



TRABAJO FINAL DE TESIS DOCTORADO EN QUÍMICA

Título: ESTUDIO DEL MICROAMBIENTE HIPÓXICO Y DEL METABOLISMO LIPÍDICO DEL CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (CRCC)

Tesista: Bqco. Juan Pablo Melana Colavita

Directora: Dra. María Victoria Aguirre

Co-director: Dr. Juan Pablo Rodríguez

Lugar de Trabajo:

Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Medicina (LIBIM). Instituto de Química Básica y Aplicada del Nordeste Argentino (IQUIBA-NEA). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Universidad Nacional del Nordeste (UNNE)

Argentina 2021

Dedico esta tesis a mis Padres...

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral no hubiese sido posible sin el apoyo de tres instituciones fundamentales: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

Al concluir esta importante etapa de mi vida, quisiera dejar constancia de mi agradecimiento a todos aquellos que siempre estuvieron a mi lado, dándome fuerzas para seguir y no abandonar. En primer lugar, quiero agradecer a mis estimados directores, la ***Dra. María Victoria Aguirre*** y el ***Dr. Juan Pablo Rodríguez***, quienes me invitaron a caminar en la investigación, me guiaron y formaron en dicha vocación, y mediante sus virtudes, paciencia y constancia me permitieron lograr este trabajo. También quiero agradecer al ***Dr. Juan Santiago Todaro***, por brindarme el conocimiento en diversas técnicas y por mantener el orden del laboratorio, sin ello el camino hubiese costado el doble... o más.

Que sería de mí sin esas benditas CAKIs... Muchas gracias por tu gran colaboración ***Tania Stoyanoff***, sin esa gran ayuda esto no sería posible.

Gabriela Olea...muchas gracias por tu asistencia y enseñanzas con las ICQ e IHQ.

Mis colegas de trabajo, mis compañeros de cultivos, muy próximamente Dres....***Tamara Barnes*** y ***Leandro Ferrini***, muchas gracias por su apoyo y colaboración en esta tesis, siempre brindándome una mano en esos repiques y principalmente en lo molecular. Agradezco también por el acompañamiento en estos años a mis compañeras de lab., ***Florencia Rodríguez***, ***Patricia Romero*** y ***Narella Colussi***.

¡Muchas gracias a todo ese gran equipo de trabajo que conforma el ***LIBIM!***

Por otro lado, no quiero dejar de agradecer a los ***Dres. Francesco Mignolli***, ***Carlos Davio*** y ***Jesús Balsinde*** por abrirme las puertas de sus laboratorios en estancias de pasantías necesarias para lograr este trabajo; así también al servicio de nefrología y anatomía patológica del hospital J. R. Vidal, por brindarnos su tiempo y las muestras requeridas para este trabajo.

Y finalmente agradecer a mi Familia, mis hermanas ***Agus*** y ***Lu***, mi tía ***Ángela*** y mi querida ***Aline***, un profundo agradecimiento por el aguante todos estos años; y por sobre todo a ustedes mis padres ***Omar*** y ***Margarita*** que sin ustedes nada de esto sería posible, gracias por inspirarme día a día.

Gracias...

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado, un
esfuerzo total es una victoria completa”*

Mahatma Gandhi

Publicaciones generadas a partir de esta tesis

1. Stoyanoff, T.R., Rodríguez, J.P., Todaro, J.S., Espada, J.D., **Melana Colavita, J.P.**, Brandan, N.C., Torres, A.M., Aguirre, M.V., 2016. Tumor biology of non-metastatic stages of clear cell renal cell carcinoma; overexpression of stearyl desaturase-1, EPO/EPO-R system, and hypoxia-related proteins. *Tumor Biol.* 37, 13581–13593. doi:10.1007/s13277-016-5279-4
2. **Melana Colavita, J.P.**, Rodríguez, J.P., Stoyanoff, T.R., Espada, J.D., Todaro, J.S., Aguirre, M.V., 2016. Optimización de cultivos primarios de células de carcinoma renal de células claras como modelo “*in vitro*” para estudios metabólicos y determinantes de progresión neoplásica. *Medicina* - UNNE XXXVI, 6–17.
3. **Melana Colavita, J.P.**, Todaro, J.S., de Sousa, M., May, M., Gómez, N., Yaneff, A., Di Siervi, N., Aguirre, M.V., Guijas, C., Ferrini, L., Davio, C., Rodríguez, J.P., 2020. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and is essential to regulate cell proliferation. *Int. J. Biol. Macromol.* 161, 836–847. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.106
4. **Melana Colavita, J.P.**; Mignolli, F.; Stoyanoff, T.; Aguirre, M. V; Balboa, M.A.; Balsinde, J.; Pablo Rodríguez, J. The Hypoxic Microenvironment Induces Stearyl-CoA Desaturase-1 Overexpression and Lipidomic Profile Changes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancers.* 2021, 13, 1–15, doi:10.3390/cancers13122962.

Presentaciones en reuniones científicas

1. “La proteína de resistencia a múltiples fármacos de tipo 4 (MRP4) se sobreexpresa en el carcinoma renal de células claras y es esencial para regular la proliferación celular”. Primer autor. LII reunión anual y primer congreso virtual de la asociación argentina de farmacología experimental (AAFE) (Modalidad Virtual). Fecha: 20 – 23 de octubre de 2020. Lugar: Buenos Aires y Córdoba – Argentina. Publicado en el libro de resúmenes de la SAFE. ISSN 2250-4079, página 48.
2. “La hipoxia celular induce la sobreexpresión de Esteroil CoA Desaturasa 1 (SCD-1) y cambios lipídicos en CRCC”. Primer autor. XXV reuniones de comunicaciones científicas y tecnológicas. Jornadas UNNE-INVESTIGA. Organizado por Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE. Campus Deodoro Roca. Corrientes 13 y 14 de junio de 2019.
3. “Evaluación de la Expresión de la Proteína de Resistencia a Múltiples Fármacos de Tipo 4 (MRP4) en el Carcinoma Renal de Células Claras”. 1^{er} Autor. Presentado en las XII Jornada Internacional de Ciencia y Tecnología - X Jornada de Becarios y Tesistas. Facultad de Odontología - UNNE. Corrientes – Argentina. Fecha: 13 de octubre de 2017. Libro de resúmenes ISBN: 978-987-3619-21-2
4. “Multidrug Resistance Protein 4/ ATP binding cassette transporter 4 is overexpressed clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)”. Primer autor. Annual meeting Argentine society for clinical investigation (SAIC) - LXIV annual meeting Argentine society of immunology (SAI) - XLVIII annual meeting Argentine society of Experimental pharmacology (SAFE). Fecha: 16-19 de noviembre de 2016. Lugar: Mar del Plata. Suplemento revista Medicina Buenos Aires, Vol. 76, supl I.
5. “Evaluación preliminar del perfil lipídico y expresión de Esteroil CoA Desaturasa – 1 en células de carcinoma renal”. Primer autor. AUGM (Asociación de Universidades Grupo Montevideo). Fecha: 24-26 de octubre de 2016. Lugar: Brasil – São Pedro (São Paulo). Declarado de interés legislativo por la cámara de diputados de la provincia del Chaco, según resolución N° 1976.
6. “Rol de Esteroil CoA Desaturasa-1 en la Composición de Ácidos Grasos de Diferentes Lípidos en Carcinoma Renal de Células Claras”. Primer autor. XI jornada Internacional de

Ciencia y Tecnología y IX jornada de Becarios y Tesistas. Fechas: 13 de octubre de 2016.

Lugar: Facultad de Odontología de la UNNE. Corrientes, Argentina.

Abreviaturas y acrónimos

ACAT: Acetil-CoA colesterol acetil transferasa

ACC: Acetil-CoA carboxilasa

ACL: ATP-citrato liasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia/complementario.

AMP: Adenosina monofosfato

AMPC: Adenosina monofosfato cíclico

BODIPY: 4,4-difluoro-1, 3, 5, 7, 8- pentametil – 4 – bora - 3a, 4a – diazo – s – indaceno

BSA: Albumina de suero bovino.

CE: Ester de colesterol

CCR: Carcinoma de células renales

CRCC: Carcinoma renal de células claras

DAG: Diacilglicerol

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DEPC: Dietilpirocarbonato

FA: Ácido graso

FAME: Ester metílico del ácido graso

FAS: Ácido graso sintetasa

FFA: Ácido graso libre

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FSK: Forskolina

GC: Cromatografía gaseosa

GPCR: Receptor acoplado a proteína G.

HIF-1/2: Factor inducible por hipoxia de tipo 1 o 2.

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina

LC: Cromatografía líquida

LD: Lipid droplet (gota lipídica)

MRP4: Proteína de resistencia a múltiples fármacos de tipo 4

MS: Espectrometría de masa

mTOR: Blanco de Rapamicina en mamíferos

MUFA: Ácido graso monoinsaturado

OATP4C1: Transportador de aniones orgánicos portadores de soluto de la familia 4C1.

PBS: Tampón/buffer fosfato salino

PI: Ioduro de Propidio

PLs: Fosfolípidos

PUFA: Ácido graso poliinsaturado

RIA: Radioinmunoanálisis

SCD-1: Esteroil CoA desaturasa de tipo 1

SDS – PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SFA: Ácido graso saturado

SFB: Suero fetal bovino

SREBPs: Proteínas de unión al elemento regulador de esteroides.

STP: Estaurosporina

TAG: Triacilgliceridos

TBE: Tris-Borato-EDTA

TLC: Cromatografía en capa fina.

VHL: Von Hippel Lindau

RESUMEN

El cáncer de riñón representa el 2,5% de todos los cánceres, con una incidencia mundial de 300.000 casos, los cuales conducen a 111.000 óbitos anuales. El carcinoma renal de células claras (CRCC) es el subtipo más común de carcinoma de células renales (CCR), denominado de esta manera por el aspecto claro del citoplasma celular, consecuencia del alto contenido lipídico.

Aunque en la actualidad se están diseñando y aplicando nuevos tratamientos terapéuticos basados en la combinación de inhibidores de tirosina quinasa e inmunoterapias, el CRCC se presenta como una entidad oncológica compleja de difícil predicción.

Existe, por lo tanto, un gran interés de conocer las bases moleculares de la biología tumoral del CRCC, lo cual podría contribuir a una mejor comprensión del comportamiento biológico agresivo de este cáncer e identificar biomarcadores tempranos de la enfermedad, así como también blancos terapéuticos que frenen la proliferación de este tipo de células malignas.

El objetivo general de esta tesis doctoral consistió en estudiar las moléculas involucradas en el microambiente hipóxico del CRCC y profundizar en los roles de la esteroil CoA desaturasa de tipo 1 (SCD-1) y de la proteína de resistencia a múltiples fármacos de tipo 4 (MRP4) en la regulación de la proliferación tumoral, con el objeto de validarlos como posibles dianas terapéuticas o biomarcadores diagnósticos y/o predictivos de esta afección maligna.

SCD-1 cataliza la introducción de un doble enlace en varios acil-CoA grasos saturados, principalmente esteroil-CoA, para sintetizar ácido oleico (18:1n-9). Este producto enzimático participa en la proliferación, señalización e invasividad de las células tumorales. Mientras que MRP4, expresado débilmente en la membrana apical de los túbulos renales contorneados proximales, se encarga de bombear una serie de compuestos exógenos y endógenos del espacio intracelular al extracelular. Entre los componentes que extruye MRP4 se encuentran diversos fármacos antitumorales y el AMPc (importante segundo mensajero implicado en procesos de proliferación celular).

Es así, que, en este trabajo, se presenta información novedosa respecto a la biología tumoral del CRCC, en la cual se aborda el estudio del microambiente hipóxico y su influencia sobre la expresión/actividad de un conjunto de proteínas implicadas en los procesos de proliferación, supervivencia y apoptosis de células tumorales. Por lo tanto, se han estudiado a través de estudios multiparamétricos: los factores inducibles por hipoxia de tipo 1 y 2 (HIF-1 α y HIF-2 α),

eritropoyetina y su receptor (EPO y EPO-R), el factor de crecimiento endotelial vascular y su receptor (VEGF y VEGFR-2), SCD-1 y MRP4.

La metodología de trabajo incluyó diversas técnicas, entre ellas: cultivos celulares, biología molecular, Western blot, inmunohistoquímica e inmunocitoquímica, ensayos de viabilidad y proliferación celular, radioinmunoensayos, espectrometría de masas, citometría de flujo y microscopias (óptica, fluorescente directa y confocal).

Los resultados obtenidos revelaron que HIF-1 α , EPO, EPO-R, VEGF, VEGFR-2, SCD-1 y MRP4 fueron sobreexpresados en la mayoría de las muestras tumorales de CRCC obtenidas por nefrectomía. Las relaciones directamente proporcionales entre los pares HIF-1 α /SCD-1 y SCD-1/Ki-67 sugirieron un vínculo entre estas moléculas, implicadas en la progresión tumoral en primeras etapas del CRCC.

Los análisis lipidómicos de los tumores y las líneas celulares de CRCC, demostraron que el 18:1n-9 fue uno de los principales ácidos grasos comprometidos y particularmente el más abundante en la fracción de lípidos neutros en el core tumoral. Utilizando un modelo *in vitro* de hipoxia química sobre la línea celular CAKI-2 (línea de CRCC), se halló una sobreexpresión de SCD-1. El aumento en la expresión de SCD-1 causó un incremento en los niveles de 18:1n-9, que a su vez, se acumuló en la fracción lipídica neutra. La inhibición farmacológica de SCD-1 bloqueó la síntesis de 18:1n-9 y comprometió la proliferación celular. Mientras que la adición de 18:1n-9 exógeno a las células revirtió los efectos de la inhibición enzimática sobre la proliferación celular.

Por otra parte, también se encontró una sobreexpresión de MRP4 al utilizar el modelo *in vitro* de hipoxia química sobre la línea celular CAKI-2. El bloqueo farmacológico de MRP4 en células CAKI-2, generó un desequilibrio en el metabolismo del AMPc, induciendo la detención del ciclo celular, cambios en la composición de lípidos, aumento de lipid droplets (LD) citoplasmáticos y finalmente la apoptosis.

Estos datos revelan por primera vez que, tanto SCD-1, enzima clave de los niveles de ácido oleico, como MRP4, moduladora de las concentraciones intracelulares de AMPc, son proteínas cruciales de control de dos procesos bioquímicos coexistentes vinculados a la proliferación de células tumorales y sensibles a la hipoxia.

En conclusión, durante el desarrollo de esta tesis se comprobó que las dos proteínas estudiadas, SCD-1 y MRP4 presentaron firmes evidencias experimentales para ser utilizadas como posibles biomarcadores y/o blancos terapéuticos para CRCC.

ABSTRACT

Kidney cancer represents 2.5% of all cancer tumors, with a worldwide incidence of 300,000 cases, which lead to 111,000 deaths annually. Clear cell renal carcinoma (CRCC) is the most common histological subtype of renal cell carcinoma (CRC). Its name indicates the clear appearance of the cell cytoplasm, due to the high lipid content, observed in this cancer.

Although new therapeutic strategies are currently being designed (a combination of tyrosine kinase inhibitors and immunotherapies), CRCC appears as a complex oncological entity that is difficult to predict.

Thus, there is great interest to know the molecular bases of the tumor biology of CRCC, which could contribute to a better understanding of the aggressive biological behavior of this cancer and identify early biomarkers, as well as therapeutic targets that stop the proliferation of this type of malignant cells.

The objective of this doctoral thesis was to study the molecules involved in the hypoxic microenvironment of CRCC and to delve into the role of stearoyl CoA desaturase type 1 (SCD-1) and multidrug resistance protein type 4 (MRP4) in the regulation of tumor proliferation, in order to validate them as possible therapeutic targets or diagnostic and / or predictive biomarkers of this malignant condition.

SCD-1 catalyzes the introduction of a double bond in several saturated fatty acyl-CoAs, mainly stearoyl-CoA, to synthesize oleic acid (18:1n-9). This enzymatic product participates in the proliferation, signaling and invasiveness of tumor cells. On the other hand, MRP4 is weakly expressed in the apical membrane of the proximal convoluted renal tubules and is responsible for pumping exogenous and endogenous compounds from the intracellular to the extracellular space. Among the components that MRP4 extrudes are antitumor drugs and cAMP (second messenger involved in cell proliferation processes).

This thesis provides novel information regarding the tumor biology of the CRCC, focused on the hypoxic microenvironment and its influence on the expression / activity of a set of proteins involved in the processes of proliferation, survival and apoptosis of tumor cells. Thus, type 1 and 2 hypoxia-inducible factors (HIF-1 α and HIF-2 α), erythropoietin and its receptor (EPO and EPO-R), vascular endothelial growth factor and its receptor (VEGF and VEGFR-2), SCD-1 and MRP4 were studied through multiparametric studies.

Materials and methods included: cell cultures, qPCR, Western blot, immunohistochemistry and immunocytochemistry, cell viability and proliferation assays, radioimmunoassays, mass

spectrometry, flow cytometry and various microscopic techniques (optical, direct fluorescent and confocal) .

The results obtained revealed that HIF-1 α , EPO, EPO-R, VEGF, VEGFR-2, SCD-1 and MRP4 were overexpressed in most CRCC tumor samples obtained by nephrectomy. The directly proportional relationships between the HIF-1 α / SCD-1 and SCD-1 / Ki-67 pairs suggested a link between these molecules, involved in early-stage tumor progression of CRCC.

Lipidomic analyzes of tumors and CRCC cell lines showed that 18:1n-9 is increased in these tumors and is particularly abundant in the neutral lipid fraction in the tumor center. Using an *in vitro* model of chemical hypoxia on CAKI-2 cell line (CRCC line), we found a SCD-1 overexpression. This caused an increase in 18:1n-9 levels, which, in turn, was accumulated in the neutral lipid fraction. The pharmacological inhibition of SCD-1 blocked the 18:1n-9 synthesis and compromised cell proliferation, demonstrating its importance in the process.

On the other hand, a MRP4 overexpression was also found when using the *in vitro* model of chemical hypoxia on CAKI-2 cell line. The pharmacological blockade of this transporter in CAKI-2 cells, generated an imbalance in cAMP metabolism, and induced the arrest of the cell cycle, changes in lipid composition, increase in cytoplasmic lipid droplets and finally apoptosis.

These data reveal for the first time that both SCD-1, a key enzyme for the synthesis of oleic acid, and MRP4, which modulates intracellular cAMP concentrations, are both crucial control proteins of two coexisting biochemical processes linked to the proliferation of tumor cells and sensitive to hypoxia.

In conclusion, during the development of this thesis, it was found that the two proteins studied, SCD-1 and MRP4, presented strong experimental evidence to be used as possible biomarkers and / or therapeutic targets for CRCC.

ÍNDICE

CAPITULO 1 - INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estructura renal	2
1.2. Función renal	2
1.3. Carcinoma renal de células claras (CRCC)	3
1.4. Estadificación de los CRCC	4
1.5. CRCC e hipoxia	5
1.6. CRCC y el metabolismo lipídico	8
1.7. Implicancia del AMPc en cáncer	13
1.8. Regulación del AMPc	14
1.9. Transportadores ABCC/MRP asociados al cáncer	15
1.10. Características generales de MRP4	17
1.11. OATP4C1: ¿Otro transportador implicado?	19
1.12. Dianas terapéuticas y biomarcadores	20
CAPITULO 2 - HIPOTESIS	23
CAPITULO 3 - OBJETIVOS	25
3.1. OBJETIVO GENERAL	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
CAPITULO 4 - MATERIALES Y METODOLOGÍAS	27
4.1. Pacientes, información clínico-patológica y muestreo de CRCC	28
4.2. Inmunodetección de proteínas (Western Blot)	28
4.2.1. Obtención de homogeneizados celulares y de tejido	28
4.2.2. Cuantificación de proteínas – Técnica de Bradford	29
4.2.3. SDS-PAGE	29
4.2.4. Transferencia e inmunodetección	29
4.2.5. Anticuerpos y diluciones utilizadas	30
4.3. Inmunohistoquímica (IHQ)	30
4.4. Cultivos celulares	32
4.4.1. Cultivos de líneas celulares	32
4.4.2. Cultivos primarios de CRCC	33
4.5. Tinción Red oil	34
4.6. Inmunocitoquímica (ICQ)	34

4.7.	<i>Extracción - purificación de ARN y RT-qPCR</i>	35
4.7.1.	Extracción de ARN	35
4.7.2.	Purificación del ARN	35
4.7.3.	Retrotranscripción	36
4.7.4.	PCR convencional	36
4.7.5.	Electroforesis en gel de agarosa	36
4.7.6.	PCR cuantitativa (qPCR)	37
4.8.	<i>Análisis bioinformático (in silico)</i>	38
4.9.	<i>Ensayos de viabilidad y proliferación celular</i>	39
4.10.	<i>Lipidómica</i>	39
4.10.1.	Extracción lipídica por Bligh & Dyer	39
4.10.2.	Separación de especies lipídicas por TLC	40
4.10.3.	Extracción de lípidos de la sílice	40
4.10.4.	Derivatización de lípidos – Transmetilación total	41
4.10.5.	Transmetilación de PLs, DAG y TAG	41
4.10.6.	Transmetilación de FFA	41
4.10.7.	Transmetilación de CE	42
4.10.8.	Análisis de FAMES por GC/MS	42
4.10.9.	Análisis de eicosanoides por LC/MS	43
4.11.	<i>Ensayo de extrusión de AMPc – RIA</i>	44
4.12.	<i>Microscopía confocal – Bodipy</i>	44
4.13.	<i>Ensayo de viabilidad y ciclo celular por citometría de flujo</i>	45
4.13.1.	Fijación y tinción	45
4.13.2.	Ciclo celular	45
4.13.3.	Detección de apoptosis por citometría de flujo	46
4.14.	<i>Análisis estadísticos</i>	46
CAPITULO 5 – RESULTADOS – SECCIÓN 1		48
5.1.	<i>El microambiente hipóxico en CRCC y su relación con la proliferación tumoral: expresión de HIF-1α, EPO, EPO-R, VEGF, VEGFR-2 y Ki-67</i>	49
5.2.	<i>Expresión de SCD-1 en el microambiente hipóxico del CRCC</i>	56
CAPITULO 5 – RESULTADOS – SECCIÓN 2		59
5.1.	<i>Perfil lipídico del CRCC</i>	60
5.1.1.	Rol del ácido oleico en la proliferación celular en CRCC	63

- 5.1.2. Expresión de la enzima SCD-1 en un modelo *in vitro* de hipoxia química inducida
66

CAPITULO 5 – RESULTADOS – SECCIÓN 3	72
5.1. Expresión de la proteína de resistencia a múltiples fármacos de tipo 4 (MRP4/ABCC4) en el carcinoma renal de células claras (CRCC) y su rol en la regulación de la proliferación celular	73
5.1.1. Estudio de MRP4 en CRCC	74
5.1.2. Expresión de MRP4 en líneas celulares renales: CAKI-1 y CAKI-2	77
5.1.3. Estudio del flujo de extrusión de AMPc mediado por MRP4 en las células CAKI-1 y CAKI-2 y su relación con la proliferación celular	79
5.1.4. Evaluación de la inhibición farmacológica de la actividad de MRP4 de células CAKI-2 en relación con las modificaciones fenotípicas, proliferación y apoptosis	84
5.1.5. Estudio de la expresión de MRP4 en condiciones hipóxicas	91
CAPÍTULO 6 - DISCUSIÓN	93
6.1. CRCC y el microambiente hipóxico	94
6.2. SCD-1 es una enzima clave para la señalización celular lipídica en CRCC	97
6.3. MRP4 es un transportador que regula el balance de AMPc y está implicado en la proliferación celular en CRCC	100
CAPITULO 7 - CONCLUSIONES	106
CAPÍTULO 8 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

*Estudio del Microambiente Hipóxico y del
Metabolismo Lipídico del Carcinoma Renal de
Células Claras (CRCC)*

1.1. Estructura renal

Los riñones son un par de órganos indispensables para la vida. Se hallan situados en región retroperitoneal superior del abdomen a ambos lados de la columna vertebral. Presentan una superficie lisa con una profunda depresión en su borde interno denominada hilio renal. El tamaño medio de un riñón adulto es de 10-12 cm de longitud, 5-7 cm de ancho y 3 cm de espesor, mientras que su peso aproximado es de 115- 155 gramos en las mujeres y de 125-170 gramos en los hombres. El extremo renal superior se encuentra a nivel de la última vértebra dorsal, y el inferior se extiende hasta la tercera vértebra lumbar, debajo del diafragma. El riñón derecho se encuentra ligeramente más bajo que el izquierdo, ya que el hígado ocupa un gran espacio en el lado derecho, no obstante, el riñón izquierdo presenta dimensiones un poco mayores que el derecho, encontrándose más cerca de la línea media. Además, los riñones están rodeados por tejido fibro-adiposo que le otorgan cierta protección (Tresguerres et al., 2005).

