamos a evaluar el reclutamiento de HIF-1 $\alpha$  a la cromatina durante hipoxia y cómo se altera durante la ausencia de PARP-1.

En primer lugar, utilizamos la tecnología CRISPR/Cas9 para obtener células PARP-1 knockout, evaluamos mediante western blot como estas células son incapaces de



inducir poli(ADP-ribosa) incluso tras la exposición a estrés oxidativo por  $H_2O_2$  (**Figura 6a**). Por otro lado, del mismo modo que con los inhibidores de la familia PARP o que con el silenciamiento transitorio de PARP-1, las células PARP-1 knockout presentan una acumulación reducida de HIF-1 $\alpha$  durante la hipoxia (**Figura 6b**).

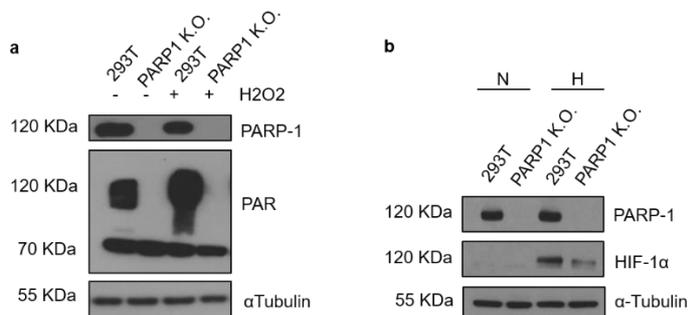
Para realizar un estudio global del reclutamiento de HIF-1 $\alpha$  a la cromatina realizamos un estudio ChIP-Seq durante hipoxia temprana (4 horas, 1% $O_2$ ) en células HEK293T WT y HEK293T PARP-1 knockout. El ChIP-Seq reveló una pérdida de reclutamiento de HIF-1 $\alpha$  durante hipoxia en ausencia de PARP-1. Mientras las células WT presentaron 123 puntos de reclutamiento a la cromatina, las PARP-1 knockout presentaron 68, lo que supone una reducción del 44,72%. Además, no se detectó la aparición de ninguna zona de unión nueva en las células PARP-1 knockout.

En un estudio similar realizado por Schödel et al [327] se localizaron 400 puntos de unión de HIF-1 $\alpha$  a la cromatina. El aumento de puntos de unión con respecto al observado en el presente estudio puede ser explicado por varios factores; por un lado el equipo de Schödel realizó este experimento en una línea celular diferente procedente de cáncer de mama (MCF7), además su situación de hipoxia era más agresiva, exponiendo a las células a un 0,5% de  $O_2$  durante 16 horas (frente a nuestro 1% de  $O_2$ , durante 4 horas).

Una vez observados los genes a los que HIF-1 $\alpha$  se recluta, decidimos agrupar a estos genes según sus funciones más relevantes descritas (**Figura 6c**). Sorprendentemente, observamos cómo la pérdida de reclutamiento de HIF-1 $\alpha$  al ADN no parece ser azarosa, pues existen funciones génicas muy conservadas (como las relacionadas con la glucólisis o la reparación del daño al ADN) mientras otras funciones prácticamente desaparecen (como es el caso de las relacionadas con la actividad mitocondrial o la migración celular) (**Figura 6d**).

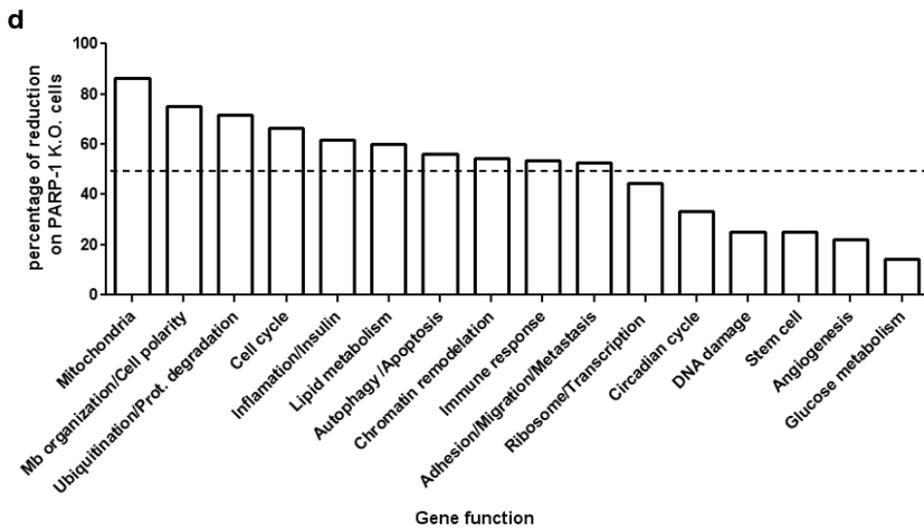
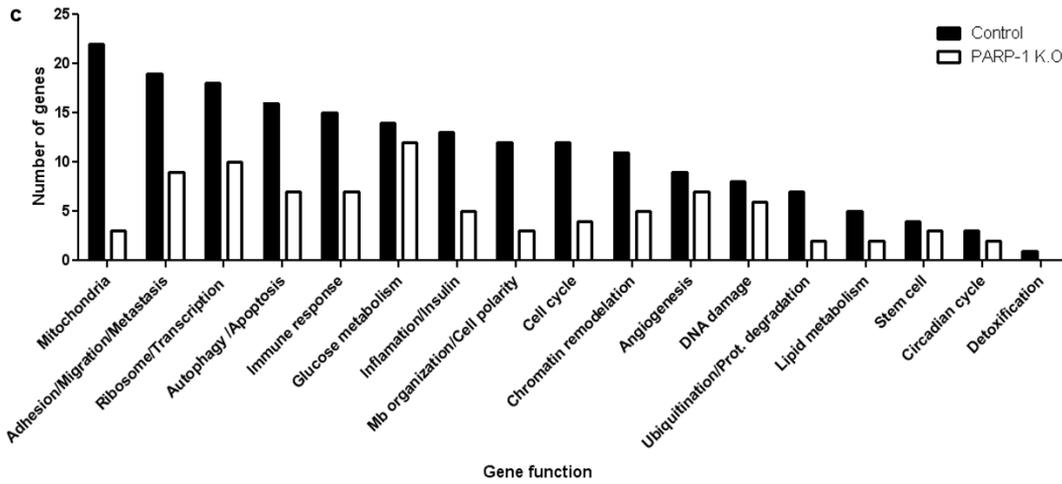


Al estudiar la expresión de genes de respuesta a hipoxia (medida como ARNm por qPCR) en el contexto de PARP-1 knockout esperaríamos (al igual que habíamos visto con los inhibidores) una caída en la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ , especialmente intensa para los genes en los que la localización de HIF-1 $\alpha$  se reduce. Sin embargo, este efecto parece ser incluso más amplio. Cuando realizamos PCRs cuantitativas observamos como todos los genes medidos caen en el contexto de PARP-1 knockout, ya sean genes en los que la unión de HIF-1 $\alpha$  disminuye, se mantiene, o incrementa (**Figura 6e**). Es por ello de esperar que el efecto global sea más amplio que el observado en el ChIP-Seq, dándose una pérdida generalizada de la transcripción en los genes de respuesta a hipoxia, ya que la sola presencia de HIF-1 $\alpha$  en sus genes diana no es suficiente para inducir la expresión de éstos cuando PARP-1 está ausente.



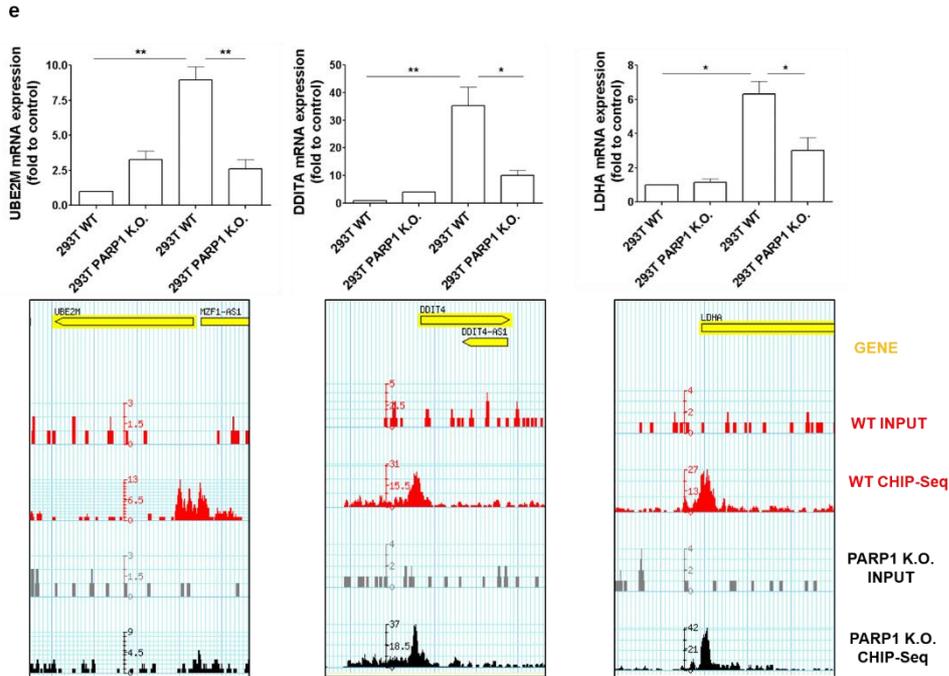


## RESULTADOS





## RESULTADOS



**Figura 6:** Estudio de ChIP-Seq para evaluar la capacidad de HIF-1 $\alpha$  para unirse a sus promotores en normoxia e hipoxia con PARP-1 presente o ausente. **a** Obtención de una línea celular PARP-1 knockout a partir de HEK293T mediante tecnología CRISPR/Cas9. Se evalúa por western blot la presencia de PARP-1 y la capacidad de la célula para acumular poli(ADP-ribosa) tras la exposición a peróxido de hidrógeno (600  $\mu$ M, durante 10 minutos). **b** Western blot mostrando la acumulación de HIF-1 $\alpha$  en células HEK293T WT o PARP-1 knockout sometidas a normoxia o a hipoxia (1%O<sub>2</sub>, 4 horas). **c** Análisis del estudio ChIP-Seq, mostrando (agrupados por función) los genes a los que HIF-1 $\alpha$  se asocia en las células HEK293T WT y PARP-1 knockout tras ser sometidos a hipoxia (1%O<sub>2</sub>, 4 horas). **d** Porcentaje de pérdida de reclutamiento de HIF-1 $\alpha$  a sus genes diana (agrupados por función). Se observa una pérdida desigual dependiendo de la actividad de los genes. **e** Comparación entre la unión a promotores detectada en la cromatina para varios genes diana de HIF-1 $\alpha$ , frente a la inducción de ARNm medida para los mismos genes (1%O<sub>2</sub>, 24 horas).



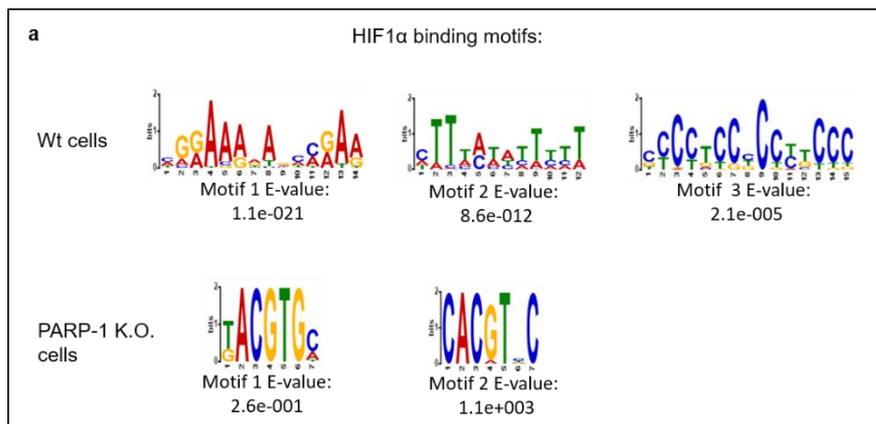
## La ausencia de PARP-1 reduce y altera el patrón de localización de HIF-1 $\alpha$ a la cromatina, especialmente en torno a los TSS.

Para entender el cambio de patrón de unión de HIF-1 $\alpha$  a la cromatina durante la ausencia de PARP-1, realizamos un análisis MEME [328] para comparar el tipo de secuencias a las que HIF-1 $\alpha$  se une durante hipoxia en las células WT frente a las PARP-1 knockout (**Figura 7a**). Se puede observar cómo la unión de HIF-1 $\alpha$  es altamente flexible en las células WT, uniéndose HIF-1 $\alpha$  a secuencias largas y variadas, mientras que en las células PARP-1 knockout esta localización se vuelve rígida y limitada, localizándose HIF-1 $\alpha$  en secuencias cortas que presentan la estructura conservada de los HRE (5'-RCGTG-3'). Es posible que aquellos genes que presenten este tipo de secuencias vean priorizado el reclutamiento de HIF-1 $\alpha$ , mientras que aquellos genes que presenten HREs no-canónicos la pierdan.

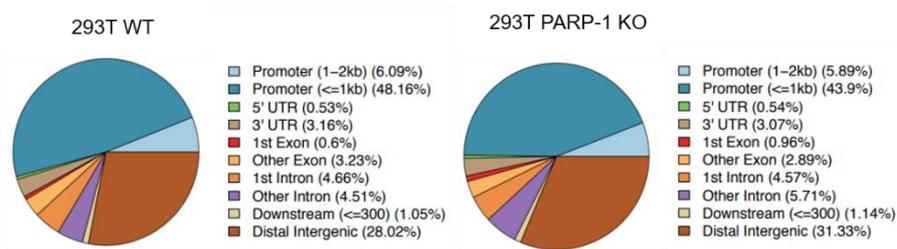
Realizamos un análisis más detallado para comparar los dos patrones de reclutamiento observados. En primer lugar, consideramos el reclutamiento de HIF-1 $\alpha$  teniendo en cuenta la arquitectura de los genes a los que se une (**Figura 7b**). Observamos cómo HIF-1 $\alpha$  se une mayoritariamente a las regiones promotoras de sus genes diana, y es precisamente en este área donde se observa la mayor pérdida de reclutamiento en las células PARP-1 knockout. Dado que sabemos que no se observan en ningún caso nuevos picos en las PARP-1 knockout, la reducción de la unión a las zonas promotoras genera un aumento de la representación en zonas distantes. Para confirmar este patrón de pérdida analizamos el porcentaje de reclutamiento de HIF-1 $\alpha$  a distintas distancias del TSS más próximo (**Figura 7c**). Podemos observar cómo la distribución de HIF-1 $\alpha$  no es homogénea a lo largo del genoma, sino que éste se concentra en las proximidades de los TSS (regiones promotoras). De nuevo observamos que es en esta zona donde se produce la mayor

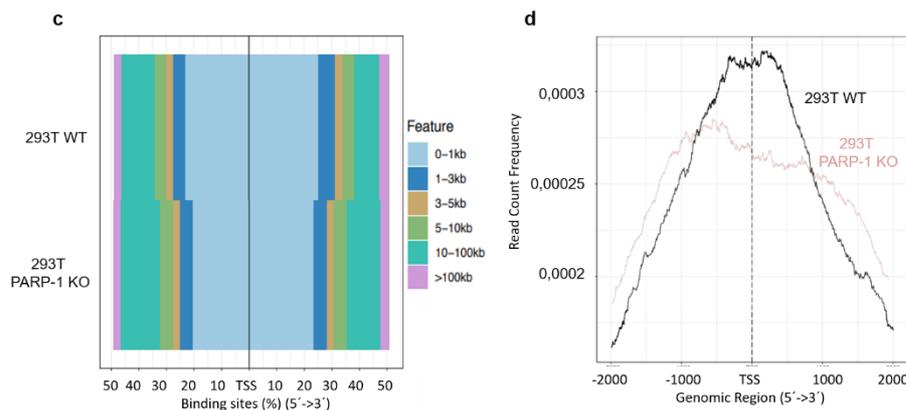


caída en el reclutamiento de HIF-1 $\alpha$  cuando PARP-1 está ausente. Por último estudiamos más a fondo la zona promotora, realizando un análisis de la frecuencia con la que HIF-1 $\alpha$  se localiza a 2 Kb entorno a los TSS (**Figura 7d**). Se observa una acumulación de HIF-1 $\alpha$  en torno a las 500 bases que rodean al TSS, esta acumulación de HIF-1 $\alpha$  rodeando al TSS se aplana notablemente para las células PARP-1 knockout.



**b**





**Figura 7:** **a** Análisis estadístico mediante MEME mostrando las secuencias de unión más frecuentes para HIF-1 $\alpha$  en las células HEK293T WT y PARP-1 knockout. **b** A partir del análisis del CHIP-Seq, gráficas mostrando el porcentaje de unión de HIF-1 $\alpha$  a distintas áreas de la arquitectura del gen durante la exposición a hipoxia (1%O<sub>2</sub>, 4 horas) en células HEK293T WT y PARP-1 knockout. **c** Estudio de los datos del CHIP-Seq mostrando la proporción de HIF-1 $\alpha$  unido a distintas zonas de la cromatina teniendo en cuenta la distancia (medida en Kb) con respecto al TSS más cercano. **d** Frecuencia de detección de HIF-1 $\alpha$  en la zona promotora (considerada como 2 Kb aguas arriba y abajo del TSS). Se compara el reclutamiento de HIF-1 $\alpha$  para las células HEK293T WT y PARP-1 knockout tras haber sido expuestas a hipoxia (1%O<sub>2</sub>, 4 horas).

## La inhibición/ ausencia de PARP-1 impactan el fitness celular durante hipoxia.

Una vez estudiado el rol de PARP-1 sobre diferentes aspectos de la biología de HIF-1 $\alpha$  (Interacción física, modificación postraduccional de la proteína, alteración de su capacidad de unión a la cromatina, reducción de su actividad transcripcional, etc.) decidimos medir el impacto que estas alteraciones pueden tener sobre la adaptación a un contexto tan demandante como es el hipóxico.

Para medir la adaptación celular a hipoxia, se ha considerado la capacidad de las células para consumir oxígeno y se ha evaluado el estado de la ruta glucolítica.



También hemos estudiado la capacidad proliferativa y migratoria celular. Por último, analizamos la integridad del genoma mediante la caracterización de distintos marcadores de la respuesta de daño al ADN y de estrés replicativo.

Comparamos el consumo de oxígeno en las células HEK293T WT y PARP-1 knockout durante normoxia e hipoxia temprana. Observamos cómo durante hipoxia las células HEK293T WT presentan una fuerte caída en el consumo de oxígeno. Sin embargo, en las células PARP-1 knockout esta caída es tan solo parcial, ello podría indicar una capacidad deficiente para cambiar hacia el metabolismo glucolítico y una dependencia del metabolismo energético mitocondrial, indeseado durante hipoxia (**Figura 8a**). Reforzando esta idea, el estudio de la glucólisis muestra cómo las células HEK293T WT disparan esta ruta metabólica durante hipoxia, mientras que las células PARP-1 knockout presentan una activación menor (**Figura 8b**).

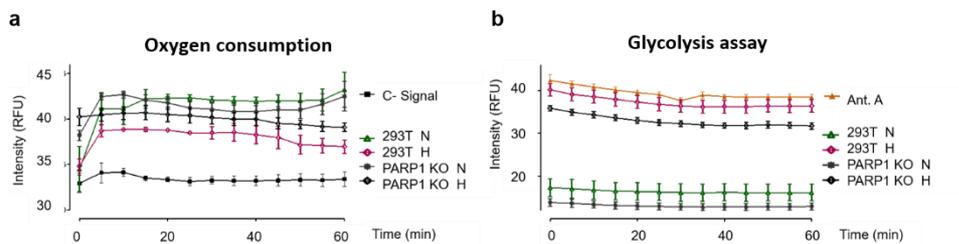
Para observar las posibles consecuencias derivadas de estas alteraciones metabólicas, se ha considerado la capacidad proliferativa y migratoria de las células expuestas a normoxia e hipoxia. Durante normoxia, el efecto de los inhibidores de PARP sobre la proliferación celular es más acusado en células WT que el observado en las células PARP-1 knockout, esto puede ser debido al hecho de que el olaparib actúa de forma global como inhibidor de toda la familia PARP. De forma basal, observamos durante hipoxia una bajada de la proliferación. En esta situación, tanto la inhibición de la familia PARP como la ausencia de PARP-1 bloquean completamente la proliferación. Ello muestra el importante rol que juega PARP-1 durante la adaptación a la hipoxia (**Figura 8c**).

A continuación, medimos la capacidad migratoria celular mediante un ensayo de cierre de herida. La movilidad celular se ve reducida durante normoxia tanto durante el tratamiento con olaparib como en las PARP-1 knockout. Durante hipoxia este efecto se ve ampliado, llegando a apreciarse incluso un aumento del tamaño de la herida cuando PARP-1 no está activa/presente (**Figura 8d**). Estos resultados



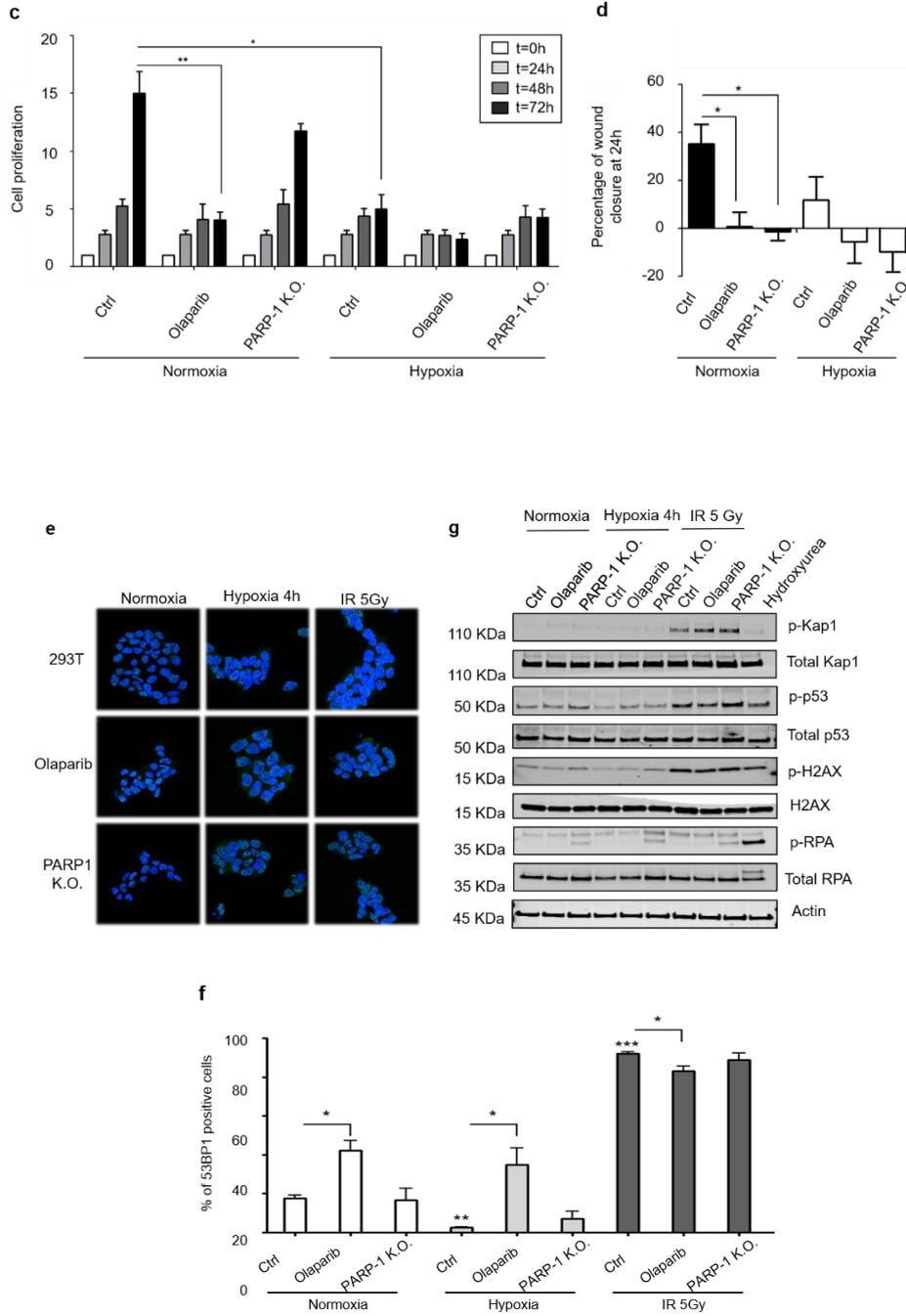
muestran la relevancia de la actividad de PARP-1 para los procesos de migración y proliferación, siendo su pérdida especialmente severa durante la adaptación a la hipoxia.

Para concluir, quisimos evaluar el estado de la integridad genómica en estas células. Previamente se ha descrito que en situaciones cercanas a la anoxia (<0,1% de O<sub>2</sub>) se activa la respuesta de daño al ADN, además de generarse estrés replicativo y acumulación de p-RPA [329][330][331]. Evaluamos el estado de la respuesta de daño al ADN mediante la acumulación de 53BP1 y encontramos que a pesar de la activación de PARP-1 observada durante hipoxia, la acumulación de 53BP1 parece estar disminuida. Sí se observa un aumento inducido por los tratamientos con olaparib (**Figura 8e-f**). Habiéndose descrito ya este efecto en el pasado [332][333]. Para medir más ampliamente esta respuesta a daño en el ADN se midieron otros marcadores de daño o de estrés replicativo. Ninguno de ellos experimenta un incremento significativo durante la hipoxia temprana. (**Figura 8g**).





## RESULTADOS



**Figura 8:** Evaluación del impacto de la inhibición o ausencia de PARP-1 sobre el fitness celular. **a** Estudio del consumo de oxígeno en células HEK293T WT y PARP-1 knockout expuestas a normoxia



e hipoxia (1%O<sub>2</sub>, durante 4 horas). Mediante espectroscopía de fluorescencia se obtienen mediciones durante 60 minutos. **b** Estudio de la ruta glucolítica a través de la acidificación del citoplasma. De nuevo las células HEK293T WT y PARP-1 knockout fueron sometidas a normoxia e hipoxia (1%O<sub>2</sub>, durante 4 horas). Mediante emisión de fluorescencia se evaluó durante 60 minutos la actividad de esta ruta. **c** Estudio de la proliferación celular a diferentes tiempos de normoxia e hipoxia. Se utilizaron células PARP-1 knockout así como HEK293T WT tratadas y sin tratar con el inhibidor de PARP olaparib (5 μM, 90 minutos pre-hipoxia). **d** Ensayo de cierre de herida para el estudio de la movilidad celular. Se utilizaron células PARP-1 knockout así como HEK293T WT tratadas y sin tratar con el inhibidor de PARP olaparib a 5 μM, 90 minutos pre-hipoxia. Las células fueron sembradas, al día siguiente se realizó una incisión y se evaluó el porcentaje de cierre pasadas 24 horas. **e-f** Inmunofluorescencia mostrando la acumulación de foci de 53BP1. Se consideraron positivas aquellas células que presentaron 5 o más foci por núcleo. Se utilizaron condiciones de irradiación (5 Gy) como control positivo y el olaparib se aplicó de nuevo a 5 μM, 90 minutos pre-hipoxia. **g** Distintos marcadores de la ruta de respuesta de daño al ADN y de respuesta al estrés replicativo fueron evaluados en normoxia e hipoxia (1%O<sub>2</sub>, 4 horas). Se utilizaron condiciones de irradiación (5 Gy) e hidroxiurea (2 mM, 120 minutos) como controles positivos para el daño al ADN y estrés replicativo respectivamente.

## El estudio clínico de la inhibición de PARP-1 en eventos relacionados con la hipoxia.

Para concluir esta Tesis, consideramos relevante resaltar cómo hoy en día el uso de los inhibidores de PARP se encuentra en una fase expansiva, actualmente hay numerosos estudios clínicos en los que se está explorando el efecto beneficioso de utilizar inhibidores de PARP como tratamientos secundarios o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos (como paclitaxel, gentamicina, carboplatino, o hidroxiquina entre otros) para distintos tipos de cáncer (**Tabla 1**). Si nos centramos en la combinación de inhibidores de PARP con inhibidores de la hipoxia, hemos de recordar cómo actualmente carecemos de inhibidores clínicos para la respuesta a hipoxia *per se*. Sin embargo, sí existen inhibidores para fenómenos secundarios relacionados con la limitación de oxígeno, siendo un ejemplo la



inducción de angiogénesis. En este contexto, existen diferentes ensayos clínicos avanzados que están estudiando cómo la combinación de inhibidores de PARP con inhibidores aprobados para la inducción de angiogénesis (como bevacizumab, cediranib o apatinib entre otros) podrían potenciar el dismantelamiento de la adaptación a la hipoxia (**Tabla 2**).



**Tabla 1.** Ensayos clínicos en fase avanzada combinando inhibidores de PARP con diferentes terapias clásicas.

Estado	Título del estudio	Condiciones	Tratamientos	Fase	Reclutados	Número NTC
Activo No reclutando	A Phase 3 Randomized, Placebo-controlled Trial of Carboplatin and Paclitaxel With or Without Veliparib (ABT-888) in HER2-negative Metastatic or Locally Advanced Unresectable BRCA-associated Breast Cancer	Cáncer de mama metastásico	Paclitaxel, veliparib, carboplatino, placebo	ase 3	513	NCT02163694
Activo No reclutando	Veliparib With Carboplatin and Paclitaxel and as Continuation Maintenance Therapy in Subjects With Newly Diagnosed Stage III or IV, High-grade Serous, Epithelial Ovarian, Fallopian Tube, or Primary Peritoneal Cancer	Cáncer de ovario Neoplasma de ovario	Paclitaxel, veliparib, carboplatino, placebo	Fase 3	1140	NCT02470585
Activo No reclutando (Tiene resultados)	Olaparib Treatment in BRCA Mutated Ovarian Cancer Patients After Complete or Partial Response to Platinum Chemotherapy	Cáncer de ovario BRCA mutado sensible a Platino tras una respuesta completa o parcial a Platino	Olaparib 300mg Placebo en paralelo	Fase 3	327	NCT01874353
Activo No reclutando	A Phase III Trial of Niraparib Versus Physician's Choice in HER2 Negative, Germline BRCA Mutation-positive Breast Cancer Patients	Cáncer de mama Factor 2 Neg. Mutados para BRCA 1 & 2	Niraparib Otras a elección del médico	Fase 3	306	NCT01905592
Activo No reclutando	A Study of Niraparib Maintenance Treatment in Patients With Advanced Ovarian Cancer Following Response on Front-Line Platinum-Based Chemotherapy	Cáncer de ovario	Niraparib Placebo	Fase 3	620	NCT02655016
Activo No reclutando (Tiene resultados)	A Study of Rucaparib as Switch Maintenance Following Platinum-Based Chemotherapy in Patients With Platinum-Sensitive, High-Grade Serous or Endometrioid Epithelial Ovarian, Primary Peritoneal or Fallopian Tube Cancer	Cáncer de ovario Cáncer de trompa de Falopio Cáncer de peritoneo	Rucaparib Placebo	Fase 3	564	NCT01948213
Activo No reclutando (Tiene resultados)	Assessment of the Efficacy and Safety of Olaparib Monotherapy Versus Physicians Choice Chemotherapy in the Treatment of Metastatic Breast Cancer Patients With Germline BRCA1/2	Cáncer de mama metastásico BRCA mut 1& 2	Olaparib Otras a elección del médico	Fase 3	302	NCT02000622



Tabla 1. Ensayos clínicos en fase avanzada combinando inhibidores de PARP con diferentes terapias clásicas.

Estado	Título del estudio	Condiciones	Tratamientos	Fase	Reclutados	Número NTC
Activo No reclutando	A Phase 3 Randomized, Placebo-controlled Trial of Carboplatin and Paclitaxel With or Without Veliparib (ABT-888) in HER2-negative Metastatic or Locally Advanced Unresectable BRCA-associated Breast Cancer	Cáncer de mama metastásico	Paclitaxel, veliparib, carboplatino, placebo	Fase 3	513	NCT02163694
Activo No reclutando	Veliparib With Carboplatin and Paclitaxel and as Continuation Maintenance Therapy in Subjects With Newly Diagnosed Stage III or IV, High-grade Serous, Epithelial Ovarian, Fallopian Tube, or Primary Peritoneal Cancer	Cáncer de ovario Neoplasma de ovario	Paclitaxel, veliparib, carboplatino, placebo	Fase 3	1140	NCT02470585
Activo No reclutando (Tiene resultados)	Olaparib Treatment in BRCA Mutated Ovarian Cancer Patients After Complete or Partial Response to Platinum Chemotherapy	Cáncer de ovario BRCA mutado sensible a Platino tras una respuesta completa o parcial a Platino	Olaparib 300mg Placebo en paralelo	Fase 3	327	NCT01874353
Activo No reclutando	A Phase III Trial of Niraparib Versus Physician's Choice in HER2 Negative, Germline BRCA Mutation-positive Breast Cancer Patients	Cáncer de mama Factor 2 Neg. Mutados para BRCA 1 & 2	Niraparib Otras a elección del médico	Fase 3	306	NCT01905592
Activo No reclutando	A Study of Niraparib Maintenance Treatment in Patients With Advanced Ovarian Cancer Following Response on Front-Line Platinum-Based Chemotherapy	Cáncer de ovario	Niraparib Placebo	Fase 3	620	NCT02655016
Activo No reclutando (Tiene resultados)	A Study of Rucaparib as Switch Maintenance Following Platinum-Based Chemotherapy in Patients With Platinum-Sensitive, High-Grade Serous or Endometrioid Epithelial Ovarian, Primary Peritoneal or Fallopian Tube Cancer	Cáncer de ovario Cáncer de trompa de Falopio Cáncer de peritoneo	Rucaparib Placebo	Fase 3	564	NCT01968213
Activo No reclutando (Tiene resultados)	Assessment of the Efficacy and Safety of Olaparib Monotherapy Versus Physicians Choice Chemotherapy in the Treatment of Metastatic Breast Cancer Patients With Germline BRCA1/2	Cáncer de mama metastático BRCA mut 1 & 2	Olaparib Otras a elección del médico	Fase 3	302	NCT02000622





## Discusión.

Las rutas de supervivencia celular son fundamentales para la homeostasis de los organismos multicelulares. Estas rutas permiten responder a situaciones de daño al ADN, hipoxia, limitación de nutrientes, o acidosis. Estas respuestas han de promover la adaptación y supervivencia de las células sin que ello reduzca la supervivencia del individuo. Por ello, estas rutas están estrechamente supeditadas al control de las redes de convivencia multicelular, que garantizan que la supervivencia celular no haga peligrar la supervivencia del grupo.

Sin embargo, la alta mutagénesis presente durante el proceso tumoral acaba perturbando las rutas de vigilancia multicelular. Como consecuencia, aumenta la libre expresión de estas redes de supervivencia unicelular, permitiendo un crecimiento descontrolado y agresivo de las células mutadas, que pasarán a invadir tejidos cercanos y hasta órganos distantes, afectando a su función y llegando a producir la muerte del individuo.