Encerrados por una cápsula fibrosa, los elementos funcionales de los riñones consisten en una corteza externa y una médula renal externa e interna. La médula se divide en una serie de cuñas o conos con la base dirigida hacia la corteza y el vértice dirigido hacia el hilio, llamadas pirámides renales, las cuales desembocan en los cálices renales. Los cálices renales mayores se unen para formar la denominada pelvis renal.

Las unidades de trabajo básicas de los riñones son las nefronas. Aproximadamente 1,2 millones de nefronas están contenidas en cada riñón y se encargan de la formación de la orina. Cada nefrona consta de la cápsula de Bowman, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle y el tubo contorneado distal, el cual desemboca en los conductos colectores (Wallace, 1998).

1.2. Función renal

Los riñones son órganos complejos, vitales en el mantenimiento de las funciones corporales. Algunas de sus funciones son:

- Regulación del volumen y la osmolaridad de los líquidos corporales mediante el control del equilibrio electrolítico e hídrico.
- Excreción de los productos de desecho producidos por el metabolismo celular y de las sustancias químicas extrañas al organismo.
- Regulación de la presión arterial, entre otros mecanismos mediante la secreción de factores vasoactivos como la renina.
- Regulación del equilibrio ácido-base, principalmente mediante la excreción de ácidos. Esta acción es importante, ya que muchas de las funciones metabólicas del organismo son sensibles al pH.

- Regulación de la eritropoyesis, por medio de la síntesis y secreción de eritropoyetina.
- Síntesis de 1,25-dihidroxitamina D₃, la cual participa en el metabolismo del calcio y el fósforo.
- Gluconeogénesis, al sintetizar glucosa a partir de aminoácidos y otros precursores en situaciones de ayuno prolongado, por lo que contribuye de manera importante al mantenimiento de la glucemia.

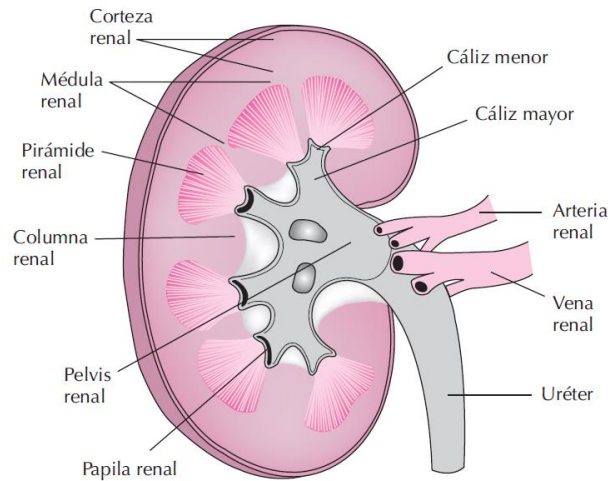


Figura 1.1. Representación esquemática de un riñón. (Extraído de Tresguerres et al., 2005)

1.3. Carcinoma renal de células claras (CRCC)

El cáncer constituye un enorme desafío y carga para la sociedad independientemente del grado económico de los países. Aunque se ha avanzado considerablemente en la profundización del entendimiento de los mecanismos que subyacen a la iniciación y progresión tumoral (Chen & Song, 2019), la prevalencia de cáncer ha aumentado en los últimos años (Torre et al., 2015).

El cáncer adquiere capacidades biológicas durante su desarrollo. Estas capacidades o sellos son un principio organizador de la enfermedad neoplásica, incluyendo: señales proliferativas, evasión de supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis y activación de la invasión y metástasis. Detrás de estas marcas se encuentra la inestabilidad del genoma, que genera la diversidad genética. Además, el progreso conceptual en la última década ha agregado otros sellos emergentes como, la evasión al sistema inmunológico, el microambiente tumoral y la reprogramación del metabolismo (Hanahan & Weinberg, 2011).

El carcinoma de células renales (CCR) se encuentra entre las diez principales causas de muerte relacionadas con el cáncer y es el tipo más común de tumor maligno de riñón en adultos (Elfiky

et al., 2011). El CCR constituye el cáncer urológico más letal, representa el 2-3% de todos los tumores y es la lesión sólida más frecuente en el riñón adulto (Bielecka et al., 2014).

El carcinoma renal engloba a un grupo heterogéneo de subtipos tumorales que incluye el Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC), responsable de un 70-80% de todos los carcinomas renales (generalmente asociado con un pronóstico grave y una alta tasa de mortalidad), el carcinoma papilar con una frecuencia del 11-15%, y los menos habitual el cromóforo y los oncocitomas, donde ambos incluyen un 5% de los casos cada uno (Lopez-Beltran et al., 2006; Srigley et al., 2013)

En Argentina, el CRCC es la novena causa de muerte por cáncer en varones y la decimotercera en mujeres. A nivel mundial en los últimos años la incidencia de este carcinoma se ha mantenido estable, mientras que la tasa de mortalidad ha disminuido solo un 0,9% cada año entre 2007 y 2016 (Motzer et al., 2019).

Habitualmente el diagnóstico se realiza en pacientes de 60-70 años, aunque recientemente se han registrado casos en pacientes jóvenes. La progresión en este tipo de tumores es subclínica y por ello el diagnóstico es tardío. Aproximadamente un 70% de los CRCC se detectan de manera incidental al utilizar técnicas de imágenes no invasivas para la evaluación de múltiples síntomas inespecíficos. Alrededor del 30% de los CRCC se diagnostican en la etapa metastásica y se tratan mediante nefrectomía, sin embargo, un tercio de los pacientes después de la resección del tumor presentan recurrencia (Greef & Eisen, 2016; Ljungberg et al., 2009).

1.4. Estadificación de los CRCC

La estadificación del cáncer es una pieza clave de información que permite determinar el tratamiento y establecer el pronóstico de un paciente determinado. El sistema de clasificación TNM ha sido desarrollado para determinar la extensión anatómica del cáncer. La *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *Union for International Cancer Control* (UICC) publican (en conjunto con otras múltiples asociaciones) la clasificación TNM desde 1977, la cual es actualizada cada 5-7 años, siendo la 8va edición publicada a finales del año 2017.

El sistema de clasificación TNM hace referencia a:

- T: Tamaño del tumor primario. Teniendo en cuenta su extensión e invasión a tejidos adyacentes. El mismo se subclasifica en: T0, T1, T2, T3 y T4.
- N: presencia o ausencia de ganglios linfáticos (número, tamaño y localización de los mismos). Esta categoría se subdivide en: N0, N1, N2 y N3
- M: presencia (M1) o no (M0) de metástasis.

Sin embargo, la valoración cualitativa del nivel de diferenciación de las células tumorales y las características microscópicas como el tamaño y forma del núcleo, así como la prominencia de nucléolos, hacen referencia al grado de dicho tumor. En el caso del CCR se utiliza la clasificación respecto al grado nuclear Fuhrman, el cual separa en 4 grados diferentes:

- Grado 1: Los núcleos de las células cancerosas son pequeños y redondos. Los nucléolos son de difícil observación.
- Grado 2: Los núcleos de las células cancerosas son un poco más grandes y de forma irregular. Los nucléolos son más fáciles de observar.
- Grado 3: Los núcleos de las células cancerosas son grandes e irregulares. Los nucléolos fácilmente visibles.
- Grado 4: Los núcleos de las células cancerosas son extraños, extremadamente irregulares y, a menudo, multilobulados.

En todos los casos, los estadios y grados más bajos son de mejor pronóstico, mientras que los estadios y grados superiores son de peor pronóstico (Colaci et al., 2020; Fuhrman, 1982; Morán et al., 2012; Verine et al., 2018).

1.5. CRCC e hipoxia

Al igual que con numerosos tumores sólidos, el CRCC con frecuencia presenta áreas hipóxicas como consecuencia de un crecimiento tumoral descontrolado, que carece de coordinación con la capacidad de formación de redes vasculares eficientes asociadas al mismo.

Dada esta condición fisiopatológica generada en el seno del tejido neoformado, un actor clave que funciona como coordinador es el factor inducible por hipoxia de tipo 1 (HIF-1). Este factor de transcripción es un regulador maestro de la homeostasis del oxígeno, que desencadena adaptaciones metabólicas a la hipoxia en el tejido tumoral (Klatte et al., 2007).

El gen *HIF-1A*, que codifica la proteína HIF-1 α , se localiza en el *locus* 14q21-q24, y contiene 15 exones. Es un heterodímero compuesto por cadenas polipeptídicas alfas (reguladas por el O₂) y betas, dispuestas en doble hélice. A su vez, la cadena alfa puede presentar isoformas, (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α) generándose así la familia de factores de transcripción HIF (Fraga et al., 2009). En presencia de O₂, las enzimas prolin hidroxilasas (PHD) catalizan la hidroxilación de HIF-1 α , permitiendo la degradación proteica mediada por el proteasoma. Por el contrario, en condiciones de hipoxia, el O₂ no está disponible y de esta forma las enzimas hidroxilasas están inactivas, lo que implica un aumento de HIF-1 α . Este heterodímero transloca al núcleo, donde se une a secuencias específicas del ADN, activando genes implicados en la adaptación a la hipoxia, supervivencia celular, angiogénesis y metástasis (Fraga et al., 2009). Por otra parte, la bibliografía muestra que ciertos metales como hierro y cobalto son capaces de inhibir la acción

de las hidroxilasas, por lo que aumentan la vida media de estos factores de transcripción impidiendo su degradación en los proteasomas (Grau Patrick Wagner, 2011).

Así, las isoformas de HIF (1 α y 2 α) son mediadores importantes en el proceso de adaptación a la hipoxia y a su vez controlan genes implicados en el crecimiento tumoral. Ambas isoformas comparten roles similares, pero con algunas distinciones; HIF-1 α está directamente involucrado en las adaptaciones metabólicas a la hipoxia y se cree que juega un rol esencial en el metabolismo glucídico al aumentar la expresión del transportador de glucosa y las enzimas glucolíticas (Raval et al., 2005; Zhang et al., 2013). Por otro lado, HIF-2 α se encuentra relacionado con los procesos tumorales, promoviendo la progresión del ciclo celular, el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madres y la expresión de más de 100 proteínas, incluido el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor (VEGFR-2) (Loboda et al., 2012); HIF-2 α es quien controla el CRCC (Courtney et al., 2020). Por lo anteriormente mencionado, es fácil observar que la hipoxia tumoral se ha convertido en un factor clave en la progresión del cáncer y se asocia a un mal pronóstico, sobre todo en tumores de riñón y próstata (Fraga et al., 2009).

Por otro lado, HIF-1 α puede unirse a elementos de respuesta a la hipoxia del ADN, actuando de manera cis sobre el promotor de eritropoyetina (EPO), por lo cual, el gen de EPO se encuentra bajo control directo de la hipoxia a través de HIF-1 α (Masson & Ratcliffe, 2014; Salazar & Moreno, 2017; Semenza, 1998). EPO, un factor de crecimiento ampliamente conocido para la eritropoyesis, también puede estimular la angiogénesis (Hardee et al., 2006; Michael et al., 2007), favoreciendo la proliferación y supervivencia de las células tumorales (Lai & Grandis, 2006). Se ha informado que EPO se expresa en CRCC y que dicha expresión está regulada principalmente por la hipoxia a través de HIF (Papworth et al., 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que el CCR humano expresa el receptor de EPO (EPO-R) y que su activación estimula la proliferación de células de carcinoma renal *in vitro* (Westenfelder & Baranowski, 2000). Sin embargo, existen informes controvertidos sobre el grado de expresión de EPO y la coexpresión de EPO-R en CRCC, y si esto pudiera conducir a la proliferación celular mediante estimulación autocrina, un paso esencial en la carcinogénesis renal (Papworth et al., 2009). En consecuencia, la compleja biología de la señalización de EPO y EPO-R en CRCC requiere mayor investigación (Lai & Grandis, 2006).

Como se mencionó antes, además de EPO, el VEGF se incluye entre los productos proteicos de los genes sensibles a HIF, el cual se encuentra regulado positivamente en muchos tumores malignos humanos. VEGF estimula la mitogénesis de células endoteliales y la migración celular, así como también la vasodilatación y permeabilidad vascular en CCR (Iwata et al., 2008).

Los CCR son bien conocidos por su intensa vascularidad y la alta expresión de factores angiogénicos, implicando que existe una relación entre la angiogénesis tumoral y la respuesta celular al stress hipóxico (Malhotra et al., 2008). Por su parte, se ha informado una correlación en CRCC entre la expresión de VEGF y la expresión de HIF-1 α (Orevi et al., 2009) y HIF-2 α (Courtney et al., 2020).

Por otro lado, se sabe que el marcador Ki-67, es una proteína nuclear involucrada en la transcripción del ARN ribosómico, y actualmente utilizada como indicador celular de actividad proliferativa. Codificada por el gen *MKI67*, la proteína Ki-67 se identificó por primera vez en el año 1983 como un antígeno en núcleos de células de linfoma de Hodgkin, demostrando una sobreexpresión en el ciclo celular, pero con muy baja expresión en células en fase G0 (Gerdesi et al., 1983). Esta característica afianzó a Ki-67 como un marcador de proliferación clínicamente importante para clasificar diversos tipos de cánceres, con valores pronósticos bien establecidos en múltiples estudios. El índice Ki-67 es ampliamente utilizado, y se ha observado que la expresión de Ki-67 puede predecir el comportamiento biológico y el pronóstico de CCR. (Sun & Kaufman, 2018).

Nuevos conocimientos en la biología del CCR, establecieron que el CRCC se define por la lesión del cromosoma 3p, resultando en la pérdida de heterocigocidad en cuatro genes supresores de tumores: VHL, PBRM1, SETD2 y BAP1; siendo las mutaciones o metilaciones más frecuentes en el primero de ellos. En el contexto de la pérdida de 3p, estas mutaciones conducen a la inactivación bialélica de estos genes (Turajlic et al., 2018). La pérdida del cromosoma 3p probablemente represente el primer evento genético que ocurre en el CRCC esporádico y el segundo evento genético en CRCC hereditario con mutación de VHL. Por su parte, VHL constituye el módulo de reconocimiento de sustrato de la ligasa VCB-Cul2 E3 que degrada a HIF-1 α y HIF-2 α , mientras que PBRM1, BAP1 y SETD2 son moduladores epigenéticos que regulan la transcripción génica. Debido a la pérdida del 3p y a la inactivación de VHL (eventos troncales en CRCC), existe una mayor señalización de HIF-1, HIF-2 y una hipervascularización tumoral (Hsieh et al., 2018).

En resumen, el gen supresor de tumores VHL, se encontró ausente en más del 75% de los casos de CRCC. La pérdida de función de pVHL lleva a un incremento en la expresión de los HIFs (HIF-1 α y HIF-2 α) (Raval et al., 2005), induciendo la activación de genes que contribuyen a diversos procesos celulares, incluyendo supervivencia/muerte, glucólisis, regulación de la expresión de EPO y de la vasculogénesis/angiogénesis a través del VEGF (Tatli Dogan et al., 2018; Kaelin, 2007). Asimismo, se ha determinado que la coexpresión de EPO y EPO-R se hallan implicados en la tumorigénesis del CCR (Lee et al., 2005). Se piensa que la expresión de EPO sería secundaria

a la deficiencia del gen VHL (Baltaziak et al., 2013), mientras que la expresión de EPO-R ocurriría como parte de la respuesta a la hipoxia (Cokic et al., 2014).

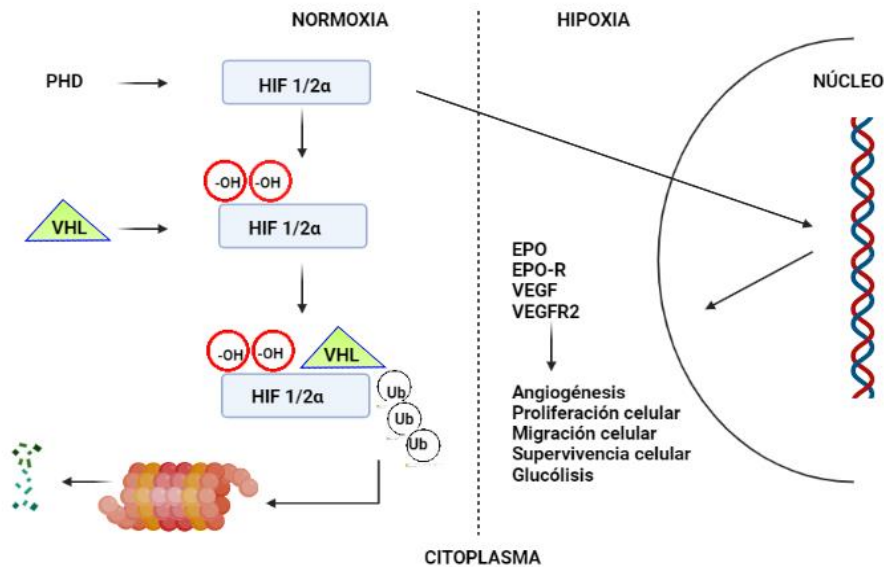


Figura 1.2. Representación gráfica de los HIFs en condiciones de normoxia e hipoxia. En condiciones de normoxia los HIFs son degradados a nivel de proteosoma, mientras que en condiciones hipóxicas los HIFs son traslocados a nivel nuclear, donde estimulan la transcripción de diversos genes.

No obstante, todas las investigaciones precedentemente descritas se han realizado individualmente en diferentes modelos y no se han analizado en conjunto para determinar si existe correlación alguna entre ellos desde una perspectiva global de estudio.

1.6. CRCC y el metabolismo lipídico

Hipotéticamente, la biología hipóxica que estos tumores muestran y su intensa expresión angiogénica, se hallan relacionadas con la característica fenotípica más llamativa del CRCC: el aspecto claro de las células, el cual se ha relacionado con la acumulación de lípidos y glucógeno (Santos & Schulze, 2012). Así, el mecanismo subyacente a su morfología celular es un componente importante de la carcinogénesis renal que aún no se ha definido a nivel molecular. Sin embargo, se ha sugerido que estos tumores poseen una deficiente diferenciación epitelial, transdiferenciación mesenquimal/adipogénica, y células madre mesenquimales pluripotentes con capacidad de diferenciación *in vitro*, sumado a una disminución de factores de transcripción de desarrollo que median en la diferenciación aberrante (Tun et al., 2010).

Los autores anteriormente mencionados, demostraron que estas células tumorales renales presentan enormes gotas lipídicas en el citoplasma (Lipid droplet; LD), consecuencia de la alteración del metabolismo normal que sufren para ajustarse a los requerimientos energéticos

de una división celular descontrolada (incremento de glucólisis y lipogénesis) y al estrés oxidativo (Petan et al., 2018).