Tanto la exposición a daño en el ADN como a bajas concentraciones de oxígeno, han sido desafíos frecuentes que han acompañado a los organismos desde hace millones de años. Es por ello que dos de las redes fundamentales relacionadas con la supervivencia unicelular son la respuesta a daño al ADN y a las situaciones de hipoxia, siendo ambas rutas puestas al servicio de la malignización durante el desarrollo tumoral. En el presente trabajo estudiamos la relación existente entre ambas rutas. Para ello analizamos a dos de sus reguladores principales; PARP-1 y HIF-1 $\alpha$ . Demostramos cómo la interacción de ambos miembros sucede a múltiples niveles; afectando a la estabilidad de HIF-1 $\alpha$ , a su reclutamiento a la cromatina y a su capacidad para inducir la transcripción génica. Como consecuencia, la adaptación a la hipoxia requerirá de una correcta expresión y actividad de PARP-1.



En el presente trabajo demostramos la existencia de una correlación existente entre la expresión de PARP-1 y HIF-1 $\alpha$ . Ésta se observa en distintos tumores, tanto a nivel del ARNm (datos de cBioportal) como a nivel de proteína (datos del microarray de melanoma). Además, la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  presenta una dependencia sobre la actividad de PARP-1 que se observa en distintos tipos de cultivos celulares tumorales.

A continuación, demostramos cómo durante la hipoxia temprana existe una producción de especies reactivas de oxígeno. En respuesta a la misma se genera una activación de PARP-1, la cuál es requerida para mantener la óptima estabilidad de HIF-1 $\alpha$ . Inhibir la producción de ROS o la actividad de PARP, conduce a la pérdida de acumulación de HIF-1 $\alpha$  y a la reducción de su capacidad para inducir la expresión de sus genes diana.

En el presente trabajo evidenciamos la existencia de una interacción física entre PARP-1 y HIF-1 $\alpha$ , y como ésta conduce a la modificación por polímero de HIF-1 $\alpha$  en al menos dos regiones de su dominio C-ter. Del mismo modo, PARP-1 se muestra necesario para mantener una configuración de la cromatina accesible para HIF-1 $\alpha$ . Es por ello que durante la ausencia o inhibición de PARP-1 se genera un doble desafío para la respuesta a hipoxia: por un lado se reduce la estabilidad de HIF-1 $\alpha$ , ello tiene un impacto al reducir el número de moléculas disponibles para realizar su actividad transcripcional, por otro lado la ausencia de PARP-1 promueve una condensación de la cromatina, dificultando aún más la ya maltrecha capacidad de la célula para inducir la respuesta a hipoxia.

Las especies reactivas de oxígeno son una familia de moléculas que se han descrito como fundamentales a la hora de comprender el proceso de respuesta a hipoxia. Durante hipoxia se produce un enlentecimiento de la cadena transportadora de electrones (ETC); ello genera un disparo en la producción de ROS mitocondriales [334] siendo estos ROS un riesgo para la supervivencia e integridad celular. Es por



ello que la actividad mitocondrial es inhibida y la célula vira hacia un metabolismo glucolítico a través del conocido como efecto Warburg [335][336]. Por otro lado, la producción de ROS se ha vinculado a la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  no sólo durante hipoxia [337] sino también en normoxia [338][339]. Existe controversia sin embargo a la hora de determinar de qué manera los ROS median este control sobre la estabilidad de HIF-1 $\alpha$ . Se ha propuesto desde la existencia de una inhibición de las PHD mediada por ROS [340][341], hasta una ruta mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [342]. En nuestro trabajo señalamos un nuevo mecanismo, mediante el cual la producción de ROS puede actuar como molécula señalizadora aumentando la actividad de PARP-1.

La activación de la respuesta de daños al ADN (DDR, por sus siglas en inglés) en el contexto hipóxico presenta peculiaridades debido a la represión de parte de la maquinaria de reparación en ausencia de oxígeno [343]. En el contexto hipóxico se da una represión de la actividad transcripcional, consecuencia de la compactación de la cromatina [344]. Es conocido además que las células tumorales presentan mecanismos de reparación fallidos, ello aumenta la tasa de mutación y la inestabilidad cromosómica [345][330]. En este contexto, la combinación de DDR e hipoxia es poco comprendida y parece ser oxígeno dependiente: La hipoxia severa (<0.2% O<sub>2</sub>) causa parada de ciclo en la fase S, acumulación de  $\gamma$ -H2AX, P53 y activación de ATR. Por otro lado, la hipoxia moderada (1-3% O<sub>2</sub>) se ha descrito genera estrés replicativo y activación de la DDR sin ser detectado daño al ADN [346]. Éste es precisamente el contexto de nuestro trabajo, los ROS generados durante la hipoxia pueden activar a ciertos miembros de la DDR como PARP-1, que en un contexto carente de daño al ADN se activa, colaborando con la correcta adaptación a la hipoxia al estabilizar a HIF-1 $\alpha$ , a la vez que garantiza una mejor accesibilidad a la cromatina para optimizar la transcripción.



Consideramos de gran interés los resultados obtenidos en el ChIP-Seq. Por un lado, es llamativa la pérdida de reclutamiento de HIF-1 $\alpha$  de una manera selectiva según la función del gen. Por otro lado, es relevante la ausencia de expresión en aquellos genes en los que HIF-1 $\alpha$  consigue reclutarse en ausencia de PARP-1. Estos resultados nos empujan a investigar el papel que PARP-1 puede jugar en la configuración del ADN durante hipoxia. Para ello consideramos imprescindible comprender los cambios observados en la cromatina durante la inducción de hipoxia en presencia o ausencia de PARP-1.

Como hemos indicado anteriormente, en el contexto hipóxico se da una condensación del ADN y un descenso global en la transcripción[347]. Ello busca un descenso en el consumo de ATP y una protección de la cromatina frente al estrés oxidativo. Sin embargo, durante este escenario represivo se ha de generar la inducción de genes de respuesta a hipoxia, necesarios para la adaptación y supervivencia celular. La activación de esta ruta en un contexto transcripcionalmente inhibido requiere de la intervención de mecanismos que van más allá de la simple estabilización de HIF $\alpha$ .

La compactación y heterocromatización del ADN observada durante hipoxia se ha descrito como reversible tras la reoxigenación [348]. El patrón de metilaciones en histonas se modifica y aumenta, induciéndose la represión génica vía acumulación de H3K27me3 y H3K9me3 [349][350][351]. Del mismo modo, durante hipoxia se observa una hipermetilación represiva en el ADN, especialmente en torno a los TSS de las zonas promotoras. Estas metilaciones promueven una represión y silenciamiento génico [352].

Este aumento global de la metilación en ADN e histonas es consecuencia de que gran cantidad de proteínas demetilasas requieran oxígeno para realizar su actividad. Este es el caso de las histonas demetilasas de la familia de las jmjC desmetilasas (HIF hidroxilasas, PHDs y FIH) [353][354][355][356]. De igual manera,



las demetilinas del ADN como la familia TET, requieren de oxígeno para mediar su actividad [357][358]. En este contexto hipermetilado, HIF-1 $\alpha$  requiere de la presencia de coactivadores como las histonas acetiltransferasas p300, PCAF o TIP60 [249][250]. Estas proteínas modifican a las histonas eliminando sus cargas positivas, relajando su unión al ADN y facilitando el reclutamiento de HIF-1 $\alpha$  a sus promotores.

Con respecto al rol que PARP-1 puede tener en este contexto, es importante remarcar el creciente número de publicaciones que implican a PARP-1 en otras funciones celulares, independientes de la respuesta de daño al ADN. Es de especial relevancia la implicación que PARP-1 tiene en procesos como el remodelado de la cromatina, la transcripción, y regulación del metabolismo del ARN.

PARP-1 ha sido descrito como un coactivador de la actividad transcripcional y un mediador de la transición de heterocromatina a eucromatina, facilitando el relajamiento prolongado de la cromatina [359]. PARP-1 suele localizarse a menos de 1 Kb alrededor del TSS de genes activos [360] y ha sido descrito como un “marcapáginas genético”, localizando en los promotores de los genes que habrán de expresarse en las células hijas tras la división celular [361]. En el mismo sentido, PARP-1 y PAR se ha visto se acumulan en genes activos, excluyéndose con modificadores represivos como la ADN metilasa DNMT1 [362][363][364] y la H3K4 demetilasa KDM5B [365]. Al mismo tiempo, PARP-1 recluta, retiene, e incluso modifica por polímero a activadores de la transcripción como la ADN demetilasa TET1 [366][367], polimerasas de ARN [368], e histona acetiltransferasas como la p300 y TIP60 [369][370][371]. Todos estos cambios actúan generando una configuración activadora de la cromatina, los promotores se mantienen demetilados, mientras TET1, Pol2, H3K4me3 y factores de transcripción son reclutados a los TSS [372]. Durante la inhibición de PARP-1 sin embargo, se observa



una hipermetilación represora en el ADN. Esta metilación no es homogénea a lo largo del genoma, sino que se concentra alrededor de las regiones TSS [360].

Además de mediar cambios epigenéticos, PARP-1 ha sido implicada en la actividad transcripcional *per se*, PARP-1 interacciona con la maquinaria transcripcional llegando a modificar por polímero a alguno de sus miembros [373][374], PARP-1 contribuye a la formación del “complejo pre-iniciador de la transcripción” o PIC [375]. Además, PARP-1 afecta al metabolismo del ARN, modifica la velocidad de elongación del ARN y procesos de splicing [376], colabora en la síntesis de la cola de poliA [377] y facilita el exporte del ARN al citoplasma [378].

Así pues, teniendo en cuenta el rol facilitador de PARP-1 en la transcripción, podemos entender mejor el impacto que parece tener su ausencia durante hipoxia. Consideramos que en un contexto transcripcionalmente represivo, la ausencia de PARP-1 genera un doble problema para la adaptación a la hipoxia: Por un lado reduce la estabilidad de HIF-1 $\alpha$ , dejando un menor número de moléculas libres para realizar su actividad. Por otro lado, la ausencia de PARP-1 promueve una conformación aún más represiva de la cromatina, aumentando la condensación y heterocromatización del ADN. Previamente se ha descrito cómo PARP-1 localiza mayoritariamente 1 Kb en torno a los TSS y cómo su ausencia se liga a la hipermetilación de los promotores; no es por ello sorprendente el observar cómo en ausencia de PARP-1, HIF-1 $\alpha$  pierde mayoritariamente su unión al ADN en esta misma región.

El estudio MEME nos muestra cómo la capacidad de HIF-1 $\alpha$  para unirse al ADN se reduce de manera significativa en ausencia de PARP-1. HIF-1 $\alpha$  pasa de localizarse en largas y variadas secuencias a limitarse únicamente a sus más reconocidas zonas de unión, denominadas HREs. En el análisis MEME, es importante destacar que mientras que las secuencias en las células WT presentan significancia estadística (E valor  $\leq 0.01$ ), lo mismo no sucede en las secuencias obtenidas en las células KO. Esta



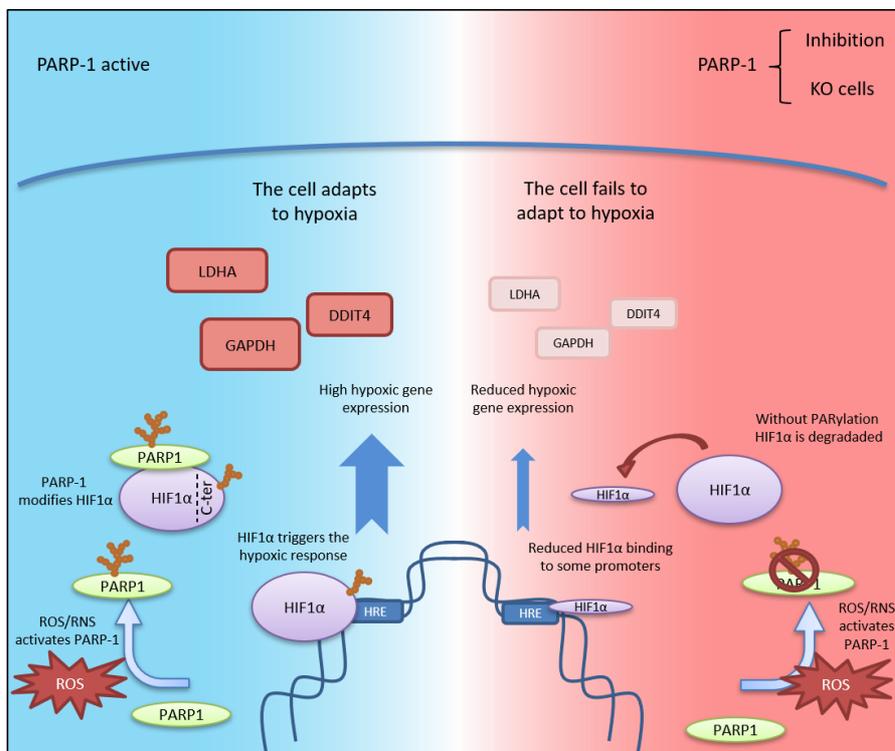
situación no es infrecuente en los análisis MEME, donde los E valores han sido descritos como muy conservadores. Esta situación se da especialmente cuando la cantidad de información es reducida (como es nuestro caso en las células KO, debido a caída en la unión de HIF-1 $\alpha$ ). Diferentes estudios han señalado que en este contexto se pueden rechazar secuencias con una funcionalidad y relevancia biológica real [379][380]. Consideramos este nuestro caso, nos resulta difícil ignorar que las secuencias obtenidas en las células KO son las secuencias más reconocidas como lugar de unión para HIF-1 $\alpha$ .

Más allá de la limitación de HIF-1 $\alpha$  para unirse al ADN, es relevante señalar cómo incluso cuando HIF-1 $\alpha$  consigue unirse a sus promotores en las células KO, ello no conduce a la expresión de los genes de respuesta a hipoxia. El hecho de que la unión de HIF-1 $\alpha$  no sea suficiente para inducir la respuesta a hipoxia nos muestra hasta qué punto la presencia de PARP-1 puede ser relevante, jugando un papel induciendo la relajación de la cromatina, demetilación del ADN, reclutando coactivadores, o incluso facilitando la maduración del ARN.

Como consecuencia, con PARP-1 ausente o inhibido la célula presenta una respuesta a la hipoxia deficiente, se alteran las adaptaciones metabólicas requeridas (relacionadas con el consumo de oxígeno y el paso al metabolismo glucolítico) y con ello se reducen procesos tan importantes para la progresión tumoral como son la proliferación o la capacidad de migración. De esta manera nuestro trabajo señala una potencial utilidad clínica. Desde un punto de vista clínico es de sobra conocido cómo la activación de la respuesta a hipoxia tiene un pronóstico negativo en el cáncer. Esta adaptación afecta a múltiples aspectos de la biología del tumor, como la angiogénesis, inducción de la glucólisis, incremento de la movilidad celular o potenciando la formación de metástasis entre otros eventos. Todo ello incrementa la supervivencia y agresividad tumoral. Es por ello por lo que el control de la adaptación del tumor al microambiente hipóxico es un reto



fundamental que aún escapa el control de las terapias en oncología. En nuestro trabajo ponemos de manifiesto cómo PARP-1 tiene un profundo impacto sobre la respuesta a hipoxia al regular estrechamente la estabilidad y actividad de HIF-1 $\alpha$ . Con ello, señalamos la potencial utilidad que los inhibidores de PARP (ya en uso en la clínica) podrían tener impactando la respuesta a hipoxia dado que como indicamos en la introducción, a pesar de ser uno de los principales factores relacionados con la malignización, aún carece de inhibidores clínicos específicos.



Esquema de la activación de respuesta a hipoxia con PARP-1 activo o inhibido/ausente. Durante hipoxia la producción de ROS activa la síntesis de poli(ADP-ribosa) vía PARP-1. HIF-1 $\alpha$  se modifica por



## DISCUSIÓN

---

poli(ADP-ribosa) en su C-ter, ello contribuye a su estabilidad. HIF-1 $\alpha$  se acumula, se une a sus promotores e induce la expresión de genes necesarios para la adaptación a la hipoxia. En contextos sin PARP-1, HIF-1 $\alpha$  no se modifica por poli(ADP-ribosa), no se estabiliza y con ello se afecta su unión al ADN e inducción de genes de respuesta a hipoxia. Como consecuencia, la célula estará peor adaptada a la hipoxia.

A graphic of a DNA double helix, rendered in red and blue, framing the word "CONCLUSIONS". The helix is shown in a perspective view, curving around the text.

CONCLUSIONS



## Conclusions

1. During hypoxia there is an induction of ROS concomitant with an increases PARP-1 activity.
2. The activity of PARP-1 modulates the stability and transcriptional activity of HIF-1 $\alpha$  during hypoxia.
3. The interaction between PARP-1 and HIF-1 $\alpha$  generates a modification with poly(ADP-Ribose) on the c-terminus domain of HIF-1 $\alpha$ .
4. In the absence of PARP-1, HIF-1 $\alpha$  reduces its binding to the DNA in a gene function-dependent manner. This loss occurs mainly 1Kb around the promoter areas. Even when HIF-1 $\alpha$  binds to these promoters, the induction of the genes is not triggered.
5. The inhibition/absence of PARP-1 reduces cellular fitness during the hypoxic adaptation.
6. PARP inhibitors might be used as anti-tumor agents to potentiate antiangiogenic agents as well as to prevent tumor adaptation to hypoxia.

A decorative graphic of a DNA double helix, rendered in red and blue, framing the word "ABREVIACIONES" in the center.

ABREVIACIONES



## Abreviaturas

36B4	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
53BP1	p53 binding protein 1
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Protein kinase B, PKB
AMP	Adenosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANGPT2	Angiopoietin Like 4
AP1	Activator protein 1
ARN	Ácido Ribonucleico
ATF1	Activating Transcription Factor 1
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated protein kinase
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BAL	B-aggressive lymphoma family proteins
BHLH	basic helix-loop-helix structural motif
BRCA1&2	BRCA1 C Terminus domain
BRCT	BReast CAncer gene 1 & 2
BRG1	Brahma-related gene 1
CAIX	Carbonic Anhydrase 9
CAXII	Carbonic Anhydrase 12
CBP	CREB-binding protein
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
Ch-IP Seq	Chromatin immunoprecipitation
CO2	Dióxido de carbono
CREB1	Cyclic-AMP Responsive Element Binding Protein 1
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CSC	Cancer stem cells
CTE	Cadena transportadora de electrones
C-TER	C-terminus domain
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCFDA	2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate
DDIT4	DNA Damage Inducible Transcript 4
DDR	DNA damage response



DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DML	HIF-1 $\alpha$ long domain
DMS	HIF-1 $\alpha$ short domain
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
DSB	DNA double-strand break
EBV	Epstein-Barr Virus
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1&2
FANCA	FA Complementation Group A protein
FANCC	FA Complementation Group C protein
FDA	Food and drug administration
FIH	Factor inhibiting HIF
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Green fluorescent protein
GLUT	Glucose Transporter protein
GST	Glutathione S-transferase
Gy	Gray unit
H2AX	H2A.X Variant Histone
H3K27me3	Tri-methylation at the 27th lysine residue to the Histone H3
H3K4me3	Tri-methylation at the 4th lysine residue to the Histone H3
H3K9me3	Tri-methylation at the 9th lysine residue to the Histone H3
HEPA filter	High efficiency particulate air filter
HGSOC	High-grade serous ovarian cancer
HIF	Hypoxia-inducible factor
HRE	Hypoxic response element
HTLV-1	Human T- cell leukemia virus , type 1
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDH	Índice de desarrollo humano
IF	Immunofluorescence
IL	Interleuquina
IP	Immunoprecipitation
JMJ demetilasa	Jumonji demetilasa
KAP1	KRAB-associated protein-1
Kb	Kilobase
Kda	Kilodalton



KDM5B	Lysine Demethylase 5B
KLF4	Kruppel Like Factor 4
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
LDHA	Lactate dehydrogenase A
MA	Millones de años
MCT4	Monocarboxylate transporter 4
MDR1	Multidrug resistance protein 1
MEME	Multiple em for motif elicitation
MMP9	Matrix metalloproteinase 9
MPG-2	N-(2-mercapto)propionil
MRE11	Double-strand break repair protein MRE11
NAD+	Nicotinamide adenine dinucleotide
NAM	Nicotilamida
NCD	Non communicable disease
NFKB	Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells
NHE1	Sodium-hydrogen antiporter 1
NK	Natural killer cells
NLS	Nuclear location sequence
NOS	Nitric oxide species
N-TAD	N-terminal transactivation domain
O2	Oxígeno molecular
OCT-4	(octamer-binding transcription factor 4
ODDD	Oxygen-dependent degradation domain
OMS	Organización Mundial de la Salud
P300	Histone acetyltransferase protein 300
P53	Tumor protein p53
PAR	poli ADP-ribosa
PARG	poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa
PARilación	poli (ADP-ribosilación)
PARP	Poli(ADP-ribosa) polimerasa
PAS	Per-ARNT-Sim domain
PBS	Phosphate-buffered saline
PCAF	p300/CREB-binding protein-associated factor
PCR	Polymerase chain reaction
PFK	Phosphofruktokinase
PHD	Prolyl hydroxylase domain protein



PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIC	Preinitiation complex
POL2	RNA polymerase II
PoliA	Poliadenilación
PTM	Posttranslational modification
PVHL	Von Hippel-Lindau protein
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RPA	Replication protein A
RUVBL1	RuvB-like 1 protein
SAM	Sterile alpha motif
SCF	Skp, Cullin, F-box containing complex
SDF1	Stromal cell-derived factor 1
SNAIL	Zinc finger protein SNAI1
SOX2	sex determining region Y
SSB	DNA single-strand break
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non Fermentable remodelling complex
TAM	Tyro3, Axl, and Mert receptors
TET1	Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1
TGFB	Transforming growth factor-beta
TIP60	Tat-interactive protein 60
TNFa	Tumor necrosis factor alpha
Treg	Regulatory T cells
TSS	Transcription start site
TWIST	Twist family bHLH transcription factor 1
UBE2M	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 M
UV(A&B)	Ultraviolet radiation type A & B
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del Papilomavirus Humano
WB	Western Blot
WGR	Tryptophan-glycine-arginine-rich domain
WHO	World Health Organization
WNT	Wingless-related integration site protein
XRCC1	X-Ray Repair Cross Complementing 1
ZEB	Zinc finger E-box-binding homeobox protein 1



## ABREVIATURAS

---

ZFs	Zinc finger domains
ZMYND8	Zinc Finger MYND-Type Containing 8



**BIBLIOGRAFÍA**



## Bibliografía

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [2] "WHO | Disease burden and mortality estimates," *WHO*, 2019.
- [3] "WHO | Disease burden and mortality estimates." [http://origin.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates/en/](http://origin.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/) (accessed Jun. 11, 2020).
- [4] 70 World Health Assembly, "Cancer prevention and control in the context of an integrated approach," p. 6 p., 2017.
- [5] A. Jemal Lindsey Torre Isabelle Soerjomataram Freddie Bray and C. Adams, *Third Edition THE CANCER ATLAS Third Edition THE CANCER ATLAS 4 5* . .
- [6] J. Ferlay *et al.*, "Cancer Today (powered by GLOBOCAN 2018)," *IARC CancerBase*, vol. 15, p. undefined-undefined, 2018, Accessed: Jun. 11, 2020. [Online]. Available: <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/Cancer-Today-Powered-By-GLOBOCAN-2018--2018>.
- [7] B. E. Wilson, S. Jacob, M. L. Yap, J. Ferlay, F. Bray, and M. B. Barton, "Estimates of global chemotherapy demands and corresponding physician workforce requirements for 2018 and 2040: a population-based study," *Lancet Oncol.*, vol. 20, no. 6, pp. 769–780, Jun. 2019, doi: 10.1016/S1470-2045(19)30163-9.
- [8] "Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development .. Sustainable Development Knowledge Platform." <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld/publication> (accessed Jun. 11, 2020).
- [9] W. H. Organization, *Assessing national capacity for the prevention and control of noncommunicable diseases: report of the 2015 global survey*. World Health Organization, 2016.
- [10] M. B. Barton, M. Frommer, and J. Shafiq, "Role of radiotherapy in



- cancer control in low-income and middle-income countries,” *Lancet Oncology*, vol. 7, no. 7. Lancet Publishing Group, pp. 584–595, 2006, doi: 10.1016/S1470-2045(06)70759-8.
- [11] M. Abdel-Wahab *et al.*, “Status of radiotherapy resources in Africa: An International Atomic Energy Agency analysis,” *The Lancet Oncology*, vol. 14, no. 4. Lancet Oncol, Apr. 2013, doi: 10.1016/S1470-2045(12)70532-6.
- [12] U. S. D. of H. and H. Services, C. for D. C. and Prevention, N. C. for C. D. P. and H. Promotion, and O. on S. and Health, “Executive Summary (The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General),” pp. 1–36, 2014, doi: NBK179276.
- [13] J. D. Stanaway *et al.*, “Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017,” *Lancet*, vol. 392, no. 10159, pp. 1923–1994, Nov. 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(18)32225-6.
- [14] L. A. Torre, F. Islami, R. L. Siegel, E. M. Ward, and A. Jemal, “Global cancer in women: Burden and trends,” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 26, no. 4. American Association for Cancer Research Inc., pp. 444–457, Apr. 01, 2017, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0858.
- [15] G. Carioli, M. Malvezzi, T. Rodriguez, P. Bertuccio, E. Negri, and C. La Vecchia, “Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality: Americas and Australasia,” *Breast*, vol. 37, pp. 163–169, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.breast.2017.12.004.
- [16] M. Arnold, M. S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, “Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality,” *Gut*, vol. 66, no. 4, pp. 683–691, Apr. 2017, doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
- [17] J. M. Chan, P. H. Gann, and E. L. Giovannucci, “Role of diet in prostate cancer development and progression,” *Journal of Clinical Oncology*. 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.03.1492.
- [18] E. A. Platz, M. F. Leitzmann, D. S. Michaud, W. C. Willett, and E. Giovannucci, “Interrelation of Energy Intake, Body Size, and



- Physical Activity with Prostate Cancer in a Large Prospective Cohort Study,” *Cancer Res.*, 2003.
- [19] M. Plummer, S. Franceschi, J. Vignat, D. Forman, and C. De Martel, “Global burden of gastric cancer attributable to pylori,” *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 2, pp. 487–490, Jan. 2015, doi: 10.1002/ijc.28999.
- [20] B. Lu and M. Li, “Helicobacter pylori eradication for preventing gastric cancer,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 19, pp. 5660–5665, 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5660.
- [21] M. Plummer, C. de Martel, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray, and S. Franceschi, “Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis,” *Lancet Glob. Heal.*, vol. 4, no. 9, pp. e609–e616, Sep. 2016, doi: 10.1016/S2214-109X(16)30143-7.
- [22] S. Vaccarella, J. Lortet-Tieulent, M. Plummer, S. Franceschi, and F. Bray, “Worldwide trends in cervical cancer incidence: Impact of screening against changes in disease risk factors,” *Eur. J. Cancer*, vol. 49, no. 15, pp. 3262–3273, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.ejca.2013.04.024.
- [23] “WHO | WHO leads the way towards the elimination of cervical cancer as a public health concern,” *WHO*, 2018, Accessed: Jun. 23, 2020. [Online]. Available: <http://www.who.int/reproductivehealth/cervical-cancer-public-health-concern/en/>.
- [24] “WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all.” <https://www.who.int/publications/i/item/who-report-on-cancer-setting-priorities-investing-wisely-and-providing-care-for-all> (accessed Nov. 13, 2020).
- [25] *Personal Habits and Indoor Combustions*. .
- [26] “WHO | WHO Framework Convention on Tobacco Control,” *WHO*, 2018, Accessed: Jun. 22, 2020. [Online]. Available: [http://www.who.int/fctc/text\\_download/en/](http://www.who.int/fctc/text_download/en/).
- [27] M. B. Reitsma *et al.*, “Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990-2015: A systematic analysis from the global burden of disease study 2015,” *Lancet*, vol. 389, no. 10082, pp. 1885–1906, May 2017, doi:



- 10.1016/S0140-6736(17)30819-X.
- [28] “WHO | Global status report on alcohol and health 2018,” *WHO*, 2019, Accessed: Jun. 22, 2020. [Online]. Available: [http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/en/](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/).
- [29] J. Manthey, K. D. Shield, M. Rylett, O. S. M. Hasan, C. Probst, and J. Rehm, “Global alcohol exposure between 1990 and 2017 and forecasts until 2030: a modelling study,” *Lancet*, vol. 393, no. 10190, pp. 2493–2502, Jun. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(18)32744-2.
- [30] T. Pflaum *et al.*, “Carcinogenic compounds in alcoholic beverages: an update,” *Archives of Toxicology*, vol. 90, no. 10. Springer Verlag, pp. 2349–2367, Oct. 01, 2016, doi: 10.1007/s00204-016-1770-3.
- [31] “‘Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: a Global Perspective’. About the Third Expert Report.” <https://www.wcrf.org/dietandcancer/about> (accessed Jun. 22, 2020).
- [32] D. Chisholm *et al.*, “Are the ‘best buys’ for alcohol control still valid? An update on the comparative cost-effectiveness of alcohol control strategies at the global level,” *J. Stud. Alcohol Drugs*, vol. 79, no. 4, pp. 514–522, Jul. 2018, doi: 10.15288/JSAD.2018.79.514.
- [33] B. Lauby-Secretan, C. Scoccianti, D. Loomis, Y. Grosse, F. Bianchini, and K. Straif, “Body fatness and cancer - Viewpoint of the IARC working group,” *New England Journal of Medicine*, vol. 375, no. 8. Massachusetts Medical Society, pp. 794–798, Aug. 25, 2016, doi: 10.1056/NEJMSr1606602.
- [34] M. Arnold *et al.*, “Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: A population-based study,” *Lancet Oncol.*, vol. 16, no. 1, pp. 36–46, 2015, doi: 10.1016/S1470-2045(14)71123-4.
- [35] V. Bouvard *et al.*, “Carcinogenicity of consumption of red and processed meat,” *The Lancet Oncology*, vol. 16, no. 16. Lancet Publishing Group, pp. 1599–1600, Dec. 01, 2015, doi: 10.1016/S1470-2045(15)00444-1.



- [36] “Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: a Global Perspective.” <https://www.wcrf.org/dietandcancer> (accessed Jun. 22, 2020).
- [37] E. L. Van Blarigan *et al.*, “Association of survival with adherence to the American cancer society nutrition and physical activity guidelines for cancer survivors after colon cancer diagnosis the calgb 89803/alliance trial,” *JAMA Oncol.*, vol. 4, no. 6, pp. 783–790, Jun. 2018, doi: 10.1001/jamaoncol.2018.0126.
- [38] R. Poole, O. J. Kennedy, P. Roderick, J. A. Fallowfield, P. C. Hayes, and J. Parkes, “Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes,” *BMJ*, vol. 359, p. j5024, Nov. 2017, doi: 10.1136/bmj.j5024.
- [39] K. L. Piercy *et al.*, “The physical activity guidelines for Americans,” *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 320, no. 19, pp. 2020–2028, Nov. 2018, doi: 10.1001/jama.2018.14854.
- [40] H. K. Neilson, S. M. Conroy, and C. M. Friedenreich, “The Influence of Energetic Factors on Biomarkers of Postmenopausal Breast Cancer Risk,” *Current Nutrition Reports*, vol. 3, no. 1. Current Science Inc., pp. 22–34, Dec. 15, 2014, doi: 10.1007/s13668-013-0069-8.
- [41] J. F. Sallis *et al.*, “Progress in physical activity over the Olympic quadrennium,” *The Lancet*, vol. 388, no. 10051. Lancet Publishing Group, pp. 1325–1336, Sep. 24, 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)30581-5.
- [42] C. de Martel, D. Georges, F. Bray, J. Ferlay, and G. M. Clifford, “Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis,” *Lancet Glob. Heal.*, vol. 8, no. 2, pp. e180–e190, Feb. 2020, doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7.
- [43] *Biological Agents. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume. .*
- [44] F. Bray, A. Jemal, N. Grey, J. Ferlay, and D. Forman, “Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): A population-based study,” *Lancet Oncol.*, vol. 13, no. 8, pp. 790–801, Aug. 2012, doi: 10.1016/S1470-2045(12)70211-5.
- [45] M. N. Mead, “Benefits of sunlight: a bright spot for human health.,” *Environmental health perspectives*, vol. 116, no. 4.



- National Institute of Environmental Health Sciences, p. A160, Apr. 2008, doi: 10.1289/ehp.116-a160.
- [46] A. Ziegler *et al.*, "Sunburn and p53 in the onset of skin cancer," *Nature*, vol. 372, no. 6508, pp. 773–776, 1994, doi: 10.1038/372773a0.
- [47] J. B. Kerr and V. E. Fioletov, "Surface ultraviolet radiation," *Atmosphere - Ocean*, vol. 46, no. 1. Taylor & Francis Group, pp. 159–184, Mar. 2008, doi: 10.3137/ao.460108.
- [48] "WHO | Solar ultraviolet radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation," *WHO*, 2017, Accessed: Jun. 23, 2020. [Online]. Available: <http://www.who.int/uv/publications/solaradgbd/en/>.
- [49] G. P. Guy, C. C. Thomas, T. Thompson, M. Watson, G. M. Massetti, and L. C. Richardson, "Vital signs: Melanoma incidence and mortality trends and projections — United States, 1982–2030," *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 64, no. 21, pp. 591–596, Jun. 2015, Accessed: Jun. 26, 2020. [Online]. Available: <https://europepmc.org/articles/PMC4584771>.
- [50] M. Kunisada *et al.*, "8-Oxoguanine Formation Induced by Chronic UVB Exposure Makes *Ogg1* Knockout Mice Susceptible to Skin Carcinogenesis," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 14, pp. 6006–6010, Jul. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0724.
- [51] A. Q. Khan, J. B. Travers, and M. G. Kemp, "Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 59, no. 5. John Wiley and Sons Inc., pp. 438–460, Jun. 01, 2018, doi: 10.1002/em.22176.
- [52] C. Nishigori, Y. Hattori, and S. Toyokuni, "Role of Reactive Oxygen Species in Skin Carcinogenesis," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 6, no. 3. Mary Ann Liebert Inc., pp. 561–570, Sep. 03, 2004, doi: 10.1089/152308604773934314.
- [53] "WHO | Artificial tanning sunbeds: risk and guidance," *WHO*, 2017, Accessed: Jun. 23, 2020. [Online]. Available: <http://www.who.int/uv/publications/sunbedpubl/en/>.
- [54] "WHO | INTERSUN - The global UV Project: A guide and compendium," *WHO*, 2017, Accessed: Jun. 23, 2020. [Online].



Available:

<http://www.who.int/uv/publications/intersunguide/en/>.