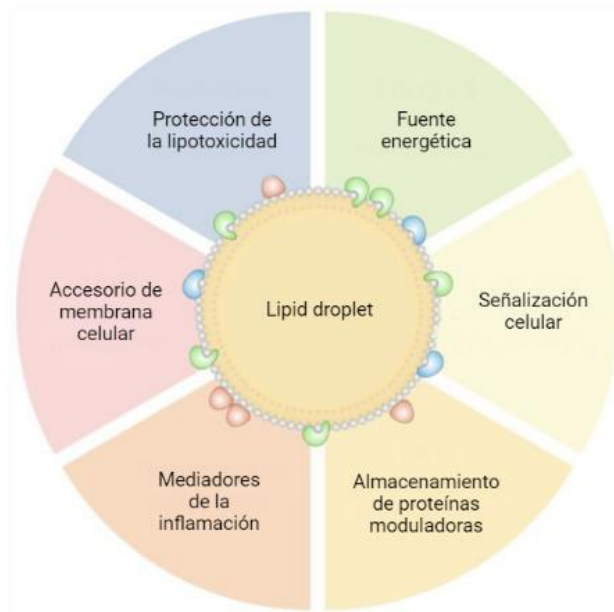


Figura 1.3. Funcionalidad de los LD. Representación gráfica de las múltiples funciones atribuidas a los LD (lipid droplets), las cuales dependen de las necesidades y condiciones celulares. (Extraído y modificado de Petan et al., 2018)

Los LD son orgánulos citoplasmáticos enriquecidos en lípidos, delimitados por una monocapa de fosfolípidos, que recubre un núcleo hidrofóbico compuesto por lípidos neutros, principalmente triacilglicéridos (TAG) y ésteres de colesterol (CE), con un contenido diverso en proteínas, las cuales pueden variar según el tipo de células y las condiciones de éstas. Asimismo, estos LD constituyen, probablemente, una adaptación tumoral que funciona como reservorio de ácidos grasos (FA) en forma de TAG y CE, los cuales son utilizados para la síntesis de fosfolípidos, accesorios de membranas celulares, señalización celular, mediadores inflamatorios, o materia prima para la producción de segundos mensajeros (Cruz et al., 2020).

En los últimos años se ha demostrado, que estos LD, no son depósitos inertes de lípidos, sino que funcionan como verdaderas organelas celulares, dado que no solo poseen TAG y CE, sino también enzimas del metabolismo lipídico y del sistema inmunológico, así como proteínas integrales moduladoras de las mismas. Estos hallazgos se encuentran demostrados en una gran variedad de células y su biogénesis frente a diversos estímulos ha sido revisada por varios autores (Guijas et al., 2016; Thurnher, 2016).

Hace décadas que se tiene evidencia de la gran importancia de los lípidos en cáncer, al descubrirse que las células tumorales reactivan la síntesis lipídica *de novo* por las razones antes mencionadas (Santos & Schulze, 2012; Zhang & Du, 2012). Ciertas clases de lípidos como

ceramidas, esfingolípidos, fosfoinosítidos y eicosanoides constituyen importantes moléculas señalizadoras y están implicadas no sólo en cáncer sino en un amplísimo espectro de enfermedades tales como inflamación crónica, autoinmunidad, alergia, aterosclerosis, hipertensión, enfermedades metabólicas y degenerativas (Wymann & Schneider, 2008). Por su parte, los eicosanoides hacen referencia a una familia de ácidos grasos poliinsaturados, incluyendo lipoxinas, leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas; tanto su biosíntesis, como sus propiedades se encuentran bien caracterizados en los mamíferos, sabiendo que cumplen funciones intracelulares mediante receptores (algunos asociados a producción de AMPc) o pudiendo ser extruidos al espacio extracelular mediante proteínas de transporte conocidas como proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP/ABCC) (Mosaad et al., 2020).

La investigación en este campo ha demostrado como, enzimas claves del metabolismo lipídico pueden ser útiles como biomarcadores o estimadores de prognosis. Un ejemplo muy notorio, constituye la expresión y actividad de la colina quinasa, enzima requerida para la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (principales fosfolípidos de las membranas celulares), las cuales se hallan incrementadas en cáncer de colon, y asociadas con mal pronóstico (Janardhan et al., 2006).

En el mismo sentido, el complejo enzimático ácido graso sintasa (FAS), un catalizador clave implicado en la biosíntesis de *novo* de ácidos grasos, se encuentra habitualmente sobreexpresado en muchos tumores sólidos y se ha informado el aumento de su expresión como un indicador de la agresividad del tumor y mal pronóstico en CRCC (Hamada, Horiguchi, Asano, et al., 2014; Hamada, Horiguchi, Kuroda, et al., 2014b, 2014a).

Otras enzimas de la vía lipogénica, tal como acetil-CoA carboxilasa (ACC) que cataliza la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA, también están sobreexpresadas y por ello pueden servir como blanco terapéutico. De hecho, las drogas (como metformina) que activan las protein quinasas AMP-dependientes inducen la inhibición de la ACC por fosforilación suprimiendo la síntesis de los ácidos grasos (Igal, 2010).

En relación con este perfil metabólico particular de las células de CRCC, se ha demostrado que también exhiben un exceso de colesterol total y, más concretamente, del colesterol esterificado. Dado que la acumulación de colesterol libre es tóxica para las células, las células del CRCC están protegidas de este efecto lipotóxico, debido a un aumento en la actividad de la acetil-CoA colesterol acetil transferasa (ACAT), que cataliza la formación de ésteres de colesterol.

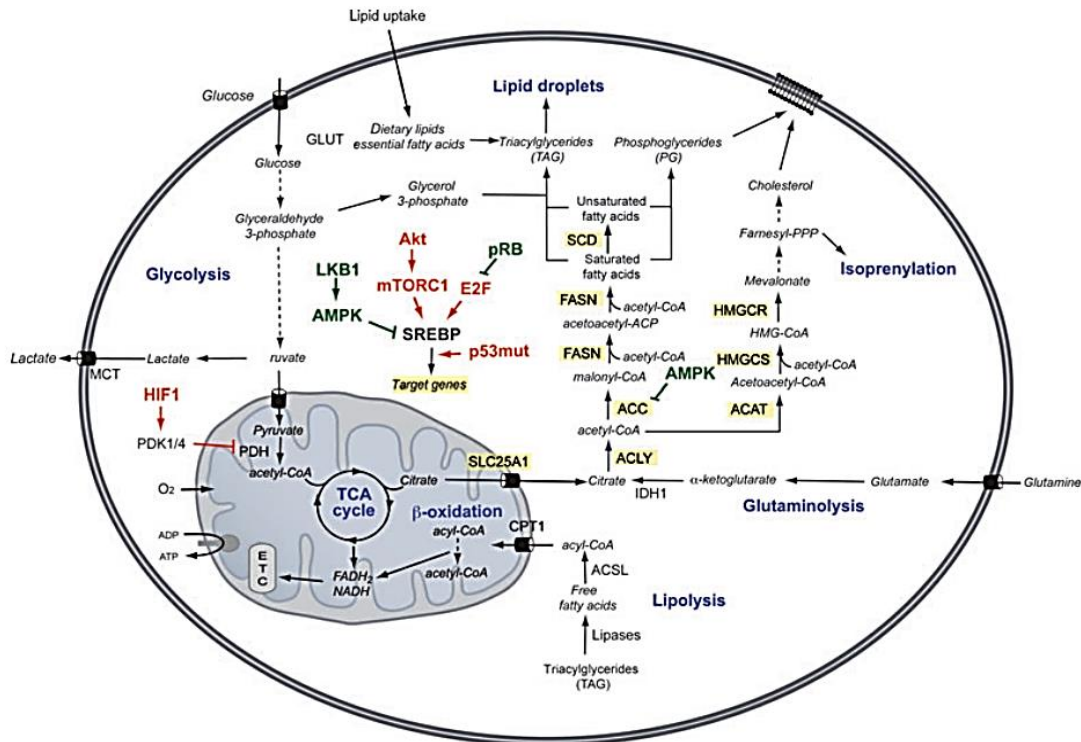


Figura 1.4. Regulación del metabolismo lipídico en vías de señalización oncogénica. (Extraído de Santo, et al., 2012).

Un evento metabólico omnipresente en el cáncer es la activación constitutiva de la biosíntesis de ácidos grasos (FA). Los FA saturados (SFAs), los FA monoinsaturados (MUFAs) y los FA poliinsaturados (PUFAs), se sintetizan para sostener la creciente demanda de fosfolípidos (PLs) que se utilizan en la construcción de nuevas membranas, almacenamiento de energía y señalización celular (Beloribi-Djefafli et al., 2016; Igal, 2010; Roongta et al., 2011). La activación de enzimas como la ATP-citrato liasa (ACL), la ACC y la FAS, que conducen a una mayor síntesis de SFAs se ha estudiado ampliamente (Svensson et al., 2016; Ueda et al., 2019; C. Wang et al., 2015; Zhou et al., 2013). Estos últimos se convierten en MUFAs por la acción de la enzima estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD-1) (Santos & Schulze, 2012). SCD-1 es una Δ^9 -acil-CoA desaturasa que cataliza la introducción de un doble enlace en la posición cis- Δ^9 de varios acil-CoA grasos saturados, principalmente palmitoil-CoA (ácido palmítico) y estearoil-CoA (ácido esteárico), para sintetizar palmitoleoil-CoA (ácido palmitoleico) y oleoil-CoA (ácido oleico), respectivamente (Igal Ariel, 2011).

Dos isoformas de la enzima SCD se encuentran en tejidos humanos: SCD-1 y SCD-5. SCD-1 es la principal isoforma hallada en los diferentes tipos celulares, con mayor expresión en tejido adiposo, cardíaco, hepático, cerebro y pulmones; mientras que los niveles de expresión de SCD-5, están limitados principalmente a cerebro y páncreas (Tracz-Gaszewska & Dobrzyn, 2019).

Se ha informado que estos ácidos grasos insaturados (palmitoleoil-CoA y oleoil-CoA) afectan varias funciones biológicas cruciales de las células tumorales, como la proliferación, señalización, invasividad y apoptosis, y se ha demostrado que el ácido oleico (18:1n-9), uno de los ácidos grasos libres (FFA) más prevalentes en plasma humano, aumenta la proliferación de células en cáncer de próstata, mama y riñón humano (Liotti et al., 2018; Z. Liu et al., 2013). Por lo anterior, se demostró que SCD-1 podría ser un objetivo terapéutico en oncología ya que su inhibición farmacológica indujo la apoptosis de las células tumorales (Igal Ariel, 2011; L. Chen et al., 2016; Daniel Hess et al., 2010; Mukherjee et al., 2017; Scaglia et al., 2009; Suburu & Chen, 2012).

No obstante, de manera controvertida, se reportó que ciertos FFA, como el 18:1n-9, tienen efectos anticancerígenos en muchos tumores, inhibiendo la proliferación celular y favoreciendo la apoptosis (Carrillo et al., 2012; Jiang et al., 2017).

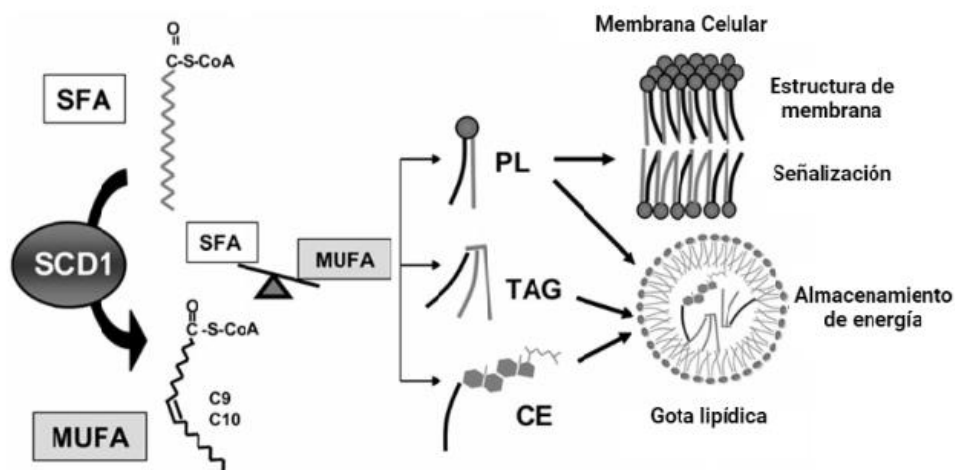


Figura 1.5. Regulación del equilibrio MUFA/SFA mediado por SCD1. (Extraído y modificado de Igal 2011). La acción catalítica de la enzima SCD-1 aumenta la proporción de MUFAs, que posteriormente son esterificados en PLs, TAG y CE.

A menudo las rutas metabólicas o de señalización donde participan los lípidos se investigan aisladamente, aunque existe una interconexión entre todas ellas, por lo que las conclusiones que se obtienen siempre se encuentran limitadas a un análisis parcial. La tendencia actual en investigación oncológica está centrada en un estudio completo, con foco en un estadio tumoral, que implique el entendimiento de varias vías metabólicas a la vez. Con el fin de abordar esta complejidad han surgido las ciencias “ómicas” como la metabolómica cuya rama la “lipidómica” comprende la investigación cualitativa y cuantitativa de los lípidos, incluyendo sus interacciones en sistemas biológicos y su relación con la expresión de genes y proteínas. El desarrollo de la

lipidómica ha sido posible gracias a los grandes avances que se han producido en las técnicas analíticas, especialmente en espectrometría de masas (Wenk, 2010). Dado el enorme reservorio lipídico presente en células del CRCC, este cáncer posee características óptimas para ser estudiado en este abordaje *ómica*. Hasta el presente no existen numerosos estudios de metabolismo lipídico centrados en este carcinoma (Dill et al., 2010; Perroud et al., 2006).

1.7. Implicancia del AMPc en cáncer

Como se mostró precedentemente, si bien la tendencia actual de investigación en carcinoma renal apunta al entendimiento de los mecanismos de señalización celular que implican metabolitos lipídicos, no menos importantes son las líneas que procuran caracterizar el rol de los segundos mensajeros clásicos como los nucleótidos endógenos cíclicos y sus sistemas asociados de recepción y amplificación de señal. Trabajos de secuenciación en diferentes tipos de cáncer (intestino grueso, piel, ovario, tracto digestivo superior, próstata, mama, tiroides, sistema nervioso central, pulmón, estómago, sistema hematopoyético, tejido linfoide, páncreas, hígado, tracto urinario y riñón) muestran una frecuencia elevada de mutaciones en las proteínas G y en los receptores acoplados a ella (GPCRs) (Yu et al., 2018).

Dichos estudios han revelado que el 4,2% de las secuencias de todas las muestras tumorales estudiadas presentan mutaciones activantes en la subunidad G α s, o bien mutaciones que irrumpen la actividad GTPasa de la proteína G, conduciendo a variantes constitutivamente activas de la señalización. Adicionalmente, casi el 20% de los cánceres humanos albergan mutaciones en GPCRs, por lo que la expresión aberrante, la sobreexpresión o la reprogramación de la señal de un GPCRs o de las proteínas G en las células tumorales, pueden contribuir al desarrollo y progresión del cáncer (Bar-Shavit et al., 2016). Clásicamente, se ha relacionado a las proteínas G a una enzima (Adenilato ciclasa o Fosfolipasas A₂ o C) capaz de generar segundos mensajeros (AMPc, ácido araquidónico, DAG o fosfoinosítidos). De ellos, el AMPc ha sido uno de los segundos mensajeros más estudiados en células eucariontes, y en tumores se encuentra involucrado en la desregulación del crecimiento y la diferenciación celular (Carozzo et al., 2015; Cho-Chung et al., 1991; Shayo et al., 2004).

Las concentraciones intracitoplasmáticas de AMPc están finamente reguladas tanto positivamente como negativamente por numerosas hormonas y neurotransmisores que actúan a través de los GPCRs. La activación de estos receptores conduce a un incremento en la concentración de AMPc y su degradación es responsabilidad de las fosfodiesterasas (PDE) que transforman este segundo mensajero en 5' AMP (Pinto et al., 2016). Sin embargo, la especificidad de la señal disparada por los distintos ligandos es consecuencia no sólo de la activación del receptor específico sino también de la fina regulación que existe en los distintos

niveles de la cascada de transducción (existencia de microdominios de señalización, isoformas de adenilato ciclasa o fosfodiesterasas y/o diferencias en los niveles de expresión de las proteínas transductoras) que aseguran una dada duración, amplitud y localización de respuesta mediada por AMPc (Tasken & Aandahl, 2004). Desde hace algunos años, a la complejidad de los mecanismos regulatorios de la señal del AMPc se ha sumado la existencia de mecanismos de exclusión (extrusión) de este segundo mensajero al espacio extracelular. Dado que por su polaridad de carga el AMPc es incapaz de ingresar hacia el interior de la célula, este proceso ha sido postulado como un mecanismo adicional de regulación de sus concentraciones intracelulares y se ha reportado en diferentes tipos de células humanas (R. A. van Aabel et al., 2002).

1.8. Regulación del AMPc

Desde los hallazgos del AMPc (Rall & Sutherland, 1958) y durante un periodo de más de 50 años, la investigación de segundos mensajeros ha proporcionado un marco para comprender la transducción de señales transmembrana, el acoplamiento ligando-receptor, las cascadas de proteínas quinasas y la regulación a la baja de la capacidad de respuesta a los fármacos (Beavo, 2002).

La vía de señalización del AMPc comprende múltiples componentes. En principio, los GPCR se activan a nivel de la membrana plasmática cuando ocurre la unión del ligando, librando de dicha manera la proteína G activa. La proteína G se encuentra conformada por 3 subunidades: α , β y γ . Existen cuatro clases de proteínas G considerando la subunidad α : Gas, Gai, G α q y G α 12. En estado inactivo la subunidad α se encuentra unida a GDP, pero al activarse, dicho nucleótido es liberado y cede el sitio para la unión de GTP. Luego la subunidad Gas unida a GTP, activa una Adenilato ciclasa unida a membrana, la cual hidroliza el ATP para generar AMPc. El AMPc puede unirse y activar tres principales proteínas efectoras: los canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (CNG), las proteínas de intercambio guanina-nucleótido activadas por AMPc (EPAC) y la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA).

La PKA está formada por dos subunidades reguladoras y dos catalíticas. El AMPc se une a las subunidades reguladoras y activa de esta manera las subunidades catalíticas, las cuales se encargan de fosforilar sustratos citoplasmáticos. Por otra parte, las subunidades catalíticas activas y libres pueden translocar al núcleo celular y regular la transcripción de ciertos genes. La señal del AMPc finaliza por acción de las PDE que degradan el AMPc (Lefkimmatis & Zaccolo, 2014).

Los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc son segundos mensajeros que desarrollan un rol clave en la señalización celular y en el equilibrio extracelular. En riñón, el AMPc se excreta a través de la

membrana apical de los túbulos proximales hacia la orina, mediante la acción de una proteína transportadora conocida como proteína de resistencia a múltiples fármacos de tipo 4 (MRP4). Se sabe que esta vía de extrusión de AMPc es dependiente de ATP y es inhibida por ciertos fármacos como por ejemplo el Probenecid (R. a M. H. van Aubel et al., 2002). El AMPc controla un amplio espectro de efectos biológicos que incluyen la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis celular, entre otros. Por lo tanto, la regulación del AMPc intracelular depende del equilibrio entre su producción por la Adenilato ciclasa (estimulada por diversas hormonas y neurotransmisores), su degradación por las PDE y su extrusión por MRP4 (Carozzo et al., 2015). En los últimos años, se ha descrito que aumentos de los niveles de AMPc intracelular (i-AMPc) producen sobreexpresión de MRP4 a través de la activación de la vía de señalización de AMPc/Epac/Rap1, aumentando así el transporte de AMPc al espacio extracelular, es decir, un sistema de autorregulación (Bröderdorf et al., 2014).

1.9. Transportadores ABCC/MRP asociados al cáncer

La familia de transportadores de casetes de unión a ATP (ABC), es la familia más grande de proteínas transmembrana, la cual comprende 49 transportadores, los cuales se subdividen en siete subfamilias de la A hasta la G, basados en la homología de secuencias (Dean et al., 2001; Fletcher et al., 2010; Porro et al., 2010). De estos, la subfamilia C, también llamados proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP/ABCC), ha atraído cada vez más atención, ya que se localizan en la membrana plasmática de diferentes tipos de células, y son capaces de transportar una amplia variedad de sustratos endógenos (conjugados del glutatión, leucotrienos, tromboxanos, eicosanoides, sulfatos, uratos, folato, bilirrubina conjugada, esteroides conjugados y nucleótidos cíclicos entre otros) y exógenos (diuréticos, antibióticos, antivirales, drogas quimioterapéuticas, diversos fármacos y xenobióticos) (Borst et al., 2000; Deeley et al., 2006; Leslie et al., 2005; Sodani et al., 2012). Además, dichos transportadores se encuentran involucrados en la absorción, distribución y eliminación de numerosas drogas, por lo que, la existencia de una elevada expresión de MRP en células cancerosas podría contribuir a la resistencia quimioterapéutica (Wen et al., 2015).

Existen 12 miembros de la subfamilia C de ABC (ABCC) que se encuentran en los seres humanos, de los cuales, nueve son transportadores de drogas. De estos nueve, MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2), MRP3 (ABCC3), MRP4 (ABCC4) y MRP5 (ABCC5) son los mejores caracterizados por su papel en el transporte de xenobióticos, permitiendo la exportación celular de numerosos conjugados como, por ejemplo: GSH, glucurónidos, sulfatos y productos químicos no conjugados (Li et al., 2017).

Los MRPs son conocidos por su contribución a la resistencia a drogas citotóxicas y el consecuente fracaso de múltiples tratamientos quimioterápicos (Sodani et al., 2012); esto se debe, fundamentalmente, a su capacidad de aumentar el eflujo de éstas, llevando así a la reducción de los niveles intracelulares de los fármacos. Sin embargo, evidencias más recientes sugieren que la implicancia de estas proteínas de membrana en la biología tumoral excede el mero transporte de fármacos e involucra también la movilización de segundos mensajeros responsables de los procesos de proliferación y diferenciación celular (Carozzo et al., 2015). En este sentido, han sido descritos tres miembros de la familia MRP, con capacidad de excluir nucleótidos cíclicos como el AMPc y GMPc del espacio intracelular: MRP4, MRP5 y MRP8 (Fletcher et al., 2010; Russel et al., 2008; Sampath et al., 2002; Wielinga et al., 2003). Adicionalmente, existen numerosos reportes que proponen la existencia de receptores extracelulares de AMPc, y sugieren su acción como agente autocrino/paracrino en diferentes células y tejidos de organismos eucariontes superiores, abriendo así la posibilidad a una mayor complejidad, con relación a la cascada de transducción de este segundo mensajero (Xie et al., 2011). Este circuito mitogénico indicaría una correlación entre el grado de malignidad e indiferenciación celular, el nivel de expresión y funcionalidad de los MRPs en cuanto a la extrusión de AMPc y la existencia de receptores específicos para dicho nucleótido cíclico.