- [55] F. Islami *et al.*, "Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 1, pp. 31–54, Jan. 2018, doi: 10.3322/caac.21440.
- [56] R. Lakhtakia, "A brief history of breast cancer: Part I: Surgical domination reinvented," *Sultan Qaboos University Medical Journal*, vol. 14, no. 2. Sultan Qaboos University, p. e166, 2014, Accessed: Dec. 23, 2020. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997531/>.
- [57] J. T. Patterson and J. S. Olson, "The History of Cancer: An Annotated Bibliography.," *J. Am. Hist.*, vol. 77, no. 4, p. 1475, Mar. 1991, doi: 10.2307/2078448.
- [58] G. Fornaciari, "Histology of ancient soft tissue tumors: A review," *International Journal of Paleopathology*, vol. 21. Elsevier Inc., pp. 64–76, Jun. 01, 2018, doi: 10.1016/j.ijpp.2017.02.007.
- [59] E. J. Odes *et al.*, "Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa," vol. 112, doi: 10.17159/sajs.2016/20150471.
- [60] Y. Haridy, F. Witzmann, P. Asbach, R. R. Schoch, N. Fröbisch, and B. M. Rothschild, "Triassic Cancer - Osteosarcoma in a 240-Million-Year-Old Stem-Turtle," *JAMA Oncology*, vol. 5, no. 3. American Medical Association, pp. 425–426, Mar. 01, 2019, doi: 10.1001/jamaoncol.2018.6766.
- [61] C. Athena Aktipis *et al.*, "Cancer across the tree of life: Cooperation and cheating in multicellularity," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 370, no. 1673, Jul. 2015, doi: 10.1098/rstb.2014.0219.
- [62] E. Clarke, " Evolutionary Transitions to Multicellular Life: Principles and Mechanisms . Advances in Marine Genomics, Volume 2. Edited by Iñaki Ruiz-Trillo and Aurora M. Nedelcu. Dordrecht (The Netherlands) and New York: Springer. \$179.00. xvi + 489 p.; ill.; index. ISBN: 978-94-017-9641-5 (hc); 978-94-017-9642-2 (eb). 2015. ," *Q. Rev. Biol.*, vol. 91, no. 3, pp. 370–371, Sep. 2016, doi: 10.1086/688137.



- [63] H. Peto, F. J. C. Roe, P. N. Lee, L. Levy, and J. Clack, "Cancer and ageing in mice and men," *Br. J. Cancer*, 1975, doi: 10.1038/bjc.1975.242.
- [64] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5. Elsevier, pp. 646–674, Mar. 04, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [65] L. A. Griner, "Pathology of zoo animals. A review of necropsies conducted over a fourteen-year period at the San Diego Zoo and San Diego Wild Animal Park.," *Pathol. zoo Anim. A Rev. necropsies Conduct. over a fourteen-year period San Diego Zoo San Diego Wild Anim. Park.*, 1983.
- [66] M. Vittecoq *et al.*, "Cancer: A missing link in ecosystem functioning?," *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 28, no. 11. Elsevier Ltd, pp. 628–635, 2013, doi: 10.1016/j.tree.2013.07.005.
- [67] T. Madsen *et al.*, "Cancer Prevalence and Etiology in Wild and Captive Animals," in *Ecology and Evolution of Cancer*, Elsevier Inc., 2017, pp. 11–46.
- [68] R. E. Michod, "Evolution of individuality during the transition from unicellular to multicellular life," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. SUPPL. 1, pp. 8613–8618, May 2007, doi: 10.1073/pnas.0701489104.
- [69] T. Cavalier-Smith, "Origin of animal multicellularity: Precursors, causes, consequences—the choanoflagellate/sponge transition, neurogenesis and the Cambrian explosion," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 2017, doi: 10.1098/rstb.2015.0476.
- [70] B. E. Schirrmeister, J. M. De Vos, A. Antonelli, and H. C. Bagheri, "Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, doi: 10.1073/pnas.1209927110.
- [71] J. E. Strassmann and D. C. Queller, "THE SOCIAL ORGANISM: CONGRESSES, PARTIES, AND COMMITTEES," *Evolution (N. Y.)*, vol. 64, no. 3, pp. 605–616, Mar. 2010, doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00929.x.
- [72] E. Szathmáry and J. M. Smith, "The major evolutionary transitions," *Nature*, vol. 374, no. 6519, pp. 227–232, Mar. 1995,



- doi: 10.1038/374227a0.
- [73] R. S. Hotchkiss, A. Strasser, J. E. McDunn, and P. E. Swanson, "Mechanisms of disease: Cell death," *New England Journal of Medicine*, vol. 361, no. 16. Massachusetts Medical Society, pp. 1570–1583, Oct. 15, 2009, doi: 10.1056/NEJMra0901217.
- [74] S. F. Gilbert, "Multicellularity: The Evolution of Differentiation," 2000, Accessed: Jun. 25, 2020. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10031/>.
- [75] J. T. Holden, "Evolution of transport systems," *J. Theor. Biol.*, vol. 21, no. 1, pp. 97–102, Oct. 1968, doi: 10.1016/0022-5193(68)90062-3.
- [76] S. Özbek, P. G. Balasubramanian, R. Chiquet-Ehrismann, R. P. Tucker, and J. C. Adams, "The evolution of extracellular matrix," *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, no. 24, pp. 4300–4305, Dec. 2010, doi: 10.1091/mbc.E10-03-0251.
- [77] R. Michod, "Darwinian dynamics: evolutionary transitions in fitness and individuality," 2000, Accessed: Jun. 25, 2020. [Online]. Available: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=dWepgoXym\\_EC&oi=fnd&pg=PR11&dq=Michod+RE.+1999+Darwinian+dynamics:+evolutionary+transitions+in+fitness+and+individuality.+Princeton,&ots=p2N300GRgB&sig=Dm4yPx5mxg-4OvJZV6bs02rdBlg](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=dWepgoXym_EC&oi=fnd&pg=PR11&dq=Michod+RE.+1999+Darwinian+dynamics:+evolutionary+transitions+in+fitness+and+individuality.+Princeton,&ots=p2N300GRgB&sig=Dm4yPx5mxg-4OvJZV6bs02rdBlg).
- [78] C. Arenas-Mena, "The origins of developmental gene regulation," *Evol. Dev.*, vol. 19, no. 2, pp. 96–107, Mar. 2017, doi: 10.1111/ede.12217.
- [79] J. M. Carlson and J. Doyle, "Complexity and robustness," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. SUPPL. 1, pp. 2538–2545, Feb. 2002, doi: 10.1073/pnas.012582499.
- [80] P. J. Campbell *et al.*, "Pan-cancer analysis of whole genomes," *Nature*, vol. 578, no. 7793, pp. 82–93, Feb. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-1969-6.
- [81] T. Domazet-Lošo and D. Tautz, "Phylostratigraphic tracking of cancer genes suggests a link to the emergence of multicellularity in metazoa," *BMC Biol.*, vol. 8, no. 1, p. 66, May 2010, doi: 10.1186/1741-7007-8-66.
- [82] A. S. Trigos, R. B. Pearson, A. T. Papenfuss, and D. L. Goode, "How



- the evolution of multicellularity set the stage for cancer," *Br. J. Cancer*, 2018, doi: 10.1038/bjc.2017.398.
- [83] M. Vincent, "Cancer: A de-repression of a default survival program common to all cells?: A life-history perspective on the nature of cancer," *BioEssays*, vol. 34, no. 1, pp. 72–82, Jan. 2012, doi: 10.1002/bies.201100049.
- [84] K. J. Bussey, L. H. Cisneros, C. H. Lineweaver, and P. C. W. Davies, "Ancestral gene regulatory networks drive cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 114, no. 24. National Academy of Sciences, pp. 6160–6162, Jun. 13, 2017, doi: 10.1073/pnas.1706990114.
- [85] L. Cisneros, K. J. Bussey, A. J. Orr, M. Miočević, C. H. Lineweaver, and P. Davies, "Ancient genes establish stress-induced mutation as a hallmark of cancer," *PLoS One*, vol. 12, no. 4, Apr. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0176258.
- [86] O. Lavi, "Redundancy: A critical obstacle to improving cancer therapy," *Cancer Research*, vol. 75, no. 5. American Association for Cancer Research Inc., pp. 808–812, Mar. 01, 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3256.
- [87] S. Boumahdi and F. J. de Sauvage, "The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 19, no. 1. Nature Research, pp. 39–56, Jan. 01, 2020, doi: 10.1038/s41573-019-0044-1.
- [88] E. Bianconi *et al.*, "An estimation of the number of cells in the human body," *Ann. Hum. Biol.*, vol. 40, no. 6, pp. 463–471, Nov. 2013, doi: 10.3109/03014460.2013.807878.
- [89] J. DeGregori, "Evolved tumor suppression: Why are we so good at not getting cancer?," *Cancer Research*. 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0342.
- [90] S. R. Kennedy, L. A. Loeb, and A. J. Herr, "Somatic mutations in aging, cancer and neurodegeneration," *Mech. Ageing Dev.*, 2012, doi: 10.1016/j.mad.2011.10.009.
- [91] R. A. Risques and S. R. Kennedy, "Aging and the rise of somatic cancer-associated mutations in normal tissues," *PLoS Genetics*. 2018, doi: 10.1371/journal.pgen.1007108.
- [92] A. S. I. Ahmed, M. H. Sheng, S. Wasnik, D. J. Baylink, and K.-H. W.



- Lau, "Effect of aging on stem cells," *World J. Exp. Med.*, 2017, doi: 10.5493/wjem.v7.i1.1.
- [93] M. Ermolaeva, F. Neri, A. Ori, and K. L. Rudolph, "Cellular and epigenetic drivers of stem cell ageing," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018, doi: 10.1038/s41580-018-0020-3.
- [94] M. Molinari, "Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer," *Cell Proliferation*. 2000, doi: 10.1046/j.1365-2184.2000.00191.x.
- [95] S. Sun, M. D. Osterman, and M. Li, "Tissue specificity of DNA damage response and tumorigenesis," *Cancer Biology and Medicine*. 2019, doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0097.
- [96] K. Fernald and M. Kurokawa, "Evading apoptosis in cancer," *Trends in Cell Biology*. 2013, doi: 10.1016/j.tcb.2013.07.006.
- [97] A. S. L. Chan and M. Narita, "Short-term gain, long-term pain: The senescence life cycle and cancer," *Genes and Development*. 2019, doi: 10.1101/gad.320937.118.
- [98] A. Bernal and L. Tusell, "Telomeres: Implications for cancer development," *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, doi: 10.3390/ijms19010294.
- [99] W. H. Fridman, "From Cancer Immune Surveillance to Cancer Immunoediting: Birth of Modern Immuno-Oncology," *J. Immunol.*, 2018, doi: 10.4049/jimmunol.1800827.
- [100] S. Pennings, K. J. Liu, and H. Qian, "The stem cell niche: Interactions between stem cells and their environment," *Stem Cells International*. 2018, doi: 10.1155/2018/4879379.
- [101] I. A. Rodriguez-Brenes, D. Wodarz, and N. L. Komarova, "Minimizing the risk of cancer: Tissue architecture and cellular replication limits," *J. R. Soc. Interface*, 2013, doi: 10.1098/rsif.2013.0410.
- [102] K. Smetana, B. Dvořánková, L. Lacina, P. Szabo, B. Brož, and A. Šedo, "Cancer: The price for longevity," in *Aging: Exploring a Complex Phenomenon*, 2017.
- [103] F. Fyhrquist and O. Saijonmaa, "Telomere length and cardiovascular aging," *Annals of Medicine*. 2012, doi: 10.3109/07853890.2012.660497.



- [104] M. A. Lodato *et al.*, "Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons," *Science* (80-. ), 2018, doi: 10.1126/science.aao4426.
- [105] U. Rass, I. Ahel, and S. C. West, "Defective DNA Repair and Neurodegenerative Disease," *Cell*. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.08.043.
- [106] P. C. Nowell, "The clonal evolution of tumor cell populations," *Science* (80-. ), vol. 194, no. 4260, pp. 23–28, Oct. 1976, doi: 10.1126/science.959840.
- [107] M. Casás-Selves and J. Degregori, "How Cancer Shapes Evolution and How Evolution Shapes Cancer," *Evolution: Education and Outreach*, vol. 4, no. 4. BioMed Central Ltd., pp. 624–634, Dec. 22, 2011, doi: 10.1007/s12052-011-0373-y.
- [108] D. Chowell, J. Napier, R. Gupta, K. S. Anderson, C. C. Maley, and M. A. Wilson Sayres, "Modeling the subclonal evolution of cancer cell populations," *Cancer Res.*, 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1229.
- [109] M. Shpak and J. Lu, "An Evolutionary Genetic Perspective on Cancer Biology," *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 2016, doi: 10.1146/annurev-ecolsys-121415-032109.
- [110] R. Sun, Z. Hu, and C. Curtis, "Big bang tumor growth and clonal evolution," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 8, no. 5, May 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a028381.
- [111] C. C. Maley *et al.*, "Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms," *Nature Reviews Cancer*. 2017, doi: 10.1038/nrc.2017.69.
- [112] A. H. Shain *et al.*, "The genetic evolution of melanoma from precursor lesions," *N. Engl. J. Med.*, 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1502583.
- [113] M. Gerlinger, N. McGranahan, S. M. Dewhurst, R. A. Burrell, I. Tomlinson, and C. Swanton, "Cancer: Evolution within a lifetime," *Annu. Rev. Genet.*, 2014, doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092314.
- [114] L. R. Yates and P. J. Campbell, "Evolution of the cancer genome," *Nature Reviews Genetics*, vol. 13, no. 11. Nat Rev Genet, pp. 795–806, Nov. 2012, doi: 10.1038/nrg3317.



- [115] A. S. Trigos, R. B. Pearson, A. T. Papenfuss, and D. L. Goode, "Altered interactions between unicellular and multicellular genes drive hallmarks of transformation in a diverse range of solid tumors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2017, doi: 10.1073/pnas.1617743114.
- [116] F. R. Balkwill, M. Capasso, and T. Hagemann, "The tumor microenvironment at a glance," *J. Cell Sci.*, 2012, doi: 10.1242/jcs.116392.
- [117] A. Korniluk, O. Koper, H. Kemono, and V. Dymicka-Piekarska, "From inflammation to cancer," *Irish Journal of Medical Science*. 2017, doi: 10.1007/s11845-016-1464-0.
- [118] P. Savas *et al.*, "Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis," *Nat. Med.*, 2018, doi: 10.1038/s41591-018-0078-7.
- [119] M. C. Dieu-Nosjean *et al.*, "Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures," *J. Clin. Oncol.*, 2008, doi: 10.1200/JCO.2007.15.0284.
- [120] S. Spranger, "Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment," *International Immunology*. 2016, doi: 10.1093/intimm/dxw014.
- [121] Y. Togashi, K. Shitara, and H. Nishikawa, "Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy," *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019, doi: 10.1038/s41571-019-0175-7.
- [122] A. Largeot, G. Pagano, S. Gonder, E. Moussay, and J. Paggetti, "The B-Side of Cancer Immunity: The Underrated Tune," *Cells*, 2019, doi: 10.3390/cells8050449.
- [123] Y. Pylayeva-Gupta *et al.*, "IL35-producing b cells promote the development of pancreatic neoplasia," *Cancer Discov.*, 2016, doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0843.
- [124] P. Andreu *et al.*, "FcRγ Activation Regulates Inflammation-Associated Squamous Carcinogenesis," *Cancer Cell*, 2010, doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.019.
- [125] K. E. De Visser, L. V. Korets, and L. M. Coussens, "De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B



- lymphocyte dependent," *Cancer Cell*, 2005, doi: 10.1016/j.ccr.2005.04.014.
- [126] T. Schioppa *et al.*, "B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- $\alpha$  during squamous carcinogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011, doi: 10.1073/pnas.1100994108.
- [127] A. Mantovani, F. Marchesi, A. Malesci, L. Laghi, and P. Allavena, "Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology," *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2017, doi: 10.1038/nrclinonc.2016.217.
- [128] V. Riabov, A. Gudima, N. Wang, A. Mickley, A. Orekhov, and J. Kzhyshkowska, "Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis," *Frontiers in Physiology*. 2014, doi: 10.3389/fphys.2014.00075.
- [129] R. B. Bednarczyk *et al.*, "Macrophage inflammatory factors promote epithelial-mesenchymal transition in breast cancer," *Oncotarget*, vol. 9, no. 36, pp. 24272–24282, May 2018, doi: 10.18632/oncotarget.24917.
- [130] M. Yu *et al.*, "Prognostic value of tumor-associated macrophages in pancreatic cancer: A meta-analysis," *Cancer Management and Research*. 2019, doi: 10.2147/CMAR.S196951.
- [131] Y. Chen, Y. Song, W. Du, L. Gong, H. Chang, and Z. Zou, "Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression," *Journal of Biomedical Science*. 2019, doi: 10.1186/s12929-019-0568-z.
- [132] L. Wu, S. Saxena, M. Awaji, and R. K. Singh, "Tumor - associated neutrophils in cancer: Going pro," *Cancers (Basel)*., 2019, doi: 10.3390/cancers11040564.
- [133] D. Bausch *et al.*, "Neutrophil granulocyte derived MMP-9 is a VEGF independent functional component of the angiogenic switch in pancreatic ductal adenocarcinoma," *Angiogenesis*, 2011, doi: 10.1007/s10456-011-9207-3.
- [134] A. M. G. Houghton *et al.*, "Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth," *Nat. Med.*, 2010, doi: 10.1038/nm.2084.
- [135] E. Sahai *et al.*, "A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts," *Nature Reviews Cancer*. 2020, doi:



- 10.1038/s41568-019-0238-1.
- [136] A. Cerwenka and L. L. Lanier, "Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer," *Nature Reviews Immunology*. 2016, doi: 10.1038/nri.2015.9.
- [137] A. Iannello, T. W. Thompson, M. Ardolino, A. Marcus, and D. H. Raulet, "Immunosurveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells," *Current Opinion in Immunology*. 2016, doi: 10.1016/j.coi.2015.11.001.
- [138] S. Ishigami *et al.*, "Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma," *Cancer*, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(20000201)88:3<577::AID-CNCR13>3.0.CO;2-V.
- [139] S. K. Wculek, F. J. Cueto, A. M. Mujal, I. Melero, M. F. Krummel, and D. Sancho, "Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy," *Nature Reviews Immunology*. 2020, doi: 10.1038/s41577-019-0210-z.
- [140] F. Veglia and D. I. Gabrilovich, "Dendritic cells in cancer: the role revisited," *Current Opinion in Immunology*. 2017, doi: 10.1016/j.coi.2017.01.002.
- [141] A. Gardner and B. Ruffell, "Dendritic Cells and Cancer Immunity," *Trends in Immunology*. 2016, doi: 10.1016/j.it.2016.09.006.
- [142] C. Walker, E. Mojares, and A. Del Río Hernández, "Role of extracellular matrix in development and cancer progression," *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, doi: 10.3390/ijms19103028.
- [143] P. Lu, V. M. Weaver, and Z. Werb, "The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression," *Journal of Cell Biology*. 2012, doi: 10.1083/jcb.201102147.
- [144] I. Kareva, "What can ecology teach us about cancer?," *Transl. Oncol.*, 2011, doi: 10.1593/tlo.11154.
- [145] A. Peralta-Leal *et al.*, "PARP inhibitors: New partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 1. *Free Radic Biol Med*, pp. 13–26, Jul. 01, 2009, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.008.
- [146] V. Schreiber, F. Dantzer, J. C. Amé, and G. De Murcia, "Poly(ADP-ribose): Novel functions for an old molecule," *Nature Reviews*



- Molecular Cell Biology*, vol. 7, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 517–528, Jul. 17, 2006, doi: 10.1038/nrm1963.
- [147] B. A. Gibson and W. L. Kraus, “New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 13, no. 7. Nat Rev Mol Cell Biol, pp. 411–424, Jul. 2012, doi: 10.1038/nrm3376.
- [148] P. Chambon, J. D. Weill, and P. Mandel, “Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 39–43, Apr. 1963, doi: 10.1016/0006-291X(63)90024-X.
- [149] I. Kameshita, Z. Matsuda, T. Taniguchi, and Y. Shizuta, “Poly(ADP-ribose) synthetase. Separation and identification of three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, the DNA-binding domain, and the automodification domain,” *J. Biol. Chem.*, vol. 259, no. 8, pp. 4770–4776, 1984.
- [150] S. Eustermann *et al.*, “Structural Basis of Detection and Signaling of DNA Single-Strand Breaks by Human PARP-1,” *Mol. Cell*, vol. 60, no. 5, pp. 742–754, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.032.
- [151] M. C. Caron *et al.*, “Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10741-9.
- [152] A. K. L. Leung, “Poly(ADP-ribose): A Dynamic Trigger for Biomolecular Condensate Formation,” *Trends in Cell Biology*. 2020, doi: 10.1016/j.tcb.2020.02.002.
- [153] J. M. Pascal, “The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage,” *DNA Repair*, vol. 71. Elsevier B.V., pp. 177–182, Nov. 01, 2018, doi: 10.1016/j.dnarep.2018.08.022.
- [154] T. M. Kauppinen, W. Y. Chan, S. W. Suh, A. K. Wiggins, E. J. Huang, and R. A. Swanson, “Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated 1/2,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 18, pp. 7136–7141, May 2006, doi: 10.1073/pnas.0508606103.
- [155] Y. Du *et al.*, “Blocking c-Met-mediated PARP1 phosphorylation enhances anti-tumor effects of PARP inhibitors,” *Nat. Med.*, vol. 22, no. 2, pp. 194–201, Feb. 2016, doi: 10.1038/nm.4032.



- [156] B. Gongol *et al.*, "AMPK $\alpha$ 2 exerts its anti-inflammatory effects through PARP-1 and Bcl-6," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 8, pp. 3161–3166, Feb. 2013, doi: 10.1073/pnas.1222051110.
- [157] S. Beckert *et al.*, "IGF-I-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 341, no. 1, pp. 67–72, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.12.148.
- [158] P. O. Hassa *et al.*, "Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 49, pp. 40450–40464, Dec. 2005, doi: 10.1074/jbc.M507553200.
- [159] N. Martin *et al.*, "PARP-1 transcriptional activity is regulated by sumoylation upon heat shock," *EMBO J.*, vol. 28, no. 22, pp. 3534–3548, Nov. 2009, doi: 10.1038/emboj.2009.279.
- [160] O. Loseva *et al.*, "PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 11, pp. 8054–8060, Mar. 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.077834.
- [161] L. Piao, K. Fujioka, M. Nakakido, and R. Hamamoto, "Regulation of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 functions by post-translational modifications," *Frontiers in Bioscience - Landmark*, vol. 23, no. 1. *Frontiers in Bioscience*, pp. 13–26, 2018, doi: 10.2741/4578.
- [162] J. Diefenbach and A. Bürkle, "Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 62, no. 7–8. *Cell Mol Life Sci*, pp. 721–730, Apr. 2005, doi: 10.1007/s00018-004-4503-3.
- [163] P. O. Hassa and M. O. Hottiger, "The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases," *Frontiers in Bioscience*, vol. 13, no. 8. *Front Biosci*, pp. 3046–3082, 2008, doi: 10.2741/2909.
- [164] P. L. Panzeter, C. A. Realini, and F. R. Althaus, "Noncovalent Interactions of Poly (Adenosine Diphosphate Ribose) with Histones," *Biochemistry*, vol. 31, no. 5, pp. 1379–1385, Feb. 1992, doi: 10.1021/bi00120a014.
- [165] E. E. Alemasova and O. I. Lavrik, "At the interface of three nucleic acids: The role of RNA-binding proteins and poly(ADP-ribose) in DNA repair," *Acta Naturae*. 2017, doi: 10.32607/20758251-2017-



9-2-4-16.

- [166] Y. Wang *et al.*, "Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos)," *Sci. Signal.*, vol. 4, no. 167, Apr. 2011, doi: 10.1126/scisignal.2000902.
- [167] A. Fatokun, "Parthanatos: Poly ADP Ribose Polymerase (PARP)-Mediated Cell Death," in *Apoptosis and Beyond*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2018, pp. 535–558.
- [168] M. M. Murata *et al.*, "NAD<sup>+</sup> consumption by PARP1 in response to DNA damage triggers metabolic shift critical for damaged cell survival," *Mol. Biol. Cell*, vol. 30, no. 20, pp. 2584–2597, Sep. 2019, doi: 10.1091/mbc.E18-10-0650.
- [169] M. Rouleau, R. A. Aubin, and G. G. Poirier, "Pol (ADP-ribosyl)ated chromatin domains: Access granted," *Journal of Cell Science*, vol. 117, no. 6. The Company of Biologists Ltd, pp. 815–825, Feb. 29, 2004, doi: 10.1242/jcs.01080.
- [170] M. Rouleau, A. Patel, M. J. Hendzel, S. H. Kaufmann, and G. G. Poirier, "PARP inhibition: PARP1 and beyond," *Nature Reviews Cancer*, vol. 10, no. 4. NIH Public Access, pp. 293–301, Apr. 2010, doi: 10.1038/nrc2812.
- [171] A. Bürkle and L. Virág, "Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 34, no. 6. Mol Aspects Med, pp. 1046–1065, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.mam.2012.12.010.
- [172] I. Lonskaya, V. N. Potaman, L. S. Shlyakhtenko, E. A. Oussatcheva, Y. L. Lyubchenko, and V. A. Soldatenkov, "Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 17, pp. 17076–17083, Apr. 2005, doi: 10.1074/jbc.M413483200.
- [173] G. P. Jezabel, "Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer," *Ann. Oncol.*, vol. 23, no. 5, 2012.
- [174] F. Bertucci *et al.*, "PARP1 expression in soft tissue sarcomas is a poor-prognosis factor and a new potential therapeutic target," *Mol. Oncol.*, vol. 13, no. 7, pp. 1577–1588, Jul. 2019, doi: 10.1002/1878-0261.12522.



- [175] M. Elser *et al.*, "Poly(ADP-ribose) polymerase 1 promotes tumor cell survival by coactivating hypoxia-inducible factor-1-dependent gene expression," *Mol. Cancer Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 282–290, Feb. 2008, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0377.
- [176] A. Gonzalez-Flores *et al.*, "Interaction between PARP-1 and HIF-2 in the hypoxic response," *Oncogene*, vol. 33, no. 7, pp. 891–898, Feb. 2014, doi: 10.1038/onc.2013.9.
- [177] M. Hulse, L. B. Caruso, J. Madzo, Y. Tan, S. Johnson, and I. Tempera, "Poly(ADP-ribose) polymerase 1 is necessary for coactivating hypoxia-inducible factor-1-dependent gene expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1," *PLOS Pathog.*, vol. 14, no. 11, p. e1007394, Nov. 2018, doi: 10.1371/journal.ppat.1007394.
- [178] P. Vaupel and A. Mayer, "The Clinical Importance of Assessing Tumor Hypoxia: Relationship of Tumor Hypoxia to Prognosis and Therapeutic Opportunities," *Antioxidants and Redox Signaling*. 2015, doi: 10.1089/ars.2014.6155.
- [179] V. Bhandari, C. H. Li, R. G. Bristow, and P. C. Boutros, "Divergent mutational processes distinguish hypoxic and normoxic tumours," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–10, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-019-14052-x.
- [180] L. Tentori *et al.*, "Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition or PARP-1 gene deletion reduces angiogenesis," *Eur. J. Cancer*, vol. 43, no. 14, pp. 2124–2133, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.ejca.2007.07.010.
- [181] A. Pyriochou, G. Olah, E. A. Deitch, C. Szabó, and A. Papapetropoulos, "Inhibition of angiogenesis by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ-34," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 22, no. 1, pp. 113–118, 2008, doi: 10.3892/ijmm.22.1.113.
- [182] M. Fernández-Cortés, D. Delgado-Bellido, and F. J. Oliver, "Vasculogenic Mimicry: Become an Endothelial Cell 'But Not So Much,'" *Front. Oncol.*, vol. 9, no. AUG, p. 803, Aug. 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00803.
- [183] M. I. Rodríguez *et al.*, "PARP-1 Regulates Metastatic Melanoma through Modulation of Vimentin-induced Malignant Transformation," *PLoS Genet.*, vol. 9, no. 6, Jun. 2013, doi: 10.1371/journal.pgen.1003531.



- [184] J. Yélamos, L. Moreno-Lama, J. Jimeno, and S. O. Ali, "Immunomodulatory roles of PARP-1 and PARP-2: Impact on PARP-centered cancer therapies," *Cancers*. 2020, doi: 10.3390/cancers12020392.
- [185] L. Moreno-Lama *et al.*, "Coordinated signals from PARP-1 and PARP-2 are required to establish a proper T cell immune response to breast tumors in mice," *Oncogene*, 2020, doi: 10.1038/s41388-020-1175-x.
- [186] E. White, J. M. Mehnert, and C. S. Chan, "Autophagy, Metabolism, and Cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 21, no. 22. American Association for Cancer Research Inc., pp. 5037–5046, Nov. 15, 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0490.
- [187] C. K. Das, M. Mandal, and D. Kögel, "Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 37, no. 4. Springer New York LLC, pp. 749–766, Dec. 15, 2018, doi: 10.1007/s10555-018-9727-z.
- [188] Y. J. Li *et al.*, "Autophagy and multidrug resistance in cancer," *Chinese journal of cancer*, vol. 36, no. 1. Chin J Cancer, p. 52, Jun. 24, 2017, doi: 10.1186/s40880-017-0219-2.
- [189] E. E. Mowers, M. N. Sharifi, and K. F. Macleod, "Autophagy in cancer metastasis," *Oncogene*, vol. 36, no. 12. Nature Publishing Group, pp. 1619–1630, Mar. 23, 2017, doi: 10.1038/onc.2016.333.
- [190] J. M. Rodríguez-Vargas *et al.*, "Autophagy requires poly(adp-ribosyl)ation-dependent AMPK nuclear export," *Cell Death Differ.*, vol. 23, no. 12, pp. 2007–2018, Dec. 2016, doi: 10.1038/cdd.2016.80.
- [191] F. Shang *et al.*, "Cardiovascular protective effect of metformin and telmisartan: Reduction of PARP1 activity via the AMPK-PARP1 cascade," *PLoS One*, vol. 11, no. 3, Mar. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0151845.
- [192] R. Moharil, A. Dive, S. Khandekar, and A. Bodhade, "Cancer stem cells: An insight," *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, vol. 21, no. 3. Medknow Publications, p. 463, Sep. 01, 2017, doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_132\_16.
- [193] A. Schulenburg *et al.*, "Cancer stem cells in basic science and in translational oncology: Can we translate into clinical



- application?," *Journal of Hematology and Oncology*, vol. 8, no. 1. BioMed Central Ltd., 2015, doi: 10.1186/s13045-015-0113-9.
- [194] D. G. Niu *et al.*, "Morphine promotes cancer stem cell properties, contributing to chemoresistance in breast cancer," *Oncotarget*, vol. 6, no. 6, pp. 3963–3976, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.2894.
- [195] D. L. Schonberg, D. Lubelski, T. E. Miller, and J. N. Rich, "Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 39. Elsevier Ltd, pp. 82–101, Jul. 04, 2013, doi: 10.1016/j.mam.2013.06.004.
- [196] Q. Deng and D. G. Tang, "Androgen receptor and prostate cancer stem cells: Biological mechanisms and clinical implications," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 22, no. 6. BioScientifica Ltd., pp. T209–T220, Dec. 01, 2015, doi: 10.1530/ERC-15-0217.
- [197] D. Kumar, M. Gorain, G. Kundu, and G. C. Kundu, "Therapeutic implications of cellular and molecular biology of cancer stem cells in melanoma," *Molecular Cancer*, vol. 16, no. 1. BioMed Central Ltd., Jan. 30, 2017, doi: 10.1186/s12943-016-0578-3.
- [198] P. Wang *et al.*, "Identification and Characterization of Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Primary Lung Cancer Cell Lines," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, Mar. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0057020.
- [199] Y. Hatano, S. Fukuda, K. Hisamatsu, A. Hirata, A. Hara, and H. Tomita, "Multifaceted interpretation of colon cancer stem cells," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 7. MDPI AG, Jul. 05, 2017, doi: 10.3390/ijms18071446.
- [200] N. K. Lytle *et al.*, "A Multiscale Map of the Stem Cell State in Pancreatic Adenocarcinoma," *Cell*, vol. 177, no. 3, pp. 572–586.e22, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.03.010.
- [201] H. Pu *et al.*, "CUDR promotes liver cancer stem cell growth through upregulating TERT and C-Myc," *Oncotarget*, vol. 6, no. 38, pp. 40775–40798, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5805.
- [202] A. Myszczyzyn *et al.*, "The Role of Hypoxia and Cancer Stem Cells in Renal Cell Carcinoma Pathogenesis," *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 11, no. 6. Humana Press Inc., pp. 919–943, Dec. 01, 2015, doi: 10.1007/s12015-015-9611-y.



- [203] D. Friedmann-Morvinski and I. M. Verma, "Dedifferentiation and reprogramming: Origins of cancer stem cells," *EMBO Reports*, vol. 15, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 244–253, 2014, doi: 10.1002/embr.201338254.
- [204] S. M. Kumar *et al.*, "Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation," *Oncogene*, vol. 31, no. 47, pp. 4898–4911, Nov. 2012, doi: 10.1038/onc.2011.656.
- [205] M.-H. Hsieh *et al.*, "PARP1 controls KLF4-mediated telomerase expression in stem cells and cancer cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. 18, pp. 10492–10503, 2017, doi: 10.1093/nar/gkx683.
- [206] F. A. Weber, G. Bartolomei, M. O. Hottiger, and P. Cinelli, "Artd1/Parp1 regulates reprogramming by transcriptional regulation of Fgf4 via Sox2 ADP-ribosylation," *Stem Cells*, vol. 31, no. 11, pp. 2364–2373, Nov. 2013, doi: 10.1002/stem.1507.
- [207] S. H. Chiou *et al.*, "Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates nuclear reprogramming and promotes iPSC generation without c-Myc," *J. Exp. Med.*, vol. 210, no. 1, pp. 85–98, Jan. 2013, doi: 10.1084/jem.20121044.
- [208] C. A. Doege *et al.*, "Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2," *Nature*, vol. 488, no. 7413, pp. 652–655, Aug. 2012, doi: 10.1038/nature11333.
- [209] H. Abraham Valencia-González, G. Ruíz, E. Ortiz-Sánchez, and A. García-Carrancá, "Cancer Stem Cells from Tumor Cell Lines Activate the DNA Damage Response Pathway after Ionizing Radiation More Efficiently Than Noncancer Stem Cells," 2019, doi: 10.1155/2019/7038953.
- [210] M. Venere *et al.*, "Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells," *Cell Death Differ.*, vol. 21, no. 2, pp. 258–269, Feb. 2014, doi: 10.1038/cdd.2013.136.
- [211] H. E. Bryant *et al.*, "Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase," *Nature*, vol. 434, no. 7035, pp. 913–917, Apr. 2005, doi: 10.1038/nature03443.
- [212] D. Bell *et al.*, "Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma," *Nature*, vol. 474, no. 7353, pp. 609–615, Jun. 2011, doi: 10.1038/nature10166.



- [213] P. C. Fong *et al.*, "Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from *BRCA* Mutation Carriers," *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, no. 2, pp. 123–134, Jul. 2009, doi: 10.1056/NEJMoa0900212.
- [214] R. L. Coleman *et al.*, "Veliparib with first-line chemotherapy and as maintenance therapy in ovarian cancer," *N. Engl. J. Med.*, 2019, doi: 10.1056/NEJMoa1909707.
- [215] S. M. Domchek *et al.*, "Efficacy and safety of olaparib monotherapy in germline *BRCA1/2* mutation carriers with advanced ovarian cancer and three or more lines of prior therapy," *Gynecol. Oncol.*, vol. 140, no. 2, pp. 199–203, 2016, doi: 10.1016/j.ygyno.2015.12.020.
- [216] A. Tutt *et al.*, "Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with *BRCA1* or *BRCA2* mutations and advanced breast cancer: A proof-of-concept trial," *Lancet*, vol. 376, no. 9737, pp. 235–244, 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60892-6.
- [217] J. Ledermann *et al.*, "Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: A preplanned retrospective analysis of outcomes by *BRCA* status in a randomised phase 2 trial," *Lancet Oncol.*, vol. 15, no. 8, pp. 852–861, 2014, doi: 10.1016/S1470-2045(14)70228-1.
- [218] E. M. Swisher *et al.*, "Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial," *Lancet Oncol.*, vol. 18, no. 1, pp. 75–87, Jan. 2017, doi: 10.1016/S1470-2045(16)30559-9.
- [219] M. R. Mirza *et al.*, "Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 375, no. 22, pp. 2154–2164, Dec. 2016, doi: 10.1056/NEJMoa1611310.
- [220] P. Exman, R. Barroso-Sousa, and S. M. Tolaney, "Evidence to Date: Talazoparib in the treatment of breast cancer," *OncoTargets and Therapy*. 2019, doi: 10.2147/OTT.S184971.
- [221] "INFORME SEOM DE EVALUACIÓN DE FÁRMACOS."
- [222] H. E. Bryant and T. Helleday, "Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activates ATM which is required for subsequent homologous recombination repair," doi: 10.1093/nar/gkl108.
- [223] N. McCabe *et al.*, "Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose)



- polymerase inhibition," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 16, pp. 8109–8115, Aug. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0140.
- [224] W. G. Bottje, "Oxidative metabolism and efficiency: the delicate balancing act of mitochondria," *Poult. Sci.*, vol. 98, no. 10, pp. 4223–4230, 2019, doi: <https://doi.org/10.3382/ps/pey405>.
- [225] S. R. McKeown, "Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours - Implications for treatment response," *British Journal of Radiology*, vol. 87, no. 1035. British Institute of Radiology, Mar. 01, 2014, doi: 10.1259/bjr.20130676.
- [226] S. L. Dunwoodie, "The Role of Hypoxia in Development of the Mammalian Embryo," *Developmental Cell*, vol. 17, no. 6. Dev Cell, pp. 755–773, Dec. 15, 2009, doi: 10.1016/j.devcel.2009.11.008.
- [227] B. D. Kent, P. D. Mitchell, and W. T. McNicholas, "Hypoxemia in patients with COPD: Cause, effects, and disease progression," *International Journal of COPD*, vol. 6, no. 1. Dove Press, pp. 199–208, 2011, doi: 10.2147/COPD.S10611.
- [228] J. J. Savla, B. D. Levine, and H. A. Sadek, "The Effect of Hypoxia on Cardiovascular Disease: Friend or Foe?," *High Alt. Med. Biol.*, vol. 19, no. 2, pp. 124–130, Jun. 2018, doi: 10.1089/ham.2018.0044.
- [229] P. Ferdinand and C. Roffe, "Hypoxia after stroke: A review of experimental and clinical evidence," *Exp. Transl. Stroke Med.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2016, doi: 10.1186/s13231-016-0023-0.
- [230] B. Pang *et al.*, "Systematic Review and Meta-Analysis of the Impact of Hypoxia on Infarcted Myocardium: Better or Worse?," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 51, no. 2, pp. 949–960, Nov. 2018, doi: 10.1159/000495397.
- [231] N. S. Sanghani and V. H. Haase, "Hypoxia-Inducible Factor Activators in Renal Anemia: Current Clinical Experience," *Advances in Chronic Kidney Disease*, vol. 26, no. 4. W.B. Saunders, pp. 253–266, Jul. 01, 2019, doi: 10.1053/j.ackd.2019.04.004.
- [232] J. Grimminger, M. Richter, K. Tello, N. Sommer, H. Gall, and H. A. Ghofrani, "Thin Air Resulting in High Pressure: Mountain Sickness and Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension," 2017, doi: 10.1155/2017/8381653.
- [233] "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019 - Advanced information - NobelPrize.org."



<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2019/advanced-information/> (accessed Nov. 09, 2020).

- [234] G. L. Wang and G. L. Semenza, "General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 9, pp. 4304–4308, May 1993, doi: 10.1073/pnas.90.9.4304.
- [235] A. C. R. Epstein *et al.*, "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation," *Cell*, vol. 107, no. 1, pp. 43–54, Oct. 2001, doi: 10.1016/S0092-8674(01)00507-4.
- [236] W. G. Kaelin and P. J. Ratcliffe, "Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway," *Molecular Cell*, vol. 30, no. 4, pp. 393–402, May 23, 2008, doi: 10.1016/j.molcel.2008.04.009.
- [237] V. H. Haase, "The VHL tumor suppressor: master regulator of HIF.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 15, no. 33, pp. 3895–903, 2009, doi: 10.2174/138161209789649394.
- [238] R. Depping *et al.*, "Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin  $\alpha/\beta$  pathway," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1783, no. 3, pp. 394–404, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.12.006.
- [239] I. Rashid *et al.*, "Genome-Wide Comparative Analysis of HIF Binding Sites in *Cyprinus Carpio* for In Silico Identification of Functional Hypoxia Response Elements," *Front. Genet.*, vol. 10, no. JUN, p. 659, Jul. 2019, doi: 10.3389/fgene.2019.00659.
- [240] B. Keith, R. S. Johnson, and M. C. Simon, "HIF1  $\alpha$  and HIF2  $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression," *Nature Reviews Cancer*. 2012, doi: 10.1038/nrc3183.
- [241] I. K. Nordgren and A. Tavassoli, "Targeting tumour angiogenesis with small molecule inhibitors of hypoxia inducible factor," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 8, pp. 4307–4317, Jul. 2011, doi: 10.1039/c1cs15032d.
- [242] X. Xia and A. L. Kung, "Preferential binding of HIF-1 to transcriptionally active loci determines cell-type specific response to hypoxia," *Genome Biol.*, 2009, doi: 10.1186/gb-2009-10-10-r113.



- [243] J. S. Lee *et al.*, "Hypoxia-induced methylation of a pontin chromatin remodeling factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011, doi: 10.1073/pnas.1106106108.
- [244] J. I. Perez-Perri, M. Cockman, A. Dekanty, P. J. Ratcliffe, and P. Wappner, "Pontin and reptin: Two novel regulators of the transcriptional response to hypoxia," *Dev. Biol.*, 2011, doi: 10.1016/j.ydbio.2011.05.487.
- [245] J. M. Martí *et al.*, "The multifactorial role of PARP-1 in tumor microenvironment," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 3, 2020, doi: 10.3390/cancers12030739.
- [246] J. A. Sena, L. Wang, and C.-J. Hu, "BRG1 and BRM Chromatin-Remodeling Complexes Regulate the Hypoxia Response by Acting as Coactivators for a Subset of Hypoxia-Inducible Transcription Factor Target Genes," *Mol. Cell. Biol.*, 2013, doi: 10.1128/mcb.00731-13.
- [247] J. Wei *et al.*, "Recent Advances in the Discovery of HIF-1 $\alpha$ -p300/CBP Inhibitors as Anti-Cancer Agents," *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 18, no. 4, Jul. 2016, doi: 10.2174/1389557516666160630124938.
- [248] B. L. Ebert and H. F. Bunn, "Regulation of Transcription by Hypoxia Requires a Multiprotein Complex That Includes Hypoxia-Inducible Factor 1, an Adjacent Transcription Factor, and p300/CREB Binding Protein," *Mol. Cell. Biol.*, 1998, doi: 10.1128/mcb.18.7.4089.
- [249] S. J. Freedman *et al.*, "Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, doi: 10.1073/pnas.082117899.
- [250] J. I. Perez-Perri *et al.*, "The TIP60 Complex Is a Conserved Coactivator of HIF1A," *Cell Rep.*, 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.082.
- [251] Y. Chen, Y. Wang, and W. Luo, "ZMYND8 is a primary HIF coactivator that mediates breast cancer progression," *Mol. Cell. Oncol.*, 2018, doi: 10.1080/23723556.2018.1479619.
- [252] "Identification and characterisation of the post-translational modifications that regulate the Hypoxia Inducible Factors, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ . - The University of Liverpool Repository."



- <https://livrepository.liverpool.ac.uk/3071020/> (accessed Nov. 12, 2020).
- [253] Y. Baba *et al.*, "HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers," *Am. J. Pathol.*, 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.090972.
- [254] E. Lim, C. C. Kuo, H. F. Tu, and C. C. Yang, "The prognosis outcome of oral squamous cell carcinoma using HIF-2 $\alpha$ ," *J. Chinese Med. Assoc.*, 2017, doi: 10.1016/j.jcma.2017.06.005.
- [255] Y. Zheng, Y. Ni, X. Huang, Z. Wang, and W. Han, "Overexpression of HIF-1 $\alpha$  indicates a poor prognosis in tongue carcinoma and may be associated with tumour metastasis," *Oncol. Lett.*, 2013, doi: 10.3892/ol.2013.1185.
- [256] M. Schindl *et al.*, "Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer," *Clin. Cancer Res.*, 2002.
- [257] M. V. Liberti and J. W. Locasale, "The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?," *Trends in Biochemical Sciences*. 2016, doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.
- [258] S. S. Ali, M. Hsiao, H. W. Zhao, L. L. Dugan, G. G. Haddad, and D. Zhou, "Hypoxia-adaptation involves mitochondrial metabolic depression and decreased ROS leakage," *PLoS One*, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0036801.
- [259] R. B. Hamanaka and N. S. Chandel, "Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling," *Current Opinion in Cell Biology*. 2009, doi: 10.1016/j.ceb.2009.08.005.
- [260] A. Marin-Hernandez, J. Gallardo-Perez, S. Ralph, S. Rodriguez-Enriquez, and R. Moreno-Sanchez, "HIF-1 $\alpha$ ; Modulates Energy Metabolism in Cancer Cells by Inducing Over-Expression of Specific Glycolytic Isoforms," *Mini-Reviews Med. Chem.*, 2009, doi: 10.2174/138955709788922610.
- [261] P. Swietach, "What is pH regulation, and why do cancer cells need it?," *Cancer Metastasis Rev.*, 2019, doi: 10.1007/s10555-018-09778-x.
- [262] J. Chiche, M. C. Brahimi-Horn, and J. Pouyssegur, "Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: A common feature in cancer," *J. Cell. Mol. Med.*, 2010, doi: 10.1111/j.1582-



4934.2009.00994.x.

- [263] J. Chiche *et al.*, "Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH," *Cancer Res.*, 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2470.
- [264] L. A. Shimoda, M. Fallon, S. Pisarcik, J. Wang, and G. L. Semenza, "HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalinization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes," *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2006, doi: 10.1152/ajplung.00528.2005.
- [265] M. S. Ullah, A. J. Davies, and A. P. Halestrap, "The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 $\alpha$ -dependent mechanism," *J. Biol. Chem.*, 2006, doi: 10.1074/jbc.M511397200.
- [266] S. K. Parks, W. Mueller-Klieser, and J. Pouyssegur, "Lactate and Acidity in the Cancer Microenvironment," *Annual Review of Cancer Biology*. 2020, doi: 10.1146/annurev-cancerbio-030419-033556.
- [267] J. S. Fang, R. D. Gillies, and R. A. Gatenby, "Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression," *Seminars in Cancer Biology*. 2008, doi: 10.1016/j.semcancer.2008.03.011.
- [268] A. Riemann, B. Schneider, D. Gündel, C. Stock, M. Gekle, and O. Thews, "Acidosis promotes metastasis formation by enhancing tumor cell motility," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-3023-4\_27.
- [269] Y. J. Kwon *et al.*, "Extracellular Acidosis Promotes Metastatic Potency via Decrease of the BMAL1 Circadian Clock Gene in Breast Cancer," *Cells*, 2020, doi: 10.3390/cells9040989.
- [270] V. Huber *et al.*, "Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation," *Seminars in Cancer Biology*. 2017, doi: 10.1016/j.semcancer.2017.03.001.
- [271] F. Erra Díaz, E. Dantas, and J. Geffner, "Unravelling the interplay between extracellular acidosis and immune cells," *Mediators of Inflammation*. 2018, doi: 10.1155/2018/1218297.
- [272] M. J. Wheelock, Y. Shintani, M. Maeda, Y. Fukumoto, and K. R.



- Johnson, "Cadherin switching," *Journal of Cell Science*, vol. 121, no. 6. J Cell Sci, pp. 727–735, Mar. 15, 2008, doi: 10.1242/jcs.000455.
- [273] D. Xiao and J. He, "Epithelial mesenchymal transition and lung cancer," *Journal of Thoracic Disease*, vol. 2, no. 3. J Thorac Dis, pp. 154–159, 2010, doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2010.02.03.7.
- [274] L. M. Sherwood, E. E. Parris, and J. Folkman, "Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications," *New England Journal of Medicine*, vol. 285, no. 21. Massachusetts Medical Society, pp. 1182–1186, Nov. 18, 1971, doi: 10.1056/NEJM197111182852108.
- [275] J. A. Forsythe *et al.*, "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 9, pp. 4604–4613, Sep. 1996, doi: 10.1128/mcb.16.9.4604.
- [276] S. J. Lee *et al.*, "Angiopoietin-2 exacerbates cardiac hypoxia and inflammation after myocardial infarction," *J. Clin. Invest.*, vol. 128, no. 11, pp. 5018–5033, Nov. 2018, doi: 10.1172/JCI99659.
- [277] D. J. Ceradini *et al.*, "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1," *Nat. Med.*, vol. 10, no. 8, pp. 858–864, Aug. 2004, doi: 10.1038/nm1075.
- [278] Z.-B. Han *et al.*, "Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  directly enhances the transcriptional activity of stem cell factor (SCF) in response to hypoxia and epidermal growth factor (EGF)," *Carcinogenesis*, vol. 29, no. 10, pp. 1853–1861, 2008, doi: 10.1093/carcin/bgn066.
- [279] N. Skuli *et al.*, "Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) alters vascular function and tumor angiogenesis," *Blood*, vol. 114, no. 2, pp. 469–477, Jul. 2009, doi: 10.1182/blood-2008-12-193581.
- [280] H. Teng *et al.*, "Fucoidan suppresses hypoxia-induced lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in mouse hepatocarcinoma," *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 6, pp. 3514–3530, Jun. 2015, doi: 10.3390/md13063514.
- [281] A. R. Elia *et al.*, "Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile," *J. Leukoc. Biol.*, 2008, doi:



- 10.1189/jlb.0208082.
- [282] Q. Yang, N. Guo, Y. Zhou, J. Chen, Q. Wei, and M. Han, "The role of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor progression and relevant advance in targeted therapy," *Acta Pharm. Sin. B*, 2020, doi: 10.1016/j.apsb.2020.04.004.
- [283] A. T. Henze and M. Mazzone, "The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages," *Journal of Clinical Investigation*. 2016, doi: 10.1172/JCI84427.
- [284] E. Van Overmeire, D. Laoui, J. Keirsse, and J. A. Van Ginderachter, "Hypoxia and tumor-associated macrophages: A deadly alliance in support of tumor progression," *Oncoimmunology*, vol. 3, no. 1, 2014, doi: 10.4161/onci.27561.
- [285] J. Griss *et al.*, "B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma," *Nat. Commun.*, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12160-2.
- [286] K. E. Lee *et al.*, "Hif1a deletion reveals pro-neoplastic function of B cells in pancreatic neoplasia," *Cancer Discov.*, 2016, doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0822.
- [287] D. G. Franchina, M. Grusdat, and D. Brenner, "B-Cell Metabolic Remodeling and Cancer," *Trends in Cancer*. 2018, doi: 10.1016/j.trecan.2017.12.006.
- [288] H. Kojima, M. Sitkovsky, and M. Cascalho, "HIF-1 $\alpha$  Deficiency Perturbs T and B Cell Functions," *Curr. Pharm. Des.*, 2005, doi: 10.2174/1381612033454388.
- [289] R. Vuillefroy de Silly, P. Y. Dietrich, and P. R. Walker, "Hypoxia and antitumor CD8 $^{+}$  T cells: An incompatible alliance?," *Oncoimmunology*. 2016, doi: 10.1080/2162402X.2016.1232236.
- [290] A. M. Westendorf *et al.*, "Hypoxia enhances immunosuppression by inhibiting CD4 $^{+}$  Effector T cell function and promoting treg activity," *Cell. Physiol. Biochem.*, 2017, doi: 10.1159/000464429.
- [291] M. Parodi *et al.*, "Hypoxia modifies the transcriptome of human NK cells, modulates their immunoregulatory profile, and influences NK cell subset migration," *Front. Immunol.*, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02358.
- [292] M. Balsamo *et al.*, "Hypoxia downregulates the expression of



- activating receptors involved in NK-cell-mediated target cell killing without affecting ADCC," *Eur. J. Immunol.*, 2013, doi: 10.1002/eji.201343448.
- [293] D. K. C. Chiu *et al.*, "Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma," *Nat. Commun.*, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00530-7.
- [294] X. Z. Ye, S. C. Yu, and X. W. Bian, "Contribution of myeloid-derived suppressor cells to tumor-induced immune suppression, angiogenesis, invasion and metastasis," *Journal of Genetics and Genomics*. 2010, doi: 10.1016/S1673-8527(09)60061-8.
- [295] H. Doktorova, J. Hrabeta, M. A. Khalil, and T. Eckschlager, "Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1," *Biomed. Pap.*, 2015, doi: 10.5507/bp.2015.025.
- [296] K. Robinson and V. Tiriveedhi, "Perplexing Role of P-Glycoprotein in Tumor Microenvironment," *Frontiers in Oncology*. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00265.
- [297] Y. Lv, S. Zhao, J. Han, L. Zheng, Z. Yang, and L. Zhao, "Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  induces multidrug resistance protein in colon cancer," *Onco. Targets. Ther.*, 2015, doi: 10.2147/OTT.S82835.
- [298] J. Chen *et al.*, "HIF-1 $\alpha$  inhibition reverses multidrug resistance in colon cancer cells via downregulation of MDR1/P-Glycoprotein," *PLoS One*, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0098882.
- [299] R. Sullivan and C. H. Graham, "Hypoxia prevents etoposide-induced DNA damage in cancer cells through a mechanism involving hypoxia-inducible factor 1," *Mol. Cancer Ther.*, 2009, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-1090.
- [300] L. Flamant, A. Notte, N. Ninane, M. Raes, and C. Michiels, "Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia," *Mol. Cancer*, 2010, doi: 10.1186/1476-4598-9-191.
- [301] Š. Cipro, J. Hřebačková, J. Hraběta, J. Poljaková, and T. Eckschlager, "Valproic acid overcomes hypoxia-induced resistance to apoptosis," *Oncol. Rep.*, 2012, doi: 10.3892/or.2011.1577.
- [302] X. W. Liu *et al.*, "HIF-1 $\alpha$ -dependent autophagy protects HeLa cells from fenretinide (4-HPR)-induced apoptosis in hypoxia,"