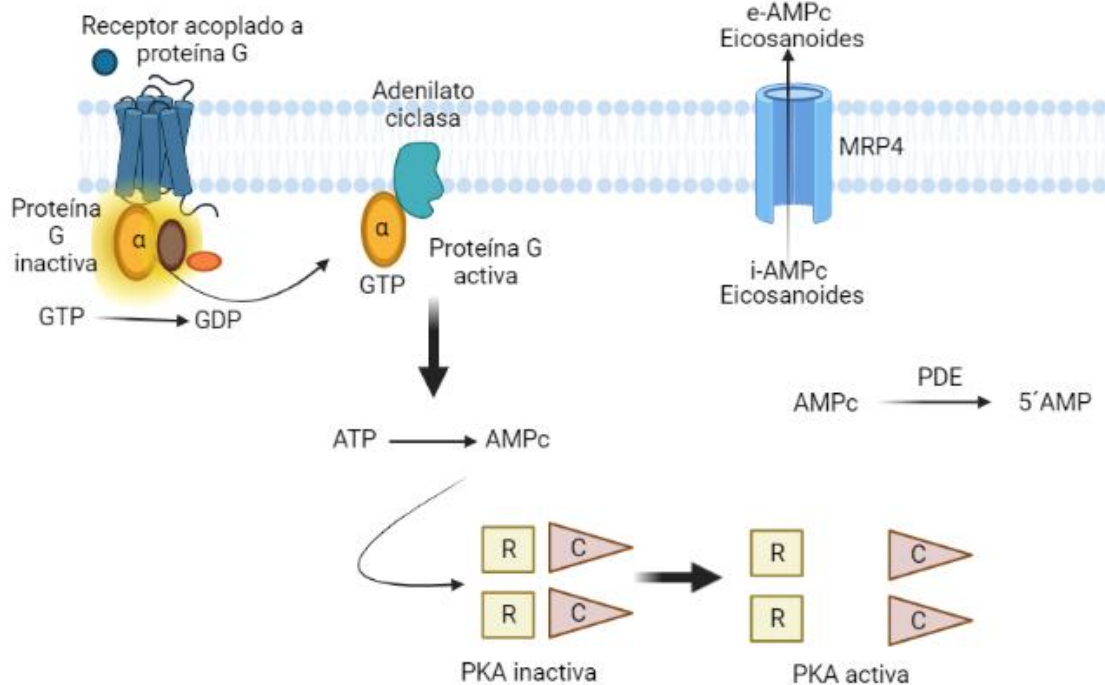


Figura 1.6. Vía de señalización del AMPc. El AMPc sintetizado por la Adenilato ciclasa cumple diversos roles tanto intracelulares como extracelulares. Su regulación está centrada en el estímulo de su síntesis, su degradación por PDE y su extrusión al espacio extracelular mediado por MRP4.

1.10. Características generales de MRP4

MRP4 también conocido como ABCC4, MOATB o MOAT-B, es una bomba de aniones lipofílicos, que pertenece a la subfamilia C de transportadores ABC. Los transportadores ABC son en su mayoría proteínas transmembrana que utilizan la energía generada por la hidrólisis del ATP (dependientes de ATP) para mediar el movimiento de una variedad de sustancias a través de las membranas celulares. Ubicado en el cromosoma 13q32.1, el gen *ABCC4* identificado en 1997 (Kool et al., 1997), codifica el miembro más corto de la familia ABCC/MRP (Russel et al., 2008) y media la salida de una variedad de moléculas exógenas y endógenas desde el espacio intracelular al extracelular (Huynh et al., 2012).

Se han identificado 4 isoformas de MRP4¹, producto del splicing alternativo: La isoforma 1 que representa el transcrito más largo y la proteína más extensa con 1325 aminoácidos. La isoforma 2, la cual carece de varios exones 3' pero contiene un exón terminal 3' alternativo, por lo tanto, difiere en la región de codificación 3' y 3' UTR, en comparación con la variante 1; la isoforma 2 codificada tiene un C-terminal distinto y más corto, en comparación con la isoforma 1. La isoforma 3 carece de un exón en marco alternativo en la región de codificación central, en comparación con la variante 1, lo que da como resultado una isoforma más corta que la isoforma 1. La isoforma 4 carece de un exón en marco alternativo en la región codificante 5' y de varios exones 3', pero contiene un exón terminal 3' alternativo, por lo tanto, difiere en la región codificante 3' y 3' UTR, en comparación con la variante 1. La isoforma 4 codificada tiene un C-terminal distinto y más corto, en comparación con la isoforma 1.

Una característica que comparte MRP4 únicamente con MRP2 y MRP8 es su localización dual dependiente del tejido, ya que puede hallarse en membrana basolateral como en membrana apical.

Otra característica importante de este transportador es su bajo nivel de expresión en los diferentes tejidos (Kool et al., 1997). Por ejemplo, a nivel renal MRP4 se encuentra fisiológicamente expresada de manera débil, en la membrana apical de los túbulos proximales (Russel et al., 2008; Y.-K. Zhang et al., 2015). No obstante, se sabe que cumple un rol primordial en las vías de regulación fisiológicas transportando diversas sustancias (tabla 1.1.), entre ellas, los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) y sus análogos. Así, el nivel aumentado de AMPc podría inducir sobreexpresión de MRP4 y dar como resultado un aumento del flujo de salida de dicho nucleótido.

¹ Datos disponibles en el sitio web de NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10257#gene-expression> Gene ID: 10257, actualida el 3-Feb-2021.

En cuanto a la biología tumoral, el rol de MRP4 se presenta controversial. Por un lado, se lo postula como protector al reducir los niveles intracelulares de productos del metabolismo celular; por otra parte, se lo denota como responsable de la falla de tratamientos quimioterapéuticos al expulsar drogas anticancerígenas (Y.-K. Zhang et al., 2015).

Tabla 1.1. Sustratos de extrusión de MRP4	
Endógenos	Fármacos
Nucleótidos cíclicos y ADP: AMPc, GMPc, ADP	Leucovorin
Uratos	Antitumoral: Inhibidores de la topoisomerasa I: Irinotecan, Topotecan. 6-Tioguanina, SN-38, ciclofosfamida,
Eicosanoides: PGE ₁ , PGE ₂ , PGF _{2α} , TXB ₂ , LTB ₄ , LTC ₄	Antiviral: Adefovir, Tenofovir, PMEA.
Ácido fólico	Anti-metabolito: Metotrexato, 6-Mercaptopurina.
Ácidos biliares: cólico, desoxicólico, glicocólico, taurocólico, desoxiglicocólico, quenodesoxicólico, urodexoxicólico.	Antibacterianos: Ceftizoxima, Cefazolin, Cefotaxima, Cefmetazol.
Esteroides conjugados: DHEAS, E ₂ 17Bg.	Diuréticos: Hidroclorotiazida, Furosemida
	Antihipertensivos: Olmesartan
	Neuroprotector: Glucurónido de Edavarona.

Extraída y modificada de: Russel et al. 2008; Huynh et al. 2012 y Liu Y-H, et al. 2010.

Adicionalmente, se ha encontrado a MRP4 sobreexpresado o implicado en diversos tumores como: cáncer de próstata (Montani et al., 2013), neuroblastomas (Henderson et al., 2011; Huynh et al., 2012; Norris, 2005), cáncer de pulmón (Zhao et al., 2014), osteosarcoma (Lin et al., 2015), cáncer rectal (Z. Yu et al., 2014), glioblastoma (Rama et al., 2014), linfoma (X. Zhang et al., 2015), cáncer gástrico (G. Zhang et al., 2015), cáncer de esófago (Y. Sun et al., 2014), cáncer de ovario (Bagnoli et al., 2013), cáncer de páncreas (Carozzo et al., 2015, 2019), cáncer de vesícula biliar (Ituarte et al., 2019) y en leucemias (Copsel et al., 2011, 2014). Paralelamente, la inhibición de MRP4 ha producido una reducción en la proliferación de muchos tipos de células tumorales (Carozzo et al., 2019; Copsel et al., 2014).

Por los motivos anteriormente expuestos, en los últimos años se ha despertado un gran interés por el estudio de la expresión y regulación de la actividad de MRP4 en relación con la biología de las células tumorales.

Hasta el presente, no existen evidencias bibliográficas sobre la expresión y rol de MRP4 en CCRC; por consiguiente y en relación con el desarrollo de la presente tesis, resultó interesante e innovador indagar sobre los procesos de extrusión de AMPc mediados por MRP4 en la proliferación de células tumorales provenientes de CCRC.

1.11. OATP4C1: ¿Otro transportador implicado?

Los miembros de la familia de transportadores aniónicos orgánicos polipeptídicos (OATP o SLCO) median en la captación transmembrana de diferentes sustratos endógenos y exógenos, entre ellos algunas hormonas y drogas, afectando así la disposición y el transporte tisular del fármaco. Por lo general, estos transportadores se integran en las membranas celulares, movilizandolos hacia el interior o exterior de las células por transporte facilitado o por cotransporte utilizando el gradiente de concentración de otro soluto, a diferencia de los transportadores ABC. A nivel renal, los transportadores son expresados en la membrana basolateral y apical de los túbulos proximales y median la eliminación renal de fármacos. Para que una molécula se secrete activamente en la luz de los túbulos, se requieren al menos dos transportadores: uno en la membrana basolateral de la célula del túbulo para aceptar moléculas provenientes del torrente sanguíneo y otro en la membrana apical para mediar la salida de la molécula al líquido tubular (Morrissey et al., 2013).

En particular, se sabe que la subfamilia 1 de OATP media la captación celular de fármacos contra el cáncer. Así mismo se demostró la expresión de estos transportadores en diferentes tejidos, algunos con expresión ubicua y otros órganos específicos. Tal es el caso de OATP4C1, quien se expresa débilmente y de manera específica en la membrana basal del tejido renal (Buxhofer-Ausch et al., 2013). No obstante, OATP4C1 también fue identificado y cuantificado en tumores como el de mama (Wlcek et al., 2008).

Visto que OATP4C1 y MRP4 realizan un transporte inverso, dadas sus ubicaciones en la membrana celular (Figura 1.7), se plantea que, en el CRCC, tanto MRP4 como OATP4C1 juegan un rol significativo en el transporte de fármacos antineoplásicos y por lo cual influyen en los procesos de proliferación y muerte de células tumorales; por esto además podrían ser potenciales biomarcadores.

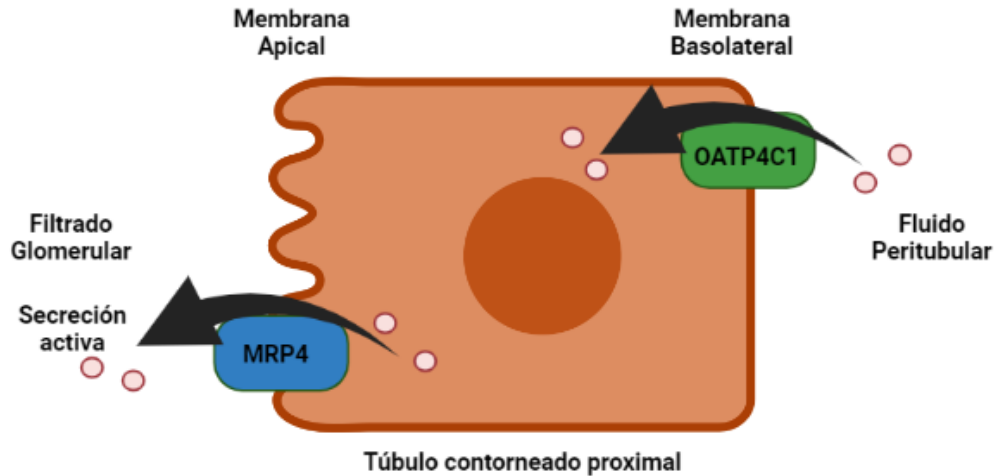


Figura 1.7. Actividad y localización de las proteínas transportadoras MRP4 y OATP4C1 en las células tubulares renales. Obsérvese el flujo inverso del transporte de dos proteínas de membrana a nivel de los túbulos renales contorneados proximales.

Por lo mencionado previamente, SCD-1 y MRP4 representan opciones atractivas de investigación en la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos de acción en CRCC. Asimismo, el disponer del mapa lipídómico de composición y el eicosanoma asociado a este tipo de tumores brindará información útil fácilmente relacionable a la funcionalidad de las proteínas en estudio (van de Ven et al., 2009).

1.12. Dianas terapéuticas y biomarcadores

En la era actual de Big data, se ha generado y acumulado gran cantidad de información, producto del desarrollo de la bioinformática. Tal información ha permitido, entre otras cosas, obtener la secuencia completa del genoma humano y de muchos otros organismos. En los últimos años se han esclarecido mecanismos y se han identificado determinantes del comportamiento de las células tumorales. Esto ha conducido a un cambio de paradigma en el proceso de descubrimiento de agentes antitumorales, modificando así las terapias para combatir el cáncer. Hace años, los ensayos se iniciaban con observaciones empíricas de compuestos que inhibieran el desarrollo celular, con un gran desconocimiento de los mecanismos de acción, el blanco y la composición de las drogas. En la actualidad se parte de análisis bioinformáticos, identificando, caracterizando y validando nuevos blancos terapéuticos, por lo general mutados o sobreexpresados en las células cancerosas, que juegan un papel clave en la biología tumoral. Además, no solo se estudia el metabolismo y la capacidad proliferativa de las células mutadas, sino también cambios a nivel genético, epigenéticos, estado de diferenciación celular, entre otros (Benson et al., 2006).

Los tratamientos terapéuticos sistémicos convencionales en CRCC avanzado, como los fármacos citotóxicos y la radioterapia resultaron en gran medida ineficaces y no mejoraron la supervivencia de los pacientes (Bielecka et al., 2014). Hasta hace unos años, el tratamiento de elección en primera instancia era la nefrectomía, total o parcial, siendo efectiva en un 90% de los casos si el tumor era de estadio I y en el 50% si era de estadio II. Para pacientes en estadio más avanzados (III, IV o metastásicos) el pronóstico de vida se reducía a 1- 3 años (Badalian et al., 2007; Itoi et al., 2004). No obstante, en la actualidad, las opciones de terapia dirigida de primera línea recomendadas son los inhibidores de tirosina quinasa de un solo agente (TKI) que incluyen Pazopanib, Sunitinib, Axitinib y Cabozantinib, o Temsirolimus, los cuales son dirigidos contra mTOR. Además, se introdujeron inhibidores del punto de control inmunitario, con resultados alentadores (Motzer et al., 2019).

Por otro lado, después del diagnóstico inicial de CCR es difícil predecir la posibilidad individual de procesos metastásicos. Como ya se mencionó, se demostró que los marcadores de angiogénesis a menudo aumentan en los tumores renales, principalmente en los CRCC. Los CCR albergan anomalías en el gen supresor de tumores VHL, lo que resulta en una mayor expresión de factores de crecimiento como VEGF, VEGFR-2, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2) y EPO, a través de la inducción de HIF-1 α (Stubbs et al., 2017). También se han mencionado otros biomarcadores de CRCC, como Ki-67, PCNA, p53, CD44 y CA9 (J. Cooper et al., 2012; Kroeze et al., 2010), PAX-2, PAX-8, vimentin, anhidrasa carbónica IX (Mohamed, 2017) y canales de potasio activados por calcio (KCa3.1) (Rabjerg et al., 2015).

Además, el diagnóstico histológico de subtipos de CCR, puede ser un desafío significativo ya que todos los subtipos pueden exhibir patrones similares, y el diagnóstico es particularmente desafiante cuando las biopsias son de tumores pequeños, los cuales son propensos a errores de muestreo. En los casos en que la histología estándar por sí sola no es suficiente, los biomarcadores pueden servir como una herramienta para la diferenciación entre los subtipos de CCR.

A pesar de la abundancia de marcadores prometedores para CRCC, sus funciones exactas en la toma de decisiones clínicas aún necesitan estudios de validación. No obstante, más del 50% de los casos de CRCC, se detectan accidentalmente debido al uso generalizado de imágenes abdominales. Por lo tanto, uno de los principales retos en el campo es la identificación de biomarcadores tempranos de CRCC, que aportaría información sobre los mecanismos moleculares de la iniciación de esta patología, facilitando así el desarrollo de estrategias de intervención temprana.

De lo anterior resulta evidente, que la investigación de biomarcadores o predictores diagnósticos es prioritaria, y su validación necesaria para este tipo de cáncer.

Así, en el presente trabajo se caracterizó el perfil lipídico del CRCC para estudiar, desde una perspectiva aún no ensayada el contenido de PLs, DAG, TAG, CE, FFA y eicosanoides, con el objeto de disponer de una visión “ómica” y así poder evaluar nuevos posibles biomarcadores o indicadores metabólicos propios de este tipo de cáncer.

CAPITULO 2

HIPOTESIS

Estudio del Microambiente Hipóxico y del Metabolismo Lipídico del Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC)

El microambiente hipóxico tumoral de CRCC promueve la sobreexpresión de SCD-1 y MRP4 los cuales regulan los niveles de algunos ácidos grasos insaturados y AMPc respectivamente, siendo estos compuestos críticos durante el proceso de proliferación de las células cancerígenas.

CAPITULO 3

OBJETIVOS

Estudio del Microambiente Hipóxico y del Metabolismo Lipídico del Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC)

3.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la implicancia de SCD-1 y MRP4 en CRCC, y su regulación por el microambiente hipóxico tumoral, con el fin de intentar validar dichas proteínas como blancos terapéuticos y/o biomarcadores en estos tumores.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el perfil hipóxico mediante la evaluación de la expresión de proteínas involucradas en dicho microambiente: HIF-1 α ; VEGF; VEGFR-2; EPO y EPO-R en muestras de tejido neoplásico provenientes de nefrectomías de pacientes con CRCC y compararlas con sus respectivas secciones controles (tejido renal adyacente).
2. Estudiar la composición lipídica de CRCC con aproximación lipidómica y compararlas con tejidos controles o sus respectivas líneas celulares en diferentes condiciones experimentales.
3. Determinar la expresión de la enzima SCD-1 en las muestras precedentemente descritas.
4. Analizar la expresión de MRP4 en muestras de tejido neoplásico de pacientes con CRCC.
5. Estudiar la funcionalidad de MRP4 en líneas celulares mediante el dosaje de AMPc intracelular y extracelular.
6. Evaluar el rol de los productos de la catálisis de la enzima SCD-1 y del AMPc en la proliferación celular en líneas de CRCC humano en diferentes condiciones experimentales.
7. Comparar los resultados del objetivo específico anterior en condiciones de hipoxia experimental *in vitro*.

CAPITULO 4

**MATERIALES
Y
METODOLOGÍAS**

*Estudio del Microambiente Hipóxico y del
Metabolismo Lipídico del Carcinoma Renal de
Células Claras (CRCC)*

4.1. Pacientes, información clínico-patológica y muestreo de CRCC

Se obtuvieron muestras quirúrgicas de 28 pacientes con CRCC en diferentes estadios tumorales. Los pacientes fueron tratados mediante nefrectomía radical en la Unidad de Urología del Hospital J. R. Vidal (Corrientes, Argentina). Las muestras extraídas quirúrgicamente (CRCC y tejidos controles distales) se transportaron en medio de cultivo estéril en condiciones refrigeradas para su posterior procesamiento. Las muestras se separaron en distintas secciones; algunas se fijaron para histopatología y procedimientos de inmunohistoquímica, otras se destinaron a cultivos primarios, y otras secciones fueron trituradas y homogeneizadas en H₂O DEPC (dietilpirocarbonato) para análisis de expresión de ARNm, en buffer de lisis para estudios proteicos y en H₂O ultrapura Milli-Q para ensayos lipídicos.

Cada tumor se sometió a una estadificación patológica: T1 = 13 (46,4%), T2 = 11 (39,3%), T3 = 3 (10,7%) y T4 = 1 (3,6%). Mientras que la clasificación respecto a los grados Fuhrman fueron: G1 = 10 (35,7%), G2 = 16 (57,2%) y G3 = 2 (7,1%).

En el presente estudio se seleccionaron 24 tumores cada uno de los cuales se sometió a una reagrupación de acuerdo con el sistema de clasificación TNM y la clasificación nuclear de Fuhrman, según su estadio patológico y grado nuclear: T1, T2, G1 y G2. Se organizaron cuatro grupos experimentales de los estadios iniciales de la siguiente manera: T1G1 (n = 6), T2G1 (n = 4), T1G2 (n = 7) y T2G2 (n = 7). El diseño y los métodos de esta investigación fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste y por el Departamento de Investigaciones Médicas del Hospital J. R. Vidal de Corrientes, Argentina.

4.2. Inmunodetección de proteínas (Western Blot)

4.2.1. Obtención de homogeneizados celulares y de tejido

En el caso de tejidos, las muestras fueron trituradas y homogeneizadas en buffer de lisis a 4°C. Para muestras de cultivos celulares, las células adherentes se lavaron 2 veces con PBS antes de ser raspadas en 200 µL de buffer de lisis frío (10 mM HEPES pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM ditiotreitól, 0.1% IGEPAL, suplementado con cóctel inhibidor de proteasas). Posteriormente se dejaron en hielo durante 20 minutos y se centrifugaron a 12000 rcf durante 10 minutos a 4°C, para luego recoger los sobrenadantes. Se cuantificaron las concentraciones proteicas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976; Stoscheck, 1990), utilizando como patrón de concentraciones conocidas albumina de suero bovino (BSA). Se tomó el volumen correspondiente a 50 µg de proteína total al que se añadió el buffer de muestra (Buffer Laemmli:

Tris-HCl pH 6.8, glicerol, SDS, azul de bromofenol, 2-mercaptoetanol). Las muestras se hirvieron a 100°C durante 4 minutos antes de cargar en los geles de acrilamida.

4.2.2. Cuantificación de proteínas – Técnica de Bradford

Las proteínas de los homogeneizados fueron cuantificadas mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Se basa en un método colorimétrico, en el cual se mide a 595 nm la absorbancia del azul de Coomassie G-250 cuando interacciona de forma no covalente en medio ácido con las proteínas.

Para cuantificar se realizó una curva de calibrado con BSA, a partir de la cual por extrapolación lineal se determinó la cantidad de proteínas en las muestras.

4.2.3. SDS-PAGE

La electroforesis se realizó según el método descrito por Laemmli (Laemmli U. K., 1970). Se usaron geles de acrilamida/bis-acrilamida al 8 o el 12% según la proteína en estudio y se corrieron en buffer de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, SDS 0.1%, H₂O destilada) durante los primeros 30 minutos a 50 V y luego durante 3 horas a 100 V, controlando la electroforesis mediante un frente de corrida. Se utilizaron dos geles (Running y stacking, o up y lower) para que la electroforesis fuera homogénea.

4.2.4. Transferencia e inmunodetección

Una vez que las muestras corrieron completamente en el gel, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD), utilizando buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, H₂O destilada; pH final 8.3). Este proceso se realizó mediante la aplicación de una intensidad de corriente constante de 300 mA durante 2 horas y a 4°C.

La transferencia se comprobó mediante tinción de las proteínas con Rojo Ponceau (Sigma), y luego dicho colorante fue retirado de la membrana tras varios lavados.

Para disminuir la adsorción inespecífica del anticuerpo primario, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó 2 veces con PBS.

Las membranas fueron incubadas con las diluciones óptimas de los anticuerpos primarios por 12 horas a 4°C. Seguidamente, los anticuerpos primarios fueron retirados y las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween. Tras ello, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) en solución de TBS por 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo no ligado se eliminó tras una serie de lavados

con TBS-Tween. El revelado se llevó a cabo mediante un sistema de quimioluminiscencia (ECL Western Blotting Substrate - Promega) en placas de rayos X en algunos casos y en otros utilizando el sistema 4-cloro-1-naftol 0,03% en metanol y H₂O₂, deteniendo la reacción en H₂O. Se utilizó en todos los casos la detección de la β -actina como control de carga. Se realizó densitometría en imágenes escaneadas utilizando el software ImageJ, y los valores se normalizaron para los controles correspondientes de cada experimento. Los resultados se expresaron como la relación entre densidades ópticas de la proteína y la β -actina. Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces.

4.2.5. Anticuerpos y diluciones utilizadas

- Anti- β -actina monoclonal de ratón. Sigma Aldrich. Dilución 1:500.
- Anti-HIF-1 α monoclonal de ratón. Novus Biological, Littleton, CO. Dilución 1:500.
- Anti-EPO policlonal de conejo: H-162, sc-7956. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:500.
- Anti-EPO-R policlonal de conejo: H-194, sc-5624. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:500.
- Anti-SCD-1 policlonal de cabra: E-14, sc-30435. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:500.
- Anti-MRP4 monoclonal de ratón: F-6, sc-376262. Santa Cruz Biotechnology Dilución 1:500.
- Anticuerpo Secundario: m-IgGk BP-HRP: sc-516102. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:5000.

Los controles negativos se obtuvieron excluyendo el anticuerpo primario de la reacción.

4.3. Inmunohistoquímica (IHQ)

Se utilizó el protocolo estándar de fijación e inclusión de muestras en parafina. Se deshidrataron los tejidos en alcoholes de graduación creciente y luego un se realizó el aclaramiento con alcohol butílico. A partir de allí se confeccionaron los tacos de inclusión y se procedieron a los cortes histológicos con micrótopo. Luego las secciones incluidas en parafina se desparafinaron y rehidrataron en alcoholes graduados decrecientes utilizando protocolos de rutina.

Posteriormente los preparados fueron lavados dos veces con PBS por 10 minutos cada vez. Utilizando Tritón X-100 al 1% en PBS por 5 minutos, se llevó a cabo la permeabilización de las membranas celulares y luego se lavó 2 veces con PBS Tween por 10 minutos.

Tabla 4.1. Protocolo de fijación e inclusión de muestras en parafina

Reactivo	Tiempo
Alcohol 70%	1 hora
Alcohol 80%	1 hora
Alcohol 96%	1 hora
Alcohol 100%	1 hora
Alcohol Butílico	1 hora
Alcohol butílico + parafina 1:1	12 horas
Parafina I	8 horas
Parafina II	8 horas
Xilol	10 minutos
Alcohol 100%	5 minutos
Alcohol 96%	5 minutos
Alcohol 70%	5 minutos
H ₂ O destilada	10 minutos

El bloqueo de peroxidasas endógenas se realizó con H₂O₂ 100 vol. al 3% en PBS durante 15-20 minutos. Luego se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS. El bloqueo para evitar uniones inespecíficas se llevó a cabo con albúmina al 1% en PBS-Tween por un lapso de 15 minutos y luego se repitieron los dos lavados con PBS, de 10 minutos cada uno. Se incubaron en cámara húmeda, 12 horas a 4°C, las muestras con los anticuerpos primarios en diluciones ajustadas. Posteriormente se llevó a cabo 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS. Para el revelado se utilizó el kit DAKO; el anticuerpo secundario biotinilado se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Luego se hicieron 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS. Se incubó la Estreptavidina conjugada con HRP por 20-30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con PBS 2 veces por 10 minutos. Se reveló con DAB (Diaminobencidina) aproximadamente 5 minutos y luego se lavó por 5 minutos con H₂O destilada. Se utilizó hematoxilina al 50% como tinción de contraste durante 1 minuto. Luego se procedió a la deshidratación mediante el uso de alcoholes crecientes por 1 minuto cada uno: Etanol 70%, etanol 96%, etanol 100%. Se aclaró empleando xilol por 5 minutos y finalmente se montó con Bálsamo de Canadá. Los preparados se visualizaron mediante microscopía óptica. Las imágenes se registraron con una cámara micro-digital Olympus Coolpix instalada en un microscopio CX-35 (Olympus, Japan).

Anticuerpos y diluciones utilizadas:

- Anti-EPO policlonal de conejo: H-162, sc-7956. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:100.

- Anti-EPO-R policlonal de conejo: H-194, sc-5624. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:100.
- Anti-VEGF monoclonal de ratón: C-1, sc-7269. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:100.
- Anti-VEGFR-2 monoclonal de conejo: # 2479. Cell Signaling Technology. Dilución 1:100.
- Anti-Ki-67 policlonal de conejo: H-300, sc-15402. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:100.
- Anti-SCD-1 policlonal de cabra: E-14, sc-30435. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:100.
- Anti-MRP4 monoclonal de ratón: F-6, sc-376262. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:100.
- Anticuerpo Secundario: m-IgGκ BP-HRP: sc-516102. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:50.

Los controles negativos se obtuvieron excluyendo el anticuerpo primario de la reacción.

4.4. Cultivos celulares

4.4.1. Cultivos de líneas celulares

En este trabajo se utilizaron 3 líneas celulares:

- CAKI-1 (ATCC® HTB-46™): Línea celular de CRCC humana, con morfología epitelial y propiedades adherentes. Derivada de una metástasis de cáncer de piel. Fueron proporcionadas generosamente por el Dr. Alfredo Martínez Ramírez (Centro de Investigaciones Biomédicas de La Rioja, Logroño, España).
- CAKI-2 (ATCC® HTB-47™): Línea celular de CRCC humana, de morfología epitelial con desarrollo en cultivo adherentes. Obtenidas a partir de la generosa donación del Dr. Ricardo Sánchez Prieto (Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, España).
- HCT-116 (ATCC® CCL-247™): Línea de células tumorales de colon con morfología epitelial y propiedad adherentes. Utilizada como control positivo de expresión de MRP4.

El cultivo de estas células se llevó a cabo en incubadoras a 37°C, en atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂, siguiendo las pautas establecidas por la American Type Culture Collection (ATCC).

Para el desarrollo de las mencionadas líneas celulares se utilizó medio modificado McCoy's 5a suplementado con 10% de SFB y 50 µg/mL de Gentamicina.

Para ensayos que implicaron la administración de una droga al medio de cultivo, el SFB se añadió en concentraciones de 1% para evitar interferencias por efectos de la albúmina (medios de cultivos restringidos).

En todos los casos se trabajó en condiciones de esterilidad y con controles de contaminación microbiológica.

Los subcultivos se llevaron a cabo en confluencias celulares cercanas al 90%. El recuento y viabilidad celular, se determinó en cámara de Neubauer con tinción azul de tripán al 0,4% o

utilizando el kit XTT® (TACS® XTT Cell proliferation Assay) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

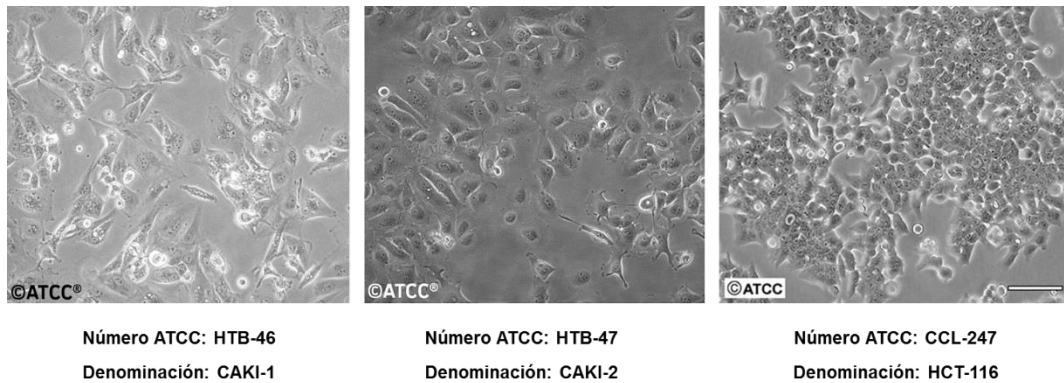


Figura 4.1. Líneas celulares utilizadas para ensayos *in vitro*. Fotografías obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC).

4.4.2. Cultivos primarios de CRCC

Se utilizaron muestras de pacientes con CRCC. Se aplicó el método descrito por Valente y colaboradores (Valente et al., 2011), ajustando variables técnicas a las condiciones experimentales para optimizar el rendimiento de los cultivos. Se procedió a la remoción de restos necróticos, coágulos y tejido fibroso en placas de Petri estériles. Los fragmentos de tejidos se seccionaron con bisturí hasta lograr recortes de 1 mm³ y se lavaron varias veces con solución fisiológica fría suplementada con antibióticos (penicilina 50 U/mL y estreptomicina 50 µg/mL) y antimicóticos (anfotericina B 2,5 µg/mL). Luego, los pequeños fragmentos se digirieron con colagenasa (1 mg/mL - Sigma®) en buffer de digestión HBSS (pH = 7,6). Se realizó una incubación de 20 minutos a 37°C con agitación suave permanente. Se efectuaron dos lavados con posterior centrifugación a 400 rcf por 5 minutos a 4°C para luego resuspender las células en medio de cultivo.

Previo al cultivo se determinó la viabilidad y la celularidad con azul de tripán (0,4%) a través de microscopía óptica en cámara de Neubauer. Las células aisladas se sembraron en placas de cultivo recubiertas previamente con gelatina 0,2% P/V en PBS 1x. La incubación se realizó en estufa gaseada con 5% CO₂ a 37°C y con atmósfera saturada de humedad. Se trabajó con medio modificado McCoy's 5a suplementado con 10% SFB, glutamina 5 µg/mL, transferrina 5 µg/mL, y los antibióticos y antimicótico mencionados en las mismas concentraciones. El medio de cultivo se renovó a las 24 horas. Se dejó que el cultivo alcance 80-90% de confluencia antes de realizar los subcultivos.

4.5. Tinción Red oil

La tinción Red oil es utilizada para la detección de lípidos neutros, proporcionando una intensa coloración roja-anaranjada ante la presencia de dichas macromoléculas.

El reactivo Red oil (Sigma Aldrich) se obtuvo disolviendo 0,5 gramos en 100 mL de isopropanol. A partir de esta solución stock, se preparó la solución de trabajo diluyendo 30 mL de la solución stock en 20 mL de H₂O destilada. Finalmente se filtró la misma.

En primera instancia, las células de cultivos primarios de CRCC fueron fijadas con formol-bufferado al 10% (pH 7,2-7,4) por 45 minutos o paraformaldehído 4% por 1 hora. Luego de eliminar la solución de fijación, las células fueron tratadas con isopropanol al 60% por 30 segundos. Después se añadió la solución Red oil por 10 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se eliminó el reactivo y se procedió a lavar repetidas veces con H₂O destilada. Las imágenes se registraron con una cámara micro-digital Olympus Coolpix instalada en un microscopio CX-35 (Olympus, Japan).

4.6. Inmunocitoquímica (ICQ)

El primer día, las correspondientes células (CAKI-1, CAKI-2 y HCT-116) se cultivaron en medio modificado McCoy's 5a suplementado con 10% SFB sobre cubreobjetos de vidrio dentro de placas de cultivos, en densidad celular óptima. Al cumplirse 24 horas y con células en confluencia adecuada, las mismas se lavaron varias veces con PBS 1x previa eliminación del medio de cultivo. A continuación, se fijaron las células añadiendo paraformaldehído 4% o metanol por 10 minutos. Se retiró el fijador y se lavó repetidas veces con PBS 1x. Se permeabilizaron las membranas celulares utilizando Tritón X-100 (1% en PBS) durante 10 minutos y en agitación constante. Los preparados fueron lavados con PBS 1x. Luego los bordes de los cubreobjetos fueron denotados con marcador hidrofóbico, y las células se incubaron en cámara húmeda durante 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente en cada caso. Finalizada la incubación se procedió a lavar con PBS 1x e incubar 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. El revelado se llevó a cabo de la misma manera que la IHQ.

El montaje se realizó con glicerina al 50% y la observación por microscopía óptica con aumentos 50x, 100x, 200x y 400x. Las imágenes se registraron con una cámara micro-digital Olympus Coolpix instalada en un microscopio CX-35 (Olympus, Japan).

Anticuerpos y diluciones utilizadas:

- Anti-MRP4 monoclonal de ratón: F-6, sc-376262. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:100.
- Anti-Caspasa 3 monoclonal de ratón: (3C119) sc-70497. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:100.

- Anti-HIF-2 α policlonal de conejo. LS-C387091. LifeSpan BioSciences. Dilución 1:100.
- Anticuerpo Secundario: m-IgG κ BP-HRP: sc-516102. Santa Cruz Biotechnology. Dilución 1:50.

4.7. Extracción - purificación de ARN y RT-qPCR

4.7.1. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN total se trabajó con homogeneizados de tejidos y con células en cultivo, en este último caso, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las monocapas celulares 2 veces con PBS 1x. Se añadió TRIzol® a cada placa de cultivo (el volumen de TRIzol es dependiente del recuento celular). Las células se rasparon y se pasaron a un tubo tipo *ependorf* para la extracción del ARN según las instrucciones del fabricante (Chomczynski & Sacchi, 1987; Hummon et al., 2007). Luego de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 200 μ L de cloroformo y tras agitar en vortex durante 15 segundos se incubaron de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14000 rcf y 4°C durante 15 minutos, se extrajo la fase acuosa (fase superior), a la que se añadieron 500 μ L de isopropanol para precipitar el ARN. La mezcla se agitó en vortex 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se procedió a centrifugar 5 minutos a 10400 rcf y 4°C. Se eliminó el sobrenadante, y el pellet de ARN se lavó con 1 mL de etanol en H₂O DEPC al 70% (V/V) centrifugando 5 minutos a 4100 rcf y 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de ARN se dejó secar por 8 minutos a 37°C para eliminar interferencias del etanol. Finalmente, el ARN extraído se resuspendió en 40 μ L de H₂O DEPC y se determinó su pureza y concentración midiendo la absorbancia en espectrofotómetro (Jenway 7305 – UV/Visible) a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

4.7.2. Purificación del ARN

Previo al paso de retrotranscripción, se procedió a purificar el ARN, eliminando posibles restos de ADN genómico arrastrado en el proceso extracción. Para lo cual se utilizó el kit Turbo DNA-free™ (Invitrogen). En el dicho protocolo algunos volúmenes variaron de acuerdo con el origen de la muestra: Células de cultivo o tejido, en el último caso la purificación debió ser más intensa. En tubo *ependorf* se adicionó el volumen correspondiente a 2,5 μ g de ARN, 5 μ L del buffer de la enzima DNAsa, 1 a 2 μ L de la enzima DNAsa y se completó con H₂O DEPC hasta 50 μ L. La mezcla se incubó de 30 a 45 minutos a 37°C, y luego se adicionó 5 μ L de un inactivador de la enzima. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente homogeneizando en vortex ocasionalmente. Se centrifugó a 10400 rcf por 2 minutos y se extrajo el sobrenadante con el ARN purificado.

4.7.3. Retrotranscripción

Para la síntesis de las copias de ADN (ADNc), se partió del volumen correspondiente a 2 µg de ARN purificado al que se añadió 2 µL de random primers, 2 µL de cebadores oligo dT y H₂O DEPC hasta completar un volumen total de 14.6 µL. Esta mezcla se calentó a 78°C durante 3 minutos. Las muestras se colocaron en hielo 10 minutos y se les añadió 2 µL de buffer de reacción, 0.4 µL de la mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 25 mM, 2 µL de inhibidor de RNAsa (20 U/mL) y 1 µL de la retrotranscriptasa de virus de leucemia murina de Maloney (M-MLV, 100 U/mL), alcanzando así el volumen final de la reacción a 20 uL exactos. La reacción se realizó a 37°C durante 1 hora y posteriormente se inactivó la enzima a 92°C durante otros 10 minutos. Finalmente se añadieron 380 µL de H₂O ultrapura Milli-Q, logrando así una concentración de 5 ng/µL.

4.7.4. PCR convencional

Se partió de 20 ng obtenidos de la retrotranscripción, al que se añadieron 2.5 µL de mezcla de dNTPs 2 mM, 5 µL de Green Buffer Taq 5x, 0,12 µL de la enzima Taq DNA polimerasa, 0,5 µL del cebador forward y 0,5 µL del cebador reverse (ambos 10 µM), completando con H₂O ultrapura Milli-Q hasta un volumen final de 25 µL.

El programa de temperaturas usado para la amplificación del ADNc fue el siguiente:

Tabla 4.2. Programa de PCR convencional

Etapa	Temperatura	Tiempo (segundos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	240	1
Desnaturalización	95°C	30	40
Anillado	50 - 68°C	45	
Elongación	72°C	30	
Elongación final	72°C	450	1

4.7.5. Electroforesis en gel de agarosa

Una vez obtenidos los amplicones de los genes de interés y sus correspondientes housekeeping (genes de referencia), se realizó la separación de estos por electroforesis en gel de agarosa (2% P/V en TBE). Junto con las muestras se adicionó un control negativo de amplificación y un marcador de peso molecular de ADN. Se corrió el gel en buffer de electroforesis TBE 1x a 100 voltios durante 60 minutos. Utilizando un transiluminador de emisión UV y el reactivo de unión

al ADN denominado GelRed® (Biotium) se observaron las bandas de amplificación de ADN de los genes de interés y se compararon con el marcador de peso molecular y los housekeeping.

4.7.6. PCR cuantitativa (qPCR)

Esta técnica permitió cuantificar el cambio en los niveles de expresión de un gen, en términos de transcripción de su correspondiente ARNm, de los tejidos analizados y células en cultivo que fueron tratadas con algunas drogas (estimuladas/inhibidas) respecto a un control sin tratamiento; en ambos casos se normalizaron las expresiones respecto a un gen de referencia. Para la reacción de amplificación se usó el kit comercial Solís BioDyne - 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX), el cual contiene la enzima polimerasa, buffer de reacción, MgCl₂, dNTPs, el intercalante de emisión fluorescente EvaGreen y ROX (normalizador de la señal de fluorescencia). La mezcla (master mix) se llevó a cabo de la siguiente manera:

Tabla 4.3. Mezcla de componente para la qPCR

1 muestra	
Mix	2 µL
Primer F 500 nM	0,5 µL
Primer R 500 nM	0,5 µL
H ₂ O ultrapura Milli-Q	6 µL

Se añadió dicha máster mix en cada pocillo (well) de reacción y luego se agregó 1µL (20 ng) de ADNc en cada well. Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo Applied Biosystems 7500 siguiendo las condiciones detalladas a continuación:

Tabla 4.4. Protocolo de amplificación qPCR

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación inicial	95°C	12 minutos	
Desnaturalización	95°C	15 s	40
Annealing	60°C	20 s	
Elongación	72°C	20 s	
Melting	95°C – 60°C – 95°C		

La cuantificación se llevó a cabo determinando el ciclo umbral (Ct) que se define como el ciclo de la reacción en el cuál la amplificación comienza a ser exponencial y aplicando el algoritmo

$2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001), comparando el ciclo umbral del gen en estudio con el del gen de referencia, para todas las condiciones experimentales.