- Pharmacol. Res.*, 2010, doi: 10.1016/j.phrs.2010.07.002.
- [303] E. J. Hall and A. J. Giaccia, *Radiobiology for the radiologist: Seventh edition*. 2012.
- [304] P. E. Porporato, S. Dhup, R. K. Dadhich, T. Copetti, and P. Sonveaux, "Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: A comprehensive review," *Front. Pharmacol.*, 2011, doi: 10.3389/fphar.2011.00049.
- [305] K. L. Eales, K. E. R. Hollinshead, and D. A. Tennant, "Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells," *Oncogenesis*, 2016, doi: 10.1038/oncsis.2015.50.
- [306] D. Samanta and G. L. Semenza, "Serine synthesis helps hypoxic cancer stem cells regulate redox," *Cancer Research*. 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1730.
- [307] A. Fidoamore *et al.*, "Glioblastoma Stem Cells Microenvironment: The Paracrine Roles of the Niche in Drug and Radioresistance," *Stem Cells Int.*, 2016, doi: 10.1155/2016/6809105.
- [308] Y. Liu, A. M. Bernauer, C. M. Yingling, and S. A. Belinsky, "HIF1 $\alpha$  regulated expression of XPA contributes to cisplatin resistance in lung cancer," *Carcinogenesis*, 2012, doi: 10.1093/carcin/bgs142.
- [309] J. H. Um *et al.*, "Association of DNA-dependent protein kinase with hypoxia inducible factor-1 and its implication in resistance to anticancer drugs in hypoxic tumor cells," *Exp. Mol. Med.*, 2004, doi: 10.1038/emm.2004.32.
- [310] L. Holdstock *et al.*, "Four-week studies of oral hypoxia-inducible factor–prolyl hydroxylase inhibitor GSK1278863 for treatment of anemia," *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2016, doi: 10.1681/ASN.2014111139.
- [311] I. Flamme, F. Oehme, P. Ellinghaus, M. Jeske, J. Keldenich, and U. Thuss, "Mimicking hypoxia to treat anemia: HIF-stabilizer BAY 85-3934 (molidustat) stimulates erythropoietin production without hypertensive effects," *PLoS One*, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0111838.
- [312] M. M. Tambuwala, M. C. Manresa, E. P. Cummins, V. Aversa, I. S. Coulter, and C. T. Taylor, "Targeted delivery of the hydroxylase inhibitor DMOG provides enhanced efficacy with reduced systemic exposure in a murine model of colitis," *J. Control.*



- Release*, 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.09.022.
- [313] E. P. Cummins *et al.*, "The Hydroxylase Inhibitor Dimethyloxalylglycine Is Protective in a Murine Model of Colitis," *Gastroenterology*, 2008, doi: 10.1053/j.gastro.2007.10.012.
- [314] W. Bao *et al.*, "Chronic inhibition of hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase improves ventricular performance, remodeling, and vascularity after myocardial infarction in the rat," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2010, doi: 10.1097/FJC.0b013e3181e2bfef.
- [315] M. Vogler *et al.*, "Pre- and post-conditional inhibition of prolyl-4-hydroxylase domain enzymes protects the heart from an ischemic insult," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, 2015, doi: 10.1007/s00424-014-1667-z.
- [316] R. R. Ratan *et al.*, "Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke," *Journal of Molecular Medicine*. 2007, doi: 10.1007/s00109-007-0283-1.
- [317] R. Speer and R. R. Ratan, "Hypoxic adaptation in the nervous system: Promise for novel therapeutics for acute and chronic neurodegeneration," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016.
- [318] J. Fallah and B. I. Rini, "HIF Inhibitors: Status of Current Clinical Development," *Current Oncology Reports*. 2019, doi: 10.1007/s11912-019-0752-z.
- [319] T. K. Choueiri *et al.*, "Phase III study of the hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) inhibitor MK-6482 versus everolimus in previously treated patients with advanced clear cell renal cell carcinoma (ccRCC).," *J. Clin. Oncol.*, 2020, doi: 10.1200/jco.2020.38.15\_suppl.tps5094.
- [320] Lowry, "Lowry Protein Assay," *J. Biol. Chem.*, 1951.
- [321] E. Andrés-León, R. Núñez-Torres, and A. M. Rojas, "miARma-Seq: A comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis," *Sci. Rep.*, 2016, doi: 10.1038/srep25749.
- [322] H. Li and R. Durbin, "Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform," *Bioinformatics*, 2009, doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
- [323] E. Cerami *et al.*, "The cBio Cancer Genomics Portal: An open



- platform for exploring multidimensional cancer genomics data," *Cancer Discov.*, 2012, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.
- [324] J. M. Rodríguez-Vargas, F. J. Oliver-Pozo, and F. Dantzer, "PARP1 and poly(ADP-ribosyl)ation signaling during autophagy in response to nutrient deprivation," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019, doi: 10.1155/2019/2641712.
- [325] J. P. Gagné *et al.*, "Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes," *Nucleic Acids Res.*, 2008, doi: 10.1093/nar/gkn771.
- [326] Jin Cai Luo and M. Shibuya, "A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  and 3 $\alpha$ )," *Oncogene*, 2001, doi: 10.1038/sj.onc.1204228.
- [327] J. Schödel, S. Oikonomopoulos, J. Ragoussis, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, and D. R. Mole, "High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq," *Blood*, 2011, doi: 10.1182/blood-2010-10-314427.
- [328] T. L. Bailey and E. C. "Fitting a mixture model b... [Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol. 1994] - PubMed - NCBI," *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.*, 1994.
- [329] K. B. Leszczynska *et al.*, "Mechanisms and consequences of ATMIN repression in hypoxic conditions: Roles for p53 and HIF-1," *Sci. Rep.*, 2016, doi: 10.1038/srep21698.
- [330] E. M. Hammond, M. R. Kaufmann, and A. J. Giaccia, "Oxygen sensing and the DNA-damage response," *Current Opinion in Cell Biology*. 2007, doi: 10.1016/j.ceb.2007.10.002.
- [331] I. P. Foskolou *et al.*, "Ribonucleotide Reductase Requires Subunit Switching in Hypoxia to Maintain DNA Replication," *Mol. Cell*, 2017, doi: 10.1016/j.molcel.2017.03.005.
- [332] I. Campillo-Marcos and P. A. Lazo, "Olaparib and ionizing radiation trigger a cooperative DNA-damage repair response that is impaired by depletion of the VRK1 chromatin kinase," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2019, doi: 10.1186/s13046-019-1204-1.
- [333] N. Chan *et al.*, "Contextual synthetic lethality of cancer cell kill based on the tumor microenvironment," *Cancer Res.*, 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2352.



- [334] P. Hernansanz-Agustín *et al.*, "Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells," *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.011.
- [335] Y.-T. Wu, S.-B. Wu, and Y.-H. Wei, "Metabolic Reprogramming of Human Cells in Response to Oxidative Stress: Implications in the Pathophysiology and Therapy of Mitochondrial Diseases," *Curr. Pharm. Des.*, 2014, doi: 10.2174/1381612820666140306103401.
- [336] P. Li *et al.*, "Redox homeostasis protects mitochondria through accelerating ROS conversion to enhance hypoxia resistance in cancer cells," *Sci. Rep.*, 2016, doi: 10.1038/srep22831.
- [337] N. S. Chandel *et al.*, "Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: A mechanism of O<sub>2</sub> sensing," *J. Biol. Chem.*, 2000, doi: 10.1074/jbc.M001914200.
- [338] M. A. C. Déry, M. D. Michaud, and D. E. Richard, "Hypoxia-inducible factor 1: Regulation by hypoxic and non-hypoxic activators," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2005, doi: 10.1016/j.biocel.2004.08.012.
- [339] D. Wang, D. Malo, and S. Hekimi, "Elevated Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation Affects the Immune Response via Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in Long-Lived Mcl<sup>k1</sup> +/- Mouse Mutants," *J. Immunol.*, 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0902352.
- [340] J. K. Brunelle *et al.*, "Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation," *Cell Metab.*, 2005, doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.002.
- [341] C. Schroedl, D. S. McClintock, G. R. S. Budinger, and N. S. Chandel, "Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 $\alpha$  requires mitochondrial reactive oxygen species," *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2002, doi: 10.1152/ajplung.00014.2002.
- [342] K. D. Mansfield *et al.*, "Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- $\alpha$  activation," *Cell Metab.*, 2005, doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.003.
- [343] K. R. Luoto, R. Kumareswaran, and R. G. Bristow, "Tumor hypoxia as a driving force in genetic instability," *Genome Integrity*. 2013,



- doi: 10.1186/2041-9414-4-5.
- [344] I. Kirmes *et al.*, "A transient ischemic environment induces reversible compaction of chromatin," *Genome Biol.*, 2015, doi: 10.1186/s13059-015-0802-2.
- [345] Z. Bencokova, M. R. Kaufmann, I. M. Pires, P. S. Lecane, A. J. Giaccia, and E. M. Hammond, "ATM Activation and Signaling under Hypoxic Conditions," *Mol. Cell. Biol.*, 2009, doi: 10.1128/mcb.01301-08.
- [346] E. B. Rankin, A. J. Giaccia, and E. M. Hammond, "Bringing H2AX into the Angiogenesis Family," *Cancer Cell*. 2009, doi: 10.1016/j.ccr.2009.05.004.
- [347] G. G. Poirier, G. de Murcia, J. Jongstra-Bilen, C. Niedergang, and P. Mandel, "Poly (ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1982, doi: 10.1073/pnas.79.11.3423.
- [348] T. L. Bailey *et al.*, "MEME Suite: Tools for motif discovery and searching," *Nucleic Acids Res.*, 2009, doi: 10.1093/nar/gkp335.
- [349] P. Prickaerts *et al.*, "Hypoxia increases genome-wide bivalent epigenetic marking by specific gain of H3K27me3," *Epigenetics and Chromatin*, 2016, doi: 10.1186/s13072-016-0086-0.
- [350] H. Chen, Y. Yan, T. L. Davidson, Y. Shinkai, and M. Costa, "Hypoxic stress induces dimethylated histone H3 lysine 9 through histone methyltransferase G9a in mammalian cells," *Cancer Res.*, 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0101.
- [351] M. Batie, L. del Peso, and S. Rocha, "Hypoxia and chromatin: A focus on transcriptional repression mechanisms," *Biomedicines*. 2018, doi: 10.3390/biomedicines6020047.
- [352] M. R. Ng and R. K. Jain, "Hypoxia-induced DNA hypermethylation: Another reason to normalize tumor vessels," *Translational Cancer Research*. 2016, doi: 10.21037/tcr.2016.12.72.
- [353] C. J. Schofield and P. J. Ratcliffe, "Oxygen sensing by HIF hydroxylases," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004, doi: 10.1038/nrm1366.
- [354] A. A. Chakraborty *et al.*, "Histone demethylase KDM6A directly senses oxygen to control chromatin and cell fate," *Science (80-. )*.,



- 2019, doi: 10.1126/science.aaw1026.
- [355] M. Batie, J. Frost, M. Frost, J. W. Wilson, P. Schofield, and S. Rocha, "Hypoxia induces rapid changes to histone methylation and reprograms chromatin," *Science* (80-. ), 2019, doi: 10.1126/science.aau5870.
- [356] E. M. Sánchez-Fernández *et al.*, "Investigations on the oxygen dependence of a 2-oxoglutarate histone demethylase," *Biochem. J.*, 2013, doi: 10.1042/BJ20121155.
- [357] B. Thienpont *et al.*, "Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity," *Nature*, 2016, doi: 10.1038/nature19081.
- [358] A. Y. Tan and J. L. Manley, "The TET family of proteins: Functions and roles in disease," *Journal of Molecular Cell Biology*. 2009, doi: 10.1093/jmcb/mjp025.
- [359] C. Thomas *et al.*, "Hit and run versus long-term activation of PARP-1 by its different domains fine-tunes nuclear processes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2019, doi: 10.1073/pnas.1901183116.
- [360] N. Nalabothula *et al.*, "Genome-wide profiling of PARP1 reveals an interplay with gene regulatory regions and DNA methylation," *PLoS One*, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0135410.
- [361] N. Lodhi, A. V. Kossenkov, and A. V. Tulin, "Bookmarking promoters in mitotic chromatin: Poly(ADP-ribose)polymerase-1 as an epigenetic mark," *Nucleic Acids Res.*, 2014, doi: 10.1093/nar/gku415.
- [362] T. Guastafierro *et al.*, "CCCTC-binding factor activates PARP-1 affecting DNA methylation machinery," *J. Biol. Chem.*, 2008, doi: 10.1074/jbc.M801170200.
- [363] M. Zampieri *et al.*, "ADP-ribose polymers localized on Ctfp-Parp1-Dnmt1 complex prevent methylation of Ctfp target sites," *Biochem. J.*, 2012, doi: 10.1042/BJ20111417.
- [364] A. Reale, G. De Matteis, G. Galleazzi, M. Zampieri, and P. Caiafa, "Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers," *Oncogene*, 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208005.
- [365] R. Krishnakumar and W. L. Kraus, "PARP-1 Regulates Chromatin



- Structure and Transcription through a KDM5B-Dependent Pathway," *Mol. Cell*, 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.014.
- [366] K. Fujiki, A. Shinoda, F. Kano, R. Sato, K. Shirahige, and M. Murata, "PPAR $\gamma$ -induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine," *Nat. Commun.*, 2013, doi: 10.1038/ncomms3262.
- [367] F. Ciccarone, E. Valentini, M. Zampieri, and P. Caiafa, "5mC-hydroxylase activity is influenced by the PARylation of TET1 enzyme," *Oncotarget*, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.4476.
- [368] K. L. Zobeck, M. S. Buckley, W. R. Zipfel, and J. T. Lis, "Recruitment Timing and Dynamics of Transcription Factors at the Hsp70 Loci in Living Cells," *Mol. Cell*, 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.022.
- [369] M. Ikura *et al.*, "Coordinated Regulation of TIP60 and Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 in Damaged-Chromatin Dynamics," *Mol. Cell. Biol.*, 2016, doi: 10.1128/mcb.01085-15.
- [370] H. Chen, P. D. Ruiz, L. Novikov, A. D. Casill, J. W. Park, and M. J. Gamble, "MacroH2A1.1 and PARP-1 cooperate to regulate transcription by promoting CBP-mediated H2B acetylation," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2014, doi: 10.1038/nsmb.2903.
- [371] L. Verdone, M. La Fortezza, F. Ciccarone, P. Caiafa, M. Zampieri, and M. Caserta, "Poly(ADP-ribosyl)ation affects histone acetylation and transcription," *PLoS One*, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0144287.
- [372] D. Schübeler, "Function and information content of DNA methylation," *Nature*. 2015, doi: 10.1038/nature14192.
- [373] J. M. Rawling and R. Alvarez-Gonzalez, "TFIIF, a basal eukaryotic transcription factor, is a substrate for poly(ADP-ribosyl)ation," *Biochem. J.*, 1997, doi: 10.1042/bj3240249.
- [374] E. Slattery, J. D. Dignam, T. Matsui, and R. G. Roeder, "Purification and analysis of a factor which suppresses nick-induced transcription by RNA polymerase II and its identity with poly(ADP-ribose) polymerase.," *J. Biol. Chem.*, 1983, doi: 10.1016/S0021-9258(20)81989-9.
- [375] M. Meisterernst, G. Stelzer, and R. G. Roeder, "Poly(ADP-ribose) polymerase enhances activator-dependent transcription in vitro," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, doi: 10.1073/pnas.94.6.2261.



- [376] E. A. Matveeva, Q. M. H. Al-Tinawi, E. C. Rouchka, and Y. N. Fondufe-Mittendorf, "Coupling of PARP1-mediated chromatin structural changes to transcriptional RNA polymerase II elongation and cotranscriptional splicing," *Epigenetics and Chromatin*, 2019, doi: 10.1186/s13072-019-0261-1.
- [377] D. C. Di Giammartino, Y. Shi, and J. L. Manley, "PARP1 Represses PAP and Inhibits Polyadenylation during Heat Shock," *Mol. Cell*, 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.005.
- [378] M. Bilal Iqbal *et al.*, "PARP-14 combines with tristetraprolin in the selective posttranscriptional control of macrophage tissue factor expression," *Blood*, 2014, doi: 10.1182/blood-2014-07-588046.
- [379] E. Tanaka, T. L. Bailey, and U. Keich, "Improving MEME via a two-tiered significance analysis," *Bioinformatics*, 2014, doi: 10.1093/bioinformatics/btu163.
- [380] T. L. Bailey, J. Johnson, C. E. Grant, and W. S. Noble, "The MEME Suite," *Nucleic Acids Res.*, 2015, doi: 10.1093/nar/gkv416.
- [381] S. I. Hajdu, "A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1," *Cancer*, vol. 117, no. 5, pp. 1097–1102, Mar. 2011, doi: 10.1002/cncr.25553.