Todos los cebadores (tabla 4.5) utilizados fueron testeados para determinar su especificidad utilizando el programa Primer-BLAST disponible en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Tabla 4.5. Lista de cebadores/primers utilizados

Genes humanos	Cebadores/primers
<i>β-ACTINA</i> pb = 250	Forward CATGTACGTTGCTATCCAGGC Reverse CTCCTTAATGTCACGCACGAT
<i>GAPDH</i> pb = 108	Forward ATGGGGAAGGTGAAGGTCG Reverse GGGGTCATTGATGGCAACAATA
<i>SCD-1</i> pb = 116	Forward TTCCTACCTGCAAGTTCTACACC Reverse CCGAGCTTTGTAAGAGCGGT
<i>MRP4 (ABCC4)</i> pb = 141	Forward TGCAAGGGTTCTGGGATAAAGA Reverse CTTTGGCACTTTCCTCAATTAACG
<i>OATP4C1 (SLCO4C1)</i> pb = 119	Forward GTCAATCTTAGGCCCTGCTATTG Reverse CTCCCAACCATCGCGGAT
<i>HIF-1A</i> pb = 201	Forward GAGGTTGAGGGACGGAGATTT Reverse TGGCTGCATCTCGAGACTTT
<i>HIF-2A (EPAS 1)</i> pb = 356	Forward AACTTGTGCACCAAGGGTCA Reverse GAGATGATGGCGTCTCCTGG

4.8. Análisis bioinformático (*in silico*)

Para determinar el valor pronóstico de la expresión de *MRP4* y *OATP4C1* en pacientes diagnosticados con CRCC, primero se evaluó los niveles de expresión del ARNm utilizando resultados almacenados en la base de datos Array Express. A través de un script, la identificación de la plataforma de secuenciación utilizada en cada estudio se recuperó del sitio NCBI, luego se descargó la tabla de datos de la plataforma con la identificación de la sonda para *MRP4* y *OATP4C1*. El archivo de matriz de expresión para cada estudio se descargó a través del sitio FTP del NCBI. Luego, se extrajeron los niveles de expresión de los transcritos de *MRP4* y *OATP4C1* para cada muestra junto con sus respectivas descripciones. Esto se utilizó para evaluar la existencia de expresión diferencial entre los tipos de muestras (CRCC frente a secciones renales no tumorales adyacentes) (Barrett et al., 2013; Jones et al., 2005).

4.9. Ensayos de viabilidad y proliferación celular

Los ensayos de viabilidad y proliferación celular se midieron mediante tinción con azul de tripán al 0,4% y recuento en cámara de Neubauer en microscopio óptico, o utilizando el kit XTT® midiendo las absorbancias a 450 nm (con longitud onda de referencia de 630 nm) en lector de ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dichos ensayos fueron utilizados tras el tratamiento de cultivos celulares con una determinada droga o luego de subcultivos.

Tabla 4.6. Drogas y tratamientos farmacológicos utilizados

Droga utilizada	Concentraciones
CoCl ₂	100, 200, 300 y 400 µM
CAY 10566	3 µM
Ácido oleico (18:1n-9)	50 µM
MK-571	25 µM
Probenecid	0,5 mM
FSK	25 µM
IBMX	1 mM
AMP _c	5, 10, 50 y 100 µM
Estaurosporina (STP)	1 µM

4.10. Lipidómica

4.10.1. Extracción lipídica por Bligh & Dyer

Se utilizó el protocolo descrito por Bligh & Dyer (Bligh and Dyer, 1959) tanto para los homogeneizados de tejido renal como para células en cultivos.

Las muestras se normalizaron respecto a una determinada concentración proteica mediante el método Bradford por espectrofotometría (Jenway 7305 – UV/Visible). Luego las mismas se resuspendieron en 200 µL de H₂O ultrapura Milli-Q y se añadieron los estándares internos específicos. Posteriormente, se agregó 750 µL de una solución cloroformo/metanol 1:2 (V/V) y tras agitar vigorosamente durante un minuto, se incorporaron 250 µL de cloroformo y 250 µL de H₂O ultrapura Milli-Q. Las muestras se agitaron nuevamente por un minuto y luego se centrifugaron a 650 rcf durante 5 minutos a 16°C. Los lípidos permanecieron en la fase orgánica inferior; dicha fase se transfirió con cuidado a otro tubo. Finalmente se hizo una segunda

extracción añadiendo 400 μL de cloroformo, repitiendo el proceso y reuniendo las fases orgánicas de ambas extracciones. Las muestras se evaporaron por centrifugación al vacío y fueron conservadas a -76°C para su posterior procesamiento.

4.10.2. Separación de especies lipídicas por TLC

La separación por cromatografía en capa fina (TLC) se llevó a cabo usando placas de sílice como fase estacionaria. Dichas placas fueron previamente activadas por calor en estufa a 70°C durante 4 horas, para eliminar posibles restos de H_2O . Las cubas cromatográficas de vidrio se cargaron con la fase móvil (hexano/éter etílico/ácido acético en relación 70:30:1) dos horas antes de iniciar la cromatografía para asegurar una atmósfera saturada de vapor de la correspondiente fase (Fuchs et al., 2011). Los extractos secos obtenidos del Bligh & Dyer, se resuspendieron en 20 μL de cloroformo/metanol 2:1 (V/V) en baño de hielo y luego se sembraron en las placas junto con los patrones de cada especie de lípidos a separar.

Los patrones se sembraron de manera puntual cada uno por separados (2,5 μL /carril) y todos juntos en una mezcla. Se utilizó como patrón de **DAG**: Dioleil Glicerol, **FFA**: 18:1n-9, **TAG**: 1,2-dioleil, 3-palmitoil Glicerol y **CE**: ésteres de colesterol 10:0 y 22:0 (en este caso, el I_2 se adiciona al doble enlace del colesterol). No se usaron patrones de PLs ya que los mismos permanecen en la línea de siembra.

Se colocaron las placas de sílice en el interior de la cuba, teniendo especial cuidado que las siembras no se sumerjan en la fase móvil. Se dejó correr por 50 minutos controlando el frente de corrida a simple vista. Finalizada la corrida, se cortaron las calles correspondientes a los patrones y se colocaron 2 minutos en una cámara con I_2 sólido, para que los vapores de éste se adicionen a los dobles enlaces, revelando así los lípidos insaturados como manchas amarillas. Luego los revelados se superpusieron a las calles de las muestras y se marcaron las posiciones para raspar la sílice con los lípidos separados.

4.10.3. Extracción de lípidos de la sílice

Las regiones correspondientes a cada clase de lípido de interés se rasparon de las placas con bisturí y se recogieron en tubos *Eppendorf* de 1.5 mL. La extracción de los lípidos adsorbidos se realizó mediante la adición de 1 mL de cloroformo/metanol 1:1 (V/V), la agitación durante 2 minutos y la decantación de la sílice mediante centrifugación a 650 rcf a 4°C durante 5 minutos. Se recogió la fase líquida superior, y se hizo una segunda extracción de la sílice con 1 mL de cloroformo/metanol 2:1 (V/V), reuniendo con la fase orgánica anterior. Se evaporó el solvente por centrifugación al vacío para su posterior procesamiento.

4.10.4. Derivatización de lípidos – Transmetilación total

La transmetilación total es una reacción química utilizada para metilar el grupo carboxilo de los ácidos grasos, que pueden estar o no esterificados antes de la reacción. Como resultados se obtienen los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) separados del esqueleto de glicerol en PLs, DAG, TAG y CE para el caso del colesterol libre.

Esta reacción está pensada para disponer las muestras de ácidos grasos para su posterior análisis por cromatografía gaseosa/espectrometría de masa (GC/MS). La finalidad del proceso de metilación no busca solamente facilitar la extracción de los ácidos grasos (también se puede hacer hidrolizando el enlace éster sin más), sino que además dichos ácidos grasos reducen su polaridad al ocupar el extremo carboxilo libre, por lo cual lo vuelven más volátiles, característica requerida para lograr ser transportado por el He₂ en la columna de la GC. También, los ácidos grasos metilados son compuestos con mayor estabilidad y menos degradables.

La idea de la reacción es añadir metanol, el cual cede los grupos metilo a un ácido o una base.

4.10.5. Transmetilación de PLs, DAG y TAG

Los extractos lipídicos extraídos de la sílice, correspondientes a PLs, DAG y TAG, se resuspendieron en 60 µL de cloroformo/metanol 2:1, y se trasvasaron por separados a tubos de vidrio.

La reacción se llevó a cabo añadiendo 500 µL de KOH 0,5 M en metanol y los tubos se incubaron a 37°C durante 30 minutos con agitación. Luego se neutralizó la reacción añadiendo 500 µL de HCl 0.5 M en H₂O.

Se extrajeron los FAMES con 1 mL de hexano tras mezclar en vortex y centrifugar en frío (4°C) por 5 minutos a 650 rcf. Los FAMES permanecieron en la fase superior del tubo. El proceso mencionado se repitió, y los sobrenadantes se reunieron en un mismo tubo eppendorf de 2 mL para luego evaporar el solvente. Se almacenó a -76°C hasta su inyección en el GC/MS.

4.10.6. Transmetilación de FFA

A diferencia de las especies lipídicas anteriores, los FFA se transmetilaron mediante catálisis en medio ácido. Para ello los extractos de FFA obtenidos de la sílice se resuspendieron en 50 µL de tolueno y se trasvasaron a un tubo de vidrio. Se añadió 450 µL de HCl 0.5% en metanol anhidro y se dejó reaccionar a 45°C durante 20 minutos. Se frenó la reacción neutralizando con 450 µL de KOH al 0,5% en solución acuosa y se agregó 500 µL de H₂O ultrapura Milli-Q. Se extrajeron los FAMES con 1 mL de *n*-hexano tras mezclar y centrifugar en frío a 650 rcf como se describió

anteriormente. El proceso anterior se repitió, y los sobrenadantes se reunieron en un mismo tubo eppendorf de 2 mL para luego evaporar el solvente. Se almacenó a -76°C hasta su inyección en el GC/MS.

4.10.7. Transmetilación de CE

Los extractos secos de CE obtenidos de la sílice, se resuspendieron en 400 μL de propionato de metilo, el cual actúa como disolvente al ser miscible con el metanol, y se trasvasó a un tubo de vidrio. Se añadió 600 μL de KOH 0,84 M en metanol, y se dejó reaccionar 1 hora a 37°C . Luego se neutralizó la reacción con 100 μL de ácido acético y se adicionó 1 mL de H_2O ultrapura Milli-Q más 1 mL de hexano, que tras mezclar y centrifugar en frío 5 minutos a 650 rcf se extrajeron los FAMES. El proceso anterior se repitió, y los sobrenadantes se reunieron en un mismo tubo eppendorf de 2 mL para luego evaporar el solvente. Se almacenó a -76°C hasta su inyección en el GC/MS.

4.10.8. Análisis de FAMES por GC/MS

El análisis de los FAMES se llevó a cabo por GC/MS usando un equipo Agilent con inyección automática y un analizador de masas tipo cuadrupolo, operando en modo de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV. Para la separación de FAMES se utilizó una columna modelo Agilent DB23 (60 m longitud x 250 μm diámetro interno, 0.15 μm de espesor de película) cuya fase estacionaria fue 50%-cianopropil-metilpolisiloxano. El protocolo para la separación utilizado se adaptó al de Abu *et al.* (Abu & Oluwatowoju, 2009), con algunas variantes para una mejor separación de los FAMES.

La temperatura del puerto de inyección se mantuvo a 250°C para que la muestra fuese rápidamente volatilizada. La temperatura de la línea de transferencia entre el final de la columna y la fuente de ionización del espectrómetro de masas se mantuvo a 250°C . La temperatura del cuadrupolo se ajustó a 150°C y la de la fuente de ionización a 230°C .

Se utilizó He como gas carrier, el cual se mantuvo a una presión constante de 26.1 psi. Se inyectó en todos los casos 1 μL de muestra disuelta en *n*-hexano.

La adquisición de datos en el espectrómetro de masas se llevó a cabo a partir del minuto 5 desde la inyección de la muestra, para evitar monitorear la señal generada por el disolvente. La identificación de compuestos se realizó en modo TIC (corriente total de iones) haciendo un barrido de masas desde $m/z = 0$ a $m/z = 450$. En este modo de trabajo, la señal obtenida a cada tiempo de retención fue la suma total de las señales de todos los iones del rango de m/z seleccionado que alcanzaron el detector en ese momento. La identificación de cada compuesto

se llevó a cabo mediante su tiempo de retención, comparando con el de los FAMES comerciales, así como con los fragmentos característicos producidos en la ionización por impacto electrónico, ampliamente descritos en bibliografías (Christie, 1998; Eder, 1995; McLafferty, 1959; Pulfer & Murphy, 2003).

La cuantificación de FAMES se realizó en modo SIM (monitorización de iones seleccionados), usando para cada tipo de analitos de interés sus iones fragmentos característicos. Se llevó a cabo la integración del área bajo la curva de su pico cromatográfico. Para lograr un análisis cuantitativo exacto se utilizaron calibradores comerciales con FAMES estándares. El rendimiento del proceso de extracción de lípidos, separación y derivatización se calculó en base a la cantidad de estándares internos obtenidos al final.

La calibración del espectrómetro de masas se realizó con un estándar de perfluorotributilamina siguiendo las instrucciones del equipo.

4.10.9. Análisis de eicosanoides por LC/MS

El análisis de eicosanoides por LC/MS se llevó a cabo exactamente como lo describe (Rubio et al., 2015), utilizando un cromatógrafo líquido de alto rendimiento Agilent 1260 Infinity equipado con una bomba cuaternaria Agilent G1311C y un muestreador automático Agilent G1329B, acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo API2000 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.).

Se utilizó una columna SUPELCOSIL LC-18. La fase móvil consistió en un gradiente de solvente A (H₂O/acetonitrilo/ácido acético, 70:30:0,02) y disolvente B (acetonitrilo/isopropanol, 50:50). El gradiente se inició en 100% de disolvente A, luego a los 3 minutos se redujo al 75%, a los 11 minutos al 55%, a los 13 minutos al 40%, a los 18 minutos al 25% y 10% a los 18,5 minutos.

El caudal a través de la columna se fijó en 0,6 mL/minutos y este flujo ingresó en la interfaz del electrospray del espectrómetro de masas.

Los parámetros utilizados fueron: voltaje de pulverización de iones 24500 V; cortina de gas 25 psi; gas nebulizador 40 psi.

El modo de analizador se configuró para monitoreo programado de reacciones múltiples con ionización negativa. La ventana de tiempo de retención se estableció en 2 minutos.

La cuantificación se realizó integrando los picos cromatográficos de cada especie y comparándolos con una curva de calibración realizada con patrones analíticos.

4.11. Ensayo de extrusión de AMPc – RIA

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo y, antes de cada experimento, el medio de cultivo se reemplazó por medio sin rojo fenol (Sigma-Aldrich) y sin SFB. Las células se expusieron durante 5 minutos a PBS (controles) o FSK 25 μM e IBMX 1 mM, con la finalidad de estimular la síntesis de AMPc e inhibir su degradación respectivamente. Después del tratamiento, en los tiempos indicados, las monocapas celulares y los sobrenadantes se extrajeron con etanol al 95% V/V con el fin de obtener el AMPc intracelular (i-AMPc) y extracelular (e-AMPc) respectivamente. A continuación, los extractos alcohólicos se evaporaron y los residuos se resuspendieron en buffer de proteína de radio-unión (RBP) (Tris-HCl 50 mM, EDTA 4 mM, pH 7,4, BSA 0,1%). El contenido de AMPc se determinó mediante un ensayo de RBP competitivo para PKA utilizando ^3H AMPc, como lo describe la bibliografía (Carozzo et al., 2015; Copsel et al., 2011). Así, la PKA titulada se incubó en condiciones de equilibrio (2 horas, 4°C) con las diferentes muestras y estándares de AMPc (0,1 a 90 pmol) en presencia de ^3H AMPc 2 nM (20,7 Ci/mmol, NET1161250UC; PerkinElmer) en buffer RBP. La fracción unida se separó mediante precipitación con carbono-dextrano, seguida de centrifugación (290 rcf, 15 minutos a 4°C) y se añadió cóctel de centelleo Optiphase HiSafe3 (PerkinElmer) a cada sobrenadante para el recuento en un contador Pharmacia Wallac 1410. Las concentraciones de AMPc de las muestras se determinaron interpolando a partir de las curvas de desplazamiento obtenidas de los estándares de AMPc usando Prism 7 (software GraphPad 7). Se analizaron muestras duplicadas de al menos tres experimentos independientes.

4.12. Microscopía confocal – Bodipy

A continuación, se describe el uso de un colorante fluorescente para lípidos neutros, conocido como BODIPY 493/503. Se utilizó el protocolo descrito en la bibliografía (Qiu & Simon, 2016).

Las células se sembraron en cubreobjetos (a una confluencia del 50%) previamente tratados con colágeno 2 mg/mL en PBS 1x en condiciones de esterilidad. Luego de los correspondientes tratamientos por tiempo determinado, las células se lavaron con PBS 1x varias veces para luego fijarlas por 20 minutos con paraformaldehído 4% en PBS (en este caso conteniendo sacarosa al 3%).

Posteriormente, se eliminó el paraformaldehído lavando las células tres veces con PBS 1x, y se realizó la tinción con BODIPY (2 μM) (Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes™) por 15 minutos a 37°C y luego con DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes™). Se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos con 25 μL de una solución de alcohol polivinílico hasta su análisis por microscopía.

Como control positivo del ensayo se utilizaron cultivos expuestos a 18:1n-9 (30 μ M). Por el contrario, las células no tratadas se utilizaron como controles negativos. Se utilizó un microscopio confocal BioRad laser scanning system Radiance 2100. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (NIH; Versión 1.52).

4.13. Ensayo de viabilidad y ciclo celular por citometría de flujo

Las células CAKI-2 fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos en medio de cultivo completo. Luego de 24 horas, se eliminó el medio de cultivo y se adicionó nuevo medio con los respectivos tratamientos celulares, además se trabajó con un control negativo. Cumplido los tiempos establecidos de los respectivos tratamientos, se retiraron los medios de cultivo, se lavaron las células con PBS 1x, y se colectaron las mismas utilizando tripsina-EDTA (GIBCO), la cual fue neutralizada posteriormente con SFB. Mediante una alícuota, las células se contaron en cámara de Neubauer con azul de tripán para determinar la viabilidad celular. A otra alícuota de 200 μ L se le añadió 2 μ L de yoduro de propidio (PI) y se procedió a la adquisición de datos de viabilidad mediante la detección de fluorescencia.

Mientras que con el volumen restante se procedió a la fijación y tinción para el análisis de ciclo celular.

4.13.1. Fijación y tinción

La suspensión celular se centrifugó a 800 rcf por 3 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y el pellet celular se resuspendió gota a gota con etanol frío al 70% para fijar las células. Se dejó incubando 1 hora a 4°C, luego se centrifugó a 800 rcf por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante de etanol. El pellet celular fijado se resuspendió en 300 μ L de PBS/EDTA 2 nM. Se ajustó la concentración celular a 1×10^6 células/mL, se adicionó 15 μ L de RNAsa 1 mg/mL (Sigma, Darmstadt, Alemania) y se incubó 15 minutos a 37°C. Finalizada la incubación, se agregó 15 μ L de yoduro de propidio 1 mg/mL (Sigma, Darmstadt, Alemania) y se volvió a incubar 15 minutos, pero en oscuridad.

4.13.2. Ciclo celular

Las células fueron localizadas en el gráfico Forward scatter (FSC) versus Side scatter (SSC). Se excluyeron los dobletes y se aplicó el gate de los singuletes a un histograma del canal del yoduro de propidio. El contenido de ADN de las células se analizó con FAC SCalibur (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.), y los datos se analizaron con el software FlowJo (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.).

4.13.3. Detección de apoptosis por citometría de flujo

El efecto de la inhibición de SCD-1 y MRP4 sobre la apoptosis celular, se evaluó mediante citometría de flujo. Basado en datos preliminares, el tiempo de exposición al inhibidor CAY 10566 (ABCAM®) se fijó en 18 horas, y la apoptosis en los cultivos celulares se analizó mediante marcación con anexina V-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (kit de detección BD Bioscience, San José, CA, EE. UU.), el cual reconoce la exposición de la fosfatidilserina de la membrana plasmática. Luego de lavar las células, la fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo en FL1 (Gallios; Beckman Coulter, Barcelona, España). Las células se incubaron con yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, Madrid, España) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS y oscuridad durante 5 minutos. La fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo en FL3. Los datos se analizaron con el software FlowJo versión 8.7.

4.14. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software GraphPad Prism 7. Se utilizó la prueba *t de Student* para datos no apareados o un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de ajuste de Bonferroni o Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

En los experimentos de lipidómica los datos medidos por MS, presentados en forma de masa molar, se relativizaron respecto a la cantidad de proteína de la muestra que se procesó.

En el caso de las qPCR y los Western Blot, los valores obtenidos corresponden a una cuantificación relativa respecto a un gen de referencia.

CAPITULO 5

RESULTADOS

SECCIÓN 1

*Estudio del Microambiente Hipóxico y del
Metabolismo Lipídico del Carcinoma Renal de
Células Claras (CRCC)*

5.1. El microambiente hipóxico en CRCC y su relación con la proliferación tumoral: expresión de HIF-1 α , EPO, EPO-R, VEGF, VEGFR-2 y Ki-67

El CRCC es una entidad oncológica compleja y de difícil tratamiento, cuya manifestación clínica deriva de los progresivos atributos que le permiten resistir a señales inhibitorias de crecimiento exógenas, evadir la apoptosis, perder la capacidad del control del ciclo celular, desarrollarse a pesar de un microambiente pobre en oxígeno (hipoxia), adquirir inmunotolerancia, generar factores angiogénicos, invadir la membrana basal y expandirse a otros tejidos (metástasis).

Para la consecución de los objetivos propuestos, en esta sección se describen las características de las muestras de CRCC estudiadas y los resultados obtenidos de la expresión de los determinantes moleculares microambientales implicados en la hipoxia renal (HIF-1 α , VEGF, VEGFR-2, EPO y EPO-R) en función de la proliferación tumoral (Ki-67).

Primeramente, se recolectaron los casos según lo descrito en la sección Materiales y Métodos. Se resumen las características de los pacientes y los datos clínico-patológicos en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Datos histopatológicos de los pacientes diagnosticados con CRCC.

Características	
Género (masculino/femenino)	19/9
Tamaño del tumor (cm)	7,47 (4,3–10,0)
Edad	57,5 (27–84)
Grado Histológico 1	10 (35,7%)
Grado Histológico 2	16 (57,2%)
Grado Histológico 3	2 (7,1%)
TNM I	13 (46,4%)
TNM II	11 (39,3%)
TNM III	3 (10,7%)
TNM IV	1 (3,6%)

Posteriormente, y considerando las mayores frecuencias halladas en estadios tempranos y bajos grados nucleares de CRCC, se procedió a reagrupar las muestras en cuatro grupos experimentales como se describió previamente (T1G1, T1G2, T2G1 y T2G2).

Con el fin de evaluar el microambiente hipóxico tumoral renal, se procedió a determinar la expresión de HIF-1 α mediante Western Blot en homogeneizados de muestras de CRCC, las

cuales fueron comparadas con muestras controles obtenidas de tejido renal distal de los mismos pacientes.

Se observó sobreexpresión de HIF-1 α en la mayoría de las muestras tumorales en comparación con sus respectivos controles (Figura 5.1 A). Las muestras de CRCC mostraron un aumento significativo de la expresión de HIF-1 α de aproximadamente 50% (Figura 5.1 B). Al analizar el porcentaje de aumento en la expresión de HIF-1 α en los diferentes subgrupos experimentales según estadio patológico y grado nuclear contra muestras controles, los resultados revelaron en todos ellos una sobreexpresión significativa de este factor transcripcional inducible por baja oxigenación tisular (Figura 5.1 C).

Dado que HIF-1 α influye directamente en la expresión de ciertos productos relacionados con la angiogénesis, como EPO, EPO-R, VEGF y VEGFR-2 (Lemus-Varela et al., 2010), se determinaron a continuación las expresiones de EPO/EPO-R por Western Blot y VEGF/VEGFR-2 por IHQ.

Los inmunoblottings revelaron que las proteínas EPO (Figuras 5.2 A, 5.2 B) y EPO-R (Figuras 5.3 A, 5.3 B) exhibieron un aumento significativo en las muestras de CRCC en comparación con las bandas obtenidas de los controles de tejidos distales. Por otra parte, muestras de CRCC del grupo T1G1, mostraron mayor expresión de EPO (aproximadamente 200% de aumento en comparación con los controles de tejidos distales, Figura 5.2 C), mientras que la expresión de EPO-R en los diferentes estadios de CRCC analizados no mostraron cambios significativos entre sí (Figura 5.3 C).

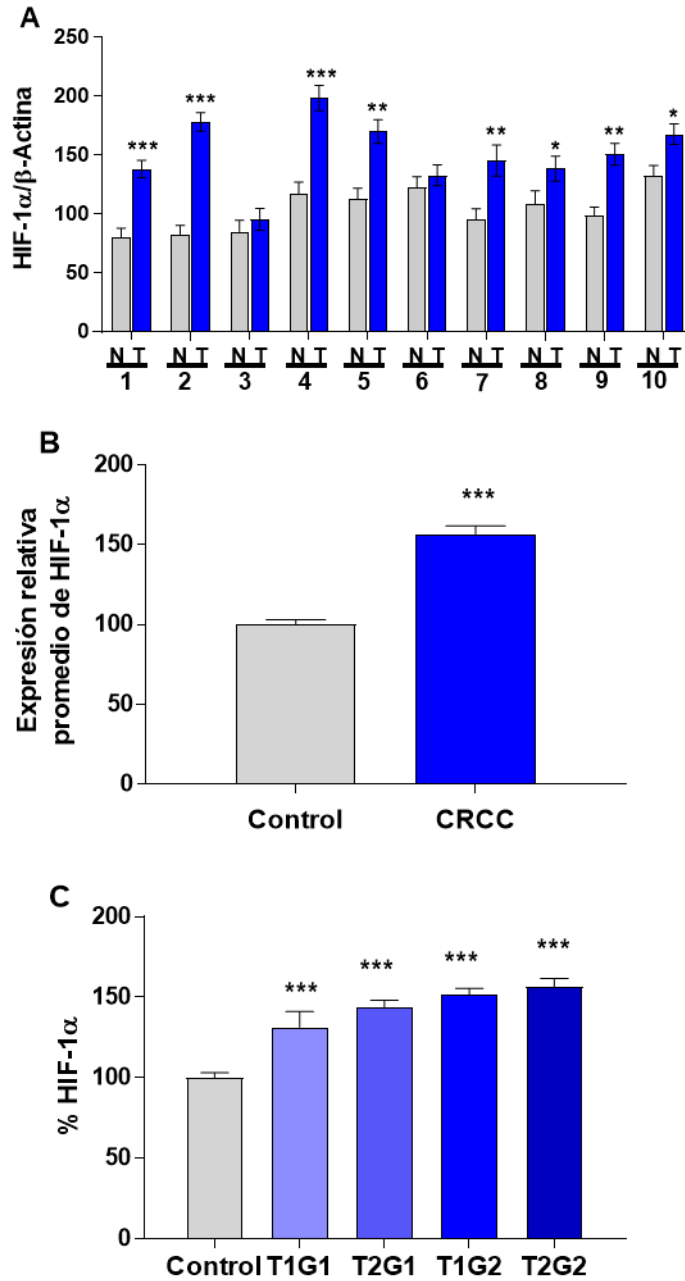


Figura 5.1. Expresión relativa de HIF-1α en CRCC. (A) Western Blot de HIF-1α. Se ilustran diez muestras representativas de tejido renal adyacente control (N) y de CRCC (T). Los datos se normalizaron respecto a la expresión de β-actina utilizada como control de carga y sembrando en todos los casos 50 μg de proteínas. **(B)** Cuantificación relativa promedio de la relación HIF-1α/β-actina en muestras de CRCC y sus respectivos controles distales (n = 24). **(C)** Porcentaje de incremento de la expresión de HIF-1α relacionado con el estadio patológico y el grado nuclear de las muestras tumorales comparadas con los tejidos adyacentes controles. Las muestras y los ensayos de Western blot se analizaron por triplicado. Los valores son expresados como la media ± SEM. * p < 0,05, ** p < 0,01 y *** p < 0,001.

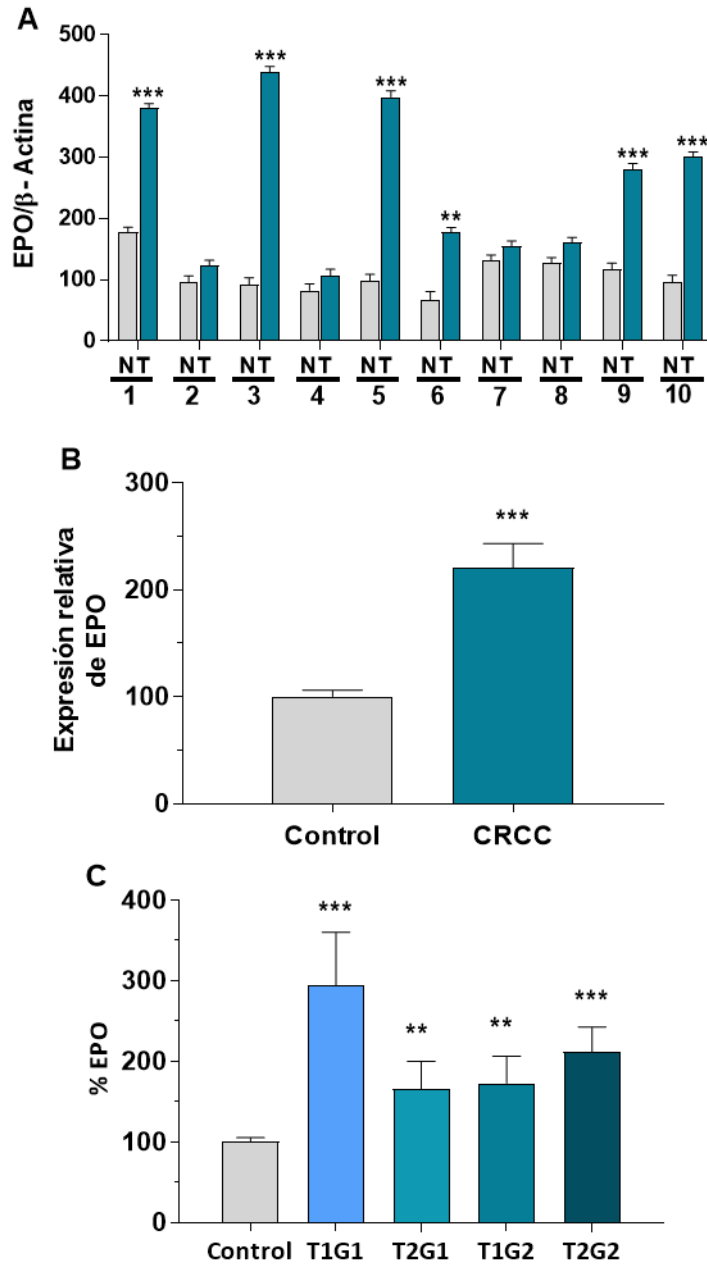


Figura 5.2. Expresión de EPO en CRCC. (A) Western Blot de EPO en CRCC. EPO (39 kDa) se sobreexpresó en la mayoría de los homogeneizados de CRCC (T) en comparación con las muestras renales distales controles (N) del mismo paciente. Diez pacientes fueron seleccionados para la ilustración. (B) Cuantificación relativa promedio de la relación EPO/ β -actina en muestras de CRCC y sus respectivos controles distales (n = 24). (C) Porcentaje de incremento de la expresión de EPO relacionada con la etapa patológica y el grado nuclear de las muestras de tumores en comparación con las secciones de tejidos distales controles. Los datos se normalizaron respecto a la expresión de la β -actina utilizada como control de carga y sembrando en todos los casos 50 μ g de proteínas. Las muestras y los ensayos se analizaron por triplicado. Los valores son expresados como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ indica diferencias significativas.

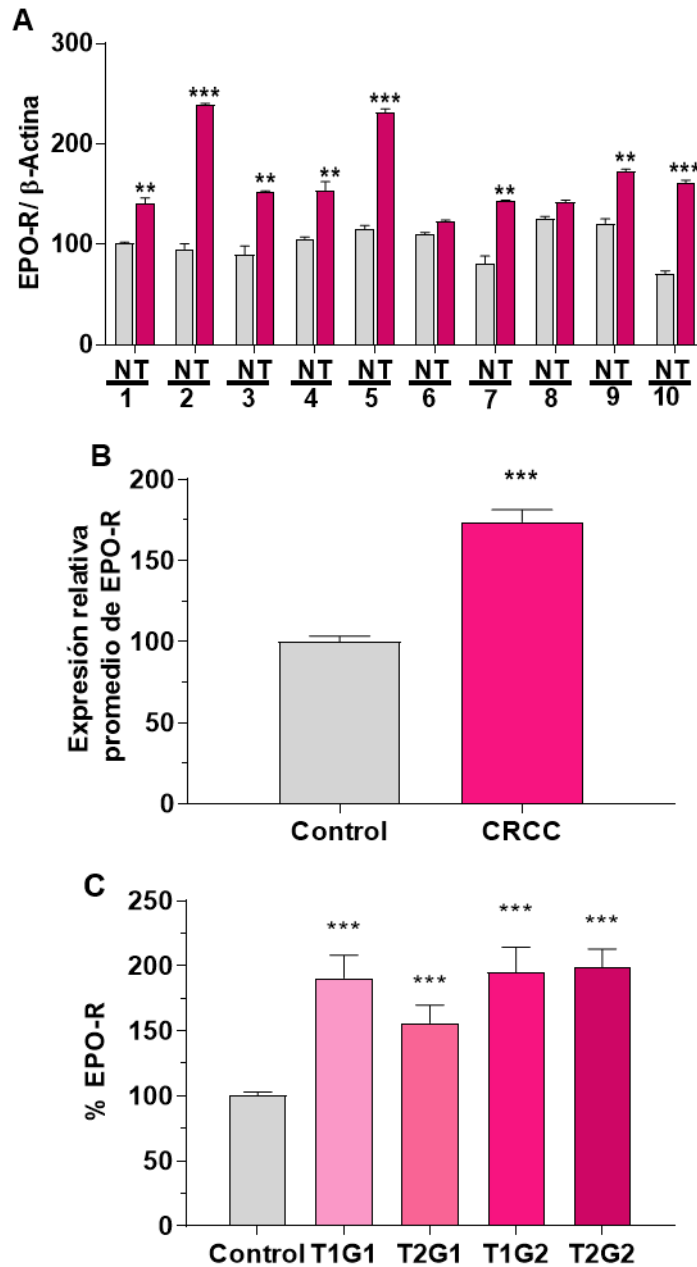
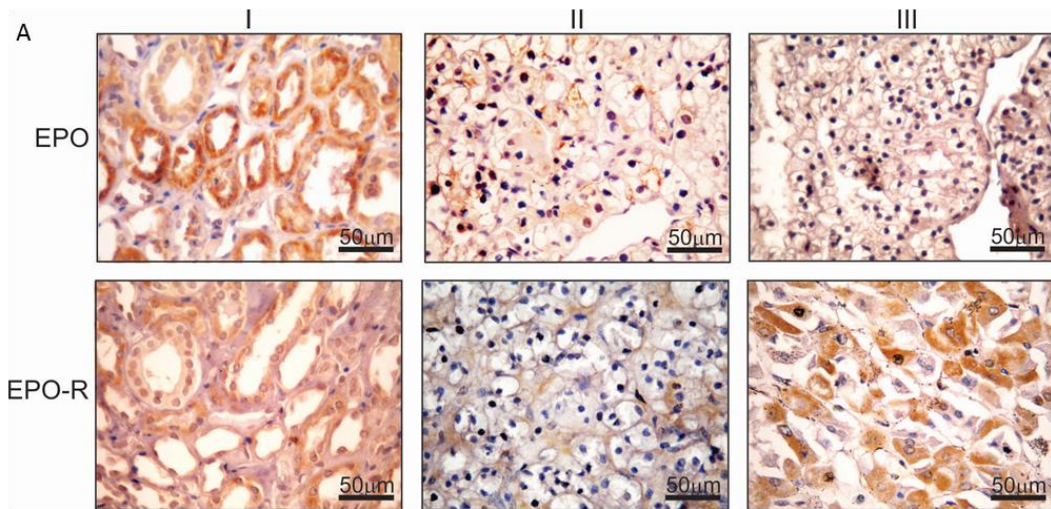


Figura 5.3. Expresión de EPO-R en CRCC. (A) Western Blot de EPO-R en CRCC. EPO-R (75 kDa) se sobreexpresó en la mayoría de los homogeneizados de CRCC (T) en comparación con muestras renales distales controles (N) provenientes de los mismos pacientes. Diez pacientes fueron seleccionados para la ilustración. **(B)** Cuantificación relativa promedio de la relación EPO-R/ β -actina en muestras de CRCC y sus respectivos controles distales (n = 24). **(C)** Porcentaje de incremento de la expresión de EPO-R relacionada con la etapa patológica y el grado nuclear de las muestras de tumores en comparación con las secciones de tejidos distales controles. Los datos fueron normalizados respecto a la expresión de la β -actina utilizada como control de carga y sembrando en todos los casos 50 μ g de proteínas. Las muestras y los ensayos se analizaron por triplicado. Los valores son expresados como la media \pm SEM. ** p < 0,01 y *** p < 0,001 indica diferencias significativas.

Considerando la sobreexpresión y coexpresión de EPO y EPO-R en la mayoría de las muestras de CRCC, se procedió a determinar sus localizaciones mediante IHQ. EPO-R se detectó en el 87.5% de los casos de CRCC revelando patrones de reacción en regiones citosólicas y de membrana

celular, mientras que la inmunomarcación de EPO se distribuyó de manera más uniforme que EPO-R en dichas muestras (Figuras 5.4 A y B).



B

	0		+		++		Total
	n	%	n	%	n	%	
EPO	10	41,7	8	33,3	6	25	24
EPO-R	3	12,5	14	58,3	7	29,2	24

C

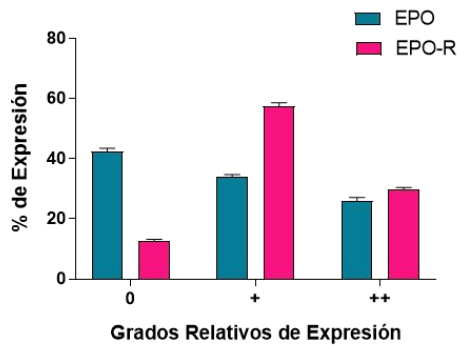


Figura 5.4. Inmunohistoquímica de EPO y EPO-R en CRCC. (A) Las inmunoreacciones de EPO y EPO-R en secciones distales controles denotan expresión constitutiva de estas proteínas en el citoplasma de las células tubulares renales (I). Inmunoreactividad débil de EPO y EPO-R con patrón membranoso en secciones de CRCC (II). Fuerte expresión inmunohistoquímica de EPO y EPO-R con patrones citoplasmáticos y membranosos respectivamente en secciones de CRCC (III). Aumento original 400x. (B-C) Evaluación semicuantitativa de la Inmunoreactividad de EPO y EPO-R en CRCC: (0) no, (+) débil y (++) fuerte expresión inmunohistoquímica de EPO y EPO-R (n = 24). Las muestras y los ensayos se analizaron por triplicado.

Teniendo en cuenta la influencia del par EPO/EPO-R en los procesos angiogénicos (Szenajch et al., 2010), posteriormente se analizaron las proteínas VEGF y su receptor VEGFR-2 en la mismas muestras trabajadas anteriormente.

La mayoría de las muestras de CRCC fueron positivas para la expresión de VEGF (83,3%; n = 24) mostrando un patrón citosólico difuso y perimembranoso mediante inmunomarcación. Sin embargo, la expresión de VEGFR-2 exhibió principalmente un patrón de inmunomarcación de tipo membranoso en la mayoría de las muestras de CRCC (Figura 5.5 A). VEGFR-2 mostró expresión en el 75% de las muestras (n = 24) de CRCC analizadas (Figura 5.5 B).

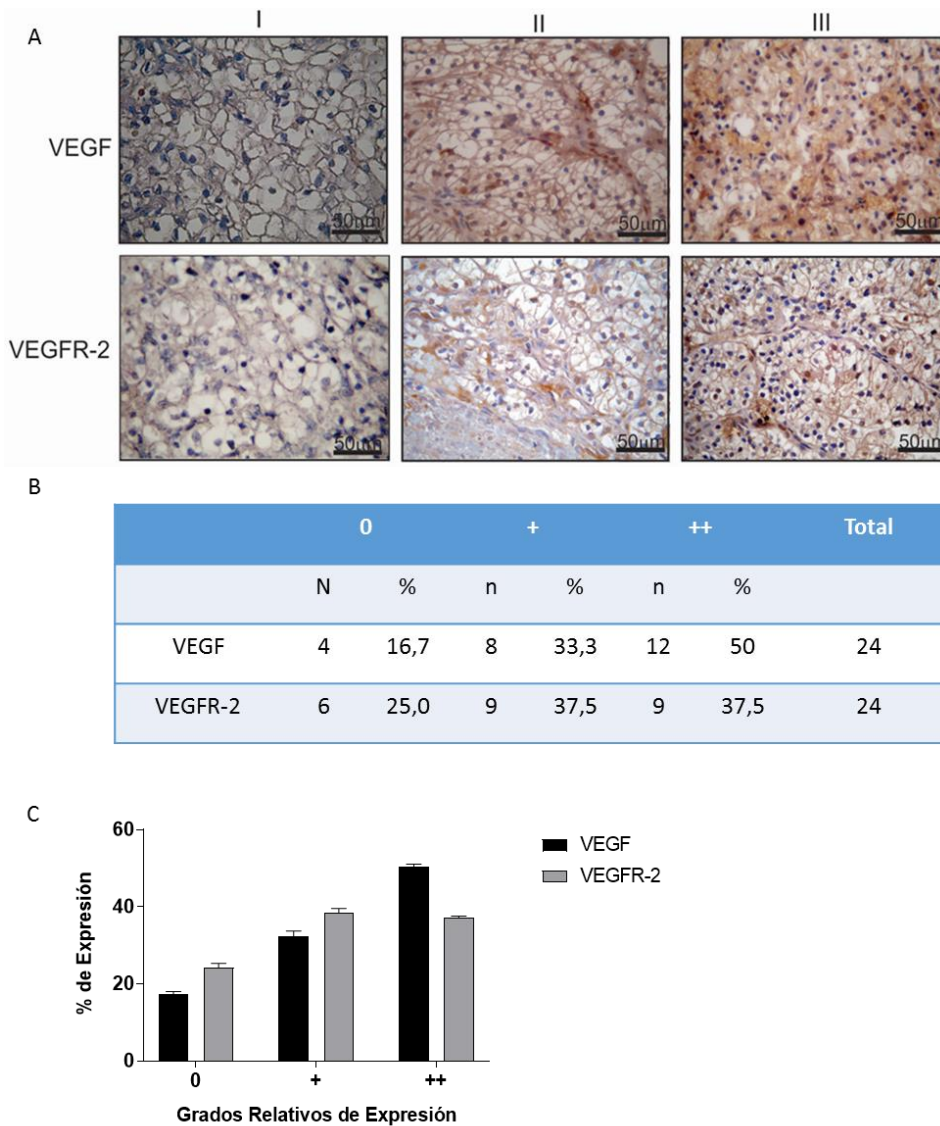


Figura 5.5. Inmunohistoquímica de VEGF y VEGFR-2 en CRCC. (A) Inmunorreacciones de VEGF y VEGFR-2 en etapas tempranas del CRCC: no (I), débil (II) y fuerte (III) inmunoreactividad. VEGF denota un patrón de expresión perimembranoso y citoplasmático difuso. La inmunodetección de VEGFR-2 fue principalmente membranosa con algunos casos de patrón citoplasmático. Aumento original 400x. **(B-C)** Evaluación semicuantitativa de la IHQ de VEGF y VEGFR-2. (0) no, (+) débil y (++) fuerte expresión en muestras de CRCC (n = 24). Las muestras y los ensayos se analizaron por triplicado.

A partir de estos resultados y teniendo en conocimiento que una de las características de las células cancerígenas es la capacidad de proliferación descontrolada, el enfoque se direccionó hacia un marcador de multiplicación celular.

La proteína Ki-67 es ampliamente utilizada en IHQ y se encuentra presente en todas las fases activas del ciclo celular, excepto en células quiescentes; por lo tanto, su marcación indica proliferación celular activa. Por tal motivo, a continuación, se procedió a determinar su expresión en las muestras estudiadas.

La inmunomarcación fue detectable en los núcleos de las células de CRCC (Figura 5.6 A). El índice proliferativo (índice Ki-67) fue significativamente mayor en CRCC ($18,3 \pm 10,2\%$) al compararlas con muestras controles de tejido renal distal ($6,9 \pm 2,1\%$) ($p = 0,0022$) (Figura 5.6 B). El índice porcentual de proliferación celular Ki-67 se vio incrementado en los diferentes estadios patológicos de las muestras tumorales respecto al control de tejido renal distal (Figura 5.6 C).

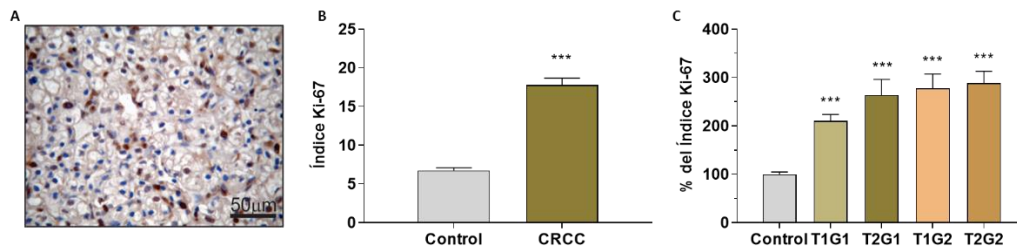


Figura 5.6. Detección de Ki-67 en CRCC. (A) La inmunomarcación de Ki-67 se localizó como granularidad pardusca fuerte y homogénea en los núcleos de CRCC. Aumento original 400x. **(B)** Índice de proliferación (antígeno Ki-67) en muestras de CRCC (n = 24) en comparación con las muestras de tejido renal adyacente controles. **(C)** Porcentaje de incremento del índice Ki-67 en CRCC en sus diferentes estadios patológicos y grados nucleares comparados con los tejidos renales distales controles. Los valores son expresados como la media \pm SEM. *** $p < 0,001$ indica diferencias significativas.

5.2. Expresión de SCD-1 en el microambiente hipóxico del CRCC

Una de las grandes características del CRCC, tanto a nivel macroscópico como microscópico, es su fenotipo con elevado contenido en lípidos. Trabajos previos enfocados en el entendimiento de las vías metabólicas implicadas en la acumulación de estas biomoléculas, apuntan a una enzima clave en la desaturación de ácidos grasos: SCD-1 (Peck & Schulze, 2016).

En el contexto hipóxico del microambiente tumoral, y habiendo constatado la sobreexpresión de HIF-1 α como de los ejes EPO/EPO-R y VEGF/VEGFR-2, en relación a la proliferación celular, el estudio se enfocó posteriormente en el rol de esta enzima específica, cuyos niveles están regulados por el factor de transcripción HIF-1 α (Santos & Schulze, 2012; Valli et al., 2014; Yin et al., 2021).

Así, a continuación, se determinó el nivel de expresión de SCD-1, considerando que deberían existir alteraciones en los niveles de ácidos grasos característicos del fenotipo del CRCC.

La Figura 5.7 muestra la sobreexpresión del ARNm de *SCD-1* en CRCC mediante PCR convencional (A) y RT-qPCR (B), observando un incremento de más de 2,5 veces en las secciones tumorales comparadas con muestras distales controles. Este incremento, también se verificó a nivel traduccional mediante Western Blot (Figura 5.7 C).

El porcentaje promedio de sobreexpresión de SCD-1 fue aproximadamente 60% en CRCC (Figura 5.7 D). Además, el incremento en la expresión de esta enzima mostró estar relacionado con los estadios patológicos y el grado nuclear de los tumores, verificando un aumento significativo en dichos estadios respecto a las secciones distales controles (Figura 5.7 E.) La evaluación de la localización de dicha proteína por IHQ, reveló una expresión constitutiva débil en células tubulares renales con un patrón de distribución homogéneo (Figura 5.7 F I). No se observó inmunoreactividad de SCD-1 a nivel de glomérulos renales, sin embargo, esta enzima exhibió una fuerte inmunoreacción focal en el citoplasma de células correspondientes a CRCC (Figura 5.7 F II).

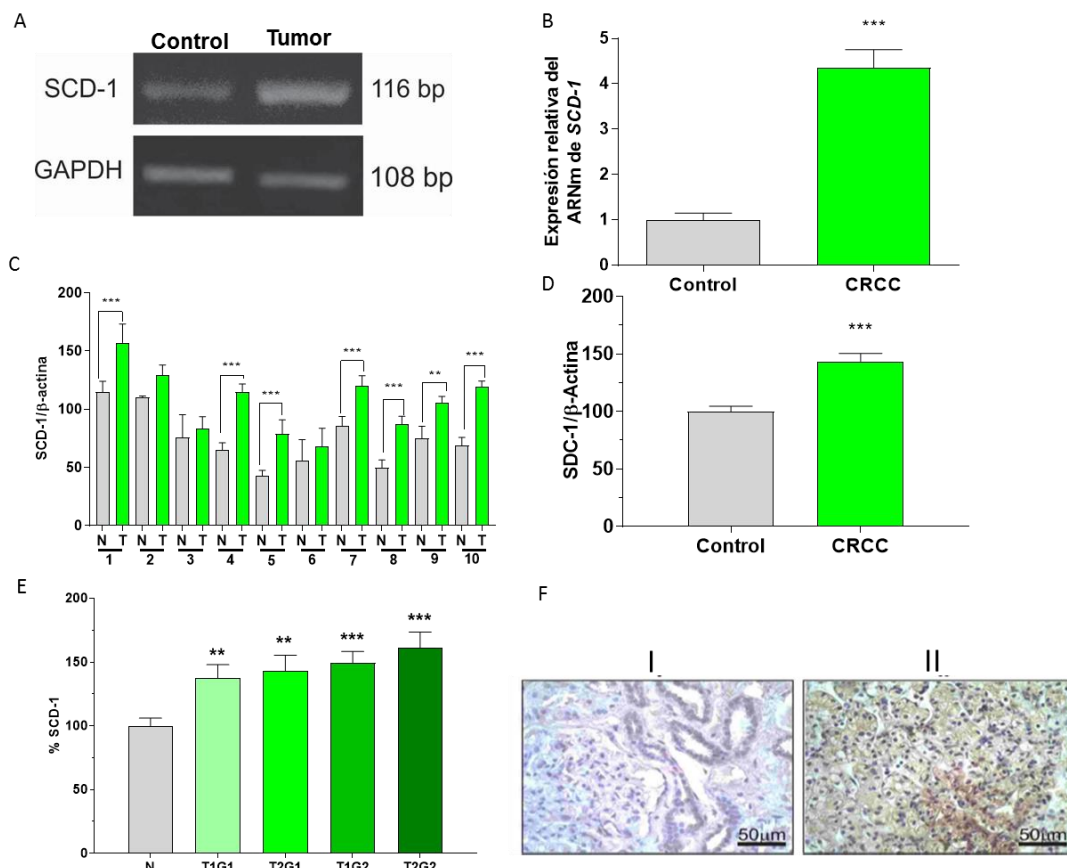


Figura 5.7. Expresión de SCD-1 en CRCC. (A-B) Niveles de expresión del ARNm de *SCD-1* determinado por PCR convencional y RT-qPCR de una muestra representativa. Las columnas indican niveles de expresión de las bandas de todas las muestras tumorales y controles distales (n = 24). **(C)** Western Blot de SCD-1 de 10 muestras representativas. La enzima se expresa constitutivamente de manera basal en las muestras de tejido distal, mientras que en CRCC se sobreexpresó en más del 75% de los casos analizados. Los resultados fueron normalizados respecto a la β -actina utilizada como control de carga y sembrando en todos los casos 50 μ g de proteínas. **(D)** Cuantificación de la relación SCD-1/ β -actina en muestras de CRCC y sus respectivos controles distales (n = 24). **(E)** Porcentaje de incremento de la expresión de SCD-1 en relación con la etapa patológica y el grado nuclear de las muestras de tumores en comparación con las muestras distales controles. **(F)** IHQ de SCD-1. Fotografías representativas correspondientes al tejido renal distal control (I) y al CRCC (II) provenientes de un mismo paciente. Aumento original 400x. Todos los valores son expresados como las medias \pm SEM. * p < 0,05, ** p < 0,01, y *** p < 0,001 indican diferencias significativas. Las muestras y los ensayos fueron analizados por triplicado.

En conjunto, todas las determinaciones antes mostradas, hacen suponer que el CRCC presenta un microambiente tumoral hipóxico, angiogénico y proliferativo. En este contexto se evaluaron los niveles de expresión porcentual de la proteína SCD-1 en las muestras controles y muestras de CRCC en los cuatro estadios patológicos analizados en función de la expresión porcentual de las proteínas HIF-1 α y Ki-67 observadas en cada grupo. Se determinó una correlación positiva entre SCD-1 y HIF-1 α ($r^2 = 0,9738$; p = 0,0018) y entre Ki-67 y SCD-1 ($r^2 = 0,9747$; p = 0,0042) como se muestra en la Figura 5.8 A y B respectivamente.

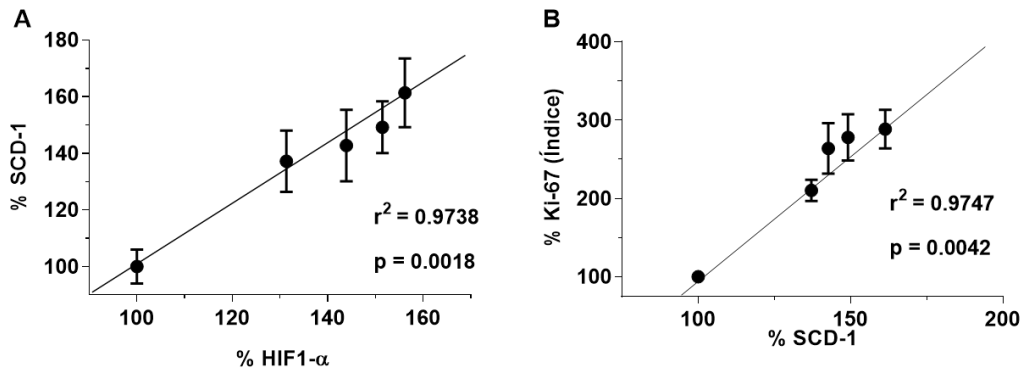


Figura 5.8. Análisis de correlación de la expresión de SCD-1 y el microambiente hipóxico proliferativo en CRCC. (A) Correlación entre el porcentaje de incremento de SCD-1 y el porcentaje de incremento de HIF-1 α en cada grupo experimental (muestra control y los cuatro estadios patológicos analizados). **(B)** Correlación entre el porcentaje de incremento del índice Ki-67 y el porcentaje de incremento de SCD-1 en cada grupo experimental (muestra control y los cuatro estadios patológicos analizados). Todos los valores son expresados como las medias \pm SEM.

CAPITULO 5

RESULTADOS

SECCIÓN 2

*Estudio del Microambiente Hipóxico y del
Metabolismo Lipídico del Carcinoma Renal de
Células Claras (CRCC)*

5.1. Perfil lipidómico del CRCC

Habiendo comprobado, por un lado, que los niveles bajos de oxígeno en el CRCC, determinan la sobreexpresión de HIF-1 α y de otras biomoléculas dependientes de este factor, y considerando que las áreas centrales de los tumores sólidos presentan mayor nivel de hipoxia que el tejido tumoral periférico (Jiang et al., 2011), conjuntamente con el hallazgo de una correlación lineal directa entre la expresión de SCD-1 y la tasa proliferativa en los microambientes hipóxicos tumorales de CRCC, se decidió investigar la implicancia de la sobreexpresión de SCD-1 sobre el perfil de lípidos en las diferentes fracciones de las muestras tumorales en comparación con sus respectivos controles.

Así, en este estudio se tomaron muestras de la región central (core) del CRCC y de las áreas periféricas del mismo siguiendo el criterio de Deniz et al., (Deniz et al., 2015). Se consideraron muestras representativas de la zona central del tumor a las secciones con células claras típicas de CRCC, mientras que las zonas adyacentes infiltradas o fibrosas se consideraron como periferia tumoral.

En primera instancia se llevó a cabo la tinción de Red oil sobre cultivos primarios, obtenidos de muestras tumorales de CRCC contra células de tejido renal distal (control) para observar la distribución de lípidos acumulados mediante microscopía óptica. En dicho caso se observó mayor tinción con Red oil en la porción tumoral.

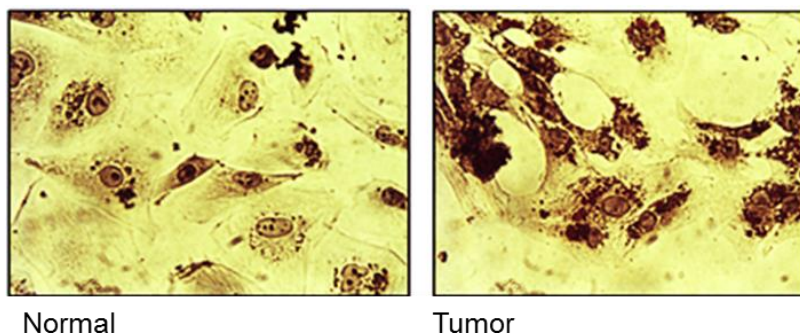


Figura 5.9. Tinción Red oil en muestras de CRCC. Fotografía representativa de 10 muestras renales distales controles y 10 muestras de CRCC. Aumento original 400x.

Visto de esta manera que las regiones tumorales presentaban mayor contenido lipídico respecto a sus correspondientes secciones controles distales, se decidió profundizar el estudio de estas biomoléculas. Así, posteriormente se determinó el perfil lipidómico total de estas muestras (tumores y controles), con el objeto de evaluar si los aumentos observados en la expresión de la enzima SCD-1 tendrían implicancia en el fenotipo tumoral.

Para tal fin, se realizó transmetilación total del contenido lipídico y análisis por GC/MS. En este caso, la sección tumoral fue dividida tal como se explicó previamente en una fracción central o core del tumor y en una fracción periférica.

Los resultados demostraron diferencias significativas en las concentraciones principalmente del ácido oleico (18:1n-9) y el ácido araquidónico (20:4n-6) (Figura 5.10).

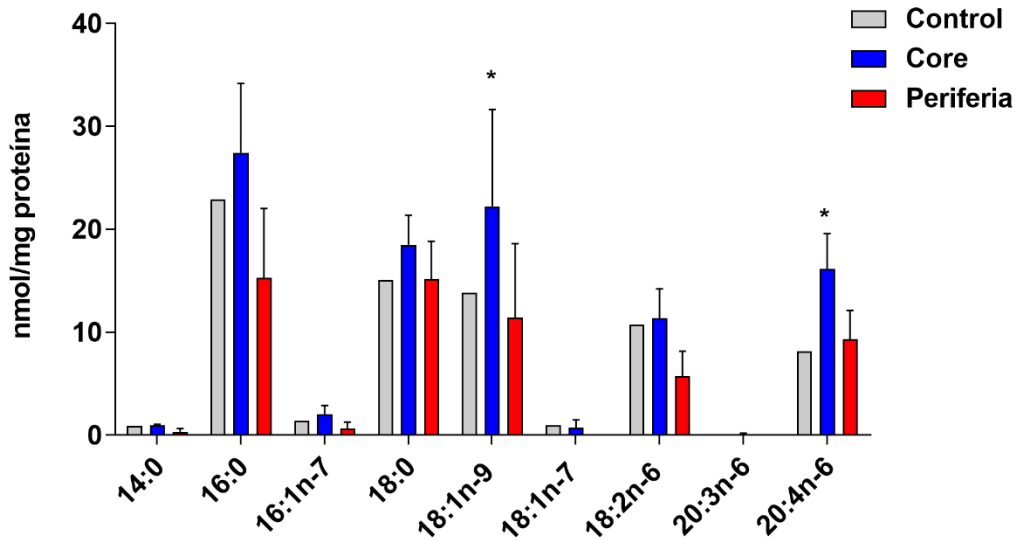


Figura 5.10. Perfil total de ácidos grasos obtenidos por GC/MS previa transmetilación total. En los ensayos lipídicos se tomaron muestras por triplicado, de cada tumor y sección distal normal. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el software GraphPad Prism 7 - Análisis Two-way ANOVA, múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM (n = 12). * p < 0,05.

No obstante, para comprobar la procedencia de dichos ácidos grasos determinados previamente, se procedió a separar cada muestra en 3 especies lipídicas: PLs, TAG y CE. Ambas secciones tumorales y la sección distal (considerada como control) fueron analizadas mediante GC/MS. Los resultados demostraron variaciones significativas en las tres especies lipídicas (PLs, TAG y CE) en la fracción core, mientras que a nivel de la periferia tumoral las diferencias fueron en las especies TAG y CE. El 18:1n-9 fue el principal ácido graso involucrado en estas variaciones (observado principalmente en las especies TAG y CE), el cual es producto principal de la enzima SCD-1. Por otra parte, en la especie correspondiente a PLs, se evidenció una leve diferencia significativa en el 18:1n-9 y un marcado aumento del 20:4n-6 (Figura 5.11).

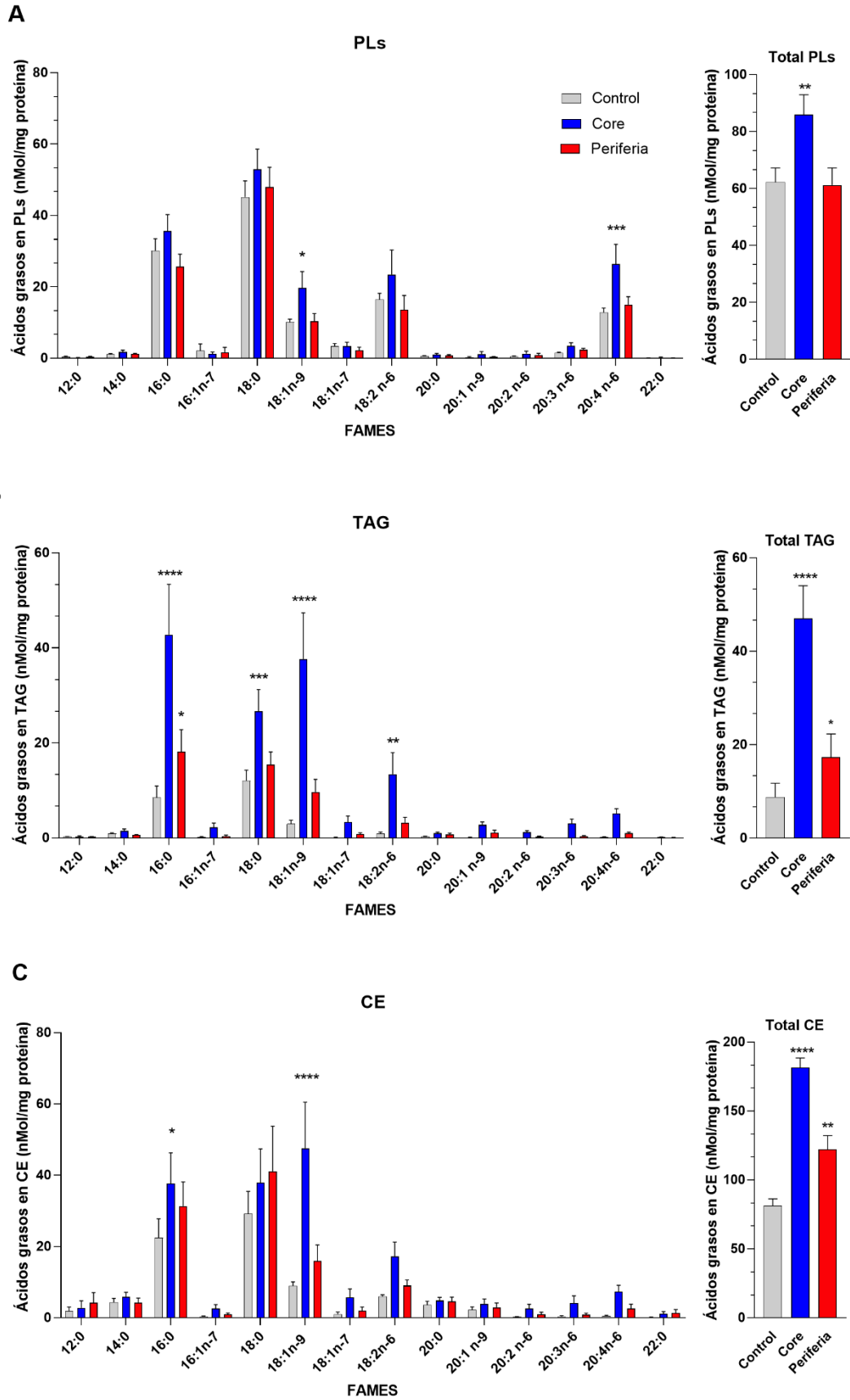


Figura 5.11. Perfil lipídico del CRCC. (A) Perfil de los principales ácidos grasos en la especie de fosfolípidos en tejidos renales distales controles (columnas grises) como tumorales (core y periferia; azul y rojo respectivamente), determinados por GC/MS. (B-C) Perfil de ácidos grasos presentes en lípidos neutros (TAG y CE). Las muestras y los ensayos lipídicos se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis Two-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM (n = 12). * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

5.1.1. Rol del ácido oleico en la proliferación celular en CRCC

Así, una vez caracterizado el perfil lipídico de los tumores y muestras controles de pacientes, considerando las limitaciones experimentales que poseen los cultivos primarios (microheterogeneidad, ciclos celulares disimiles, inestabilidad genética, etc.), se diseñaron experimentos *in vitro* con el propósito de evaluar la funcionalidad de SCD-1 en dos líneas celulares validadas de CRCC denominadas CAKI-1 y CAKI-2.

En primera instancia se determinó el perfil lipídico de ambas líneas celulares por GC/MS previa transmetilación total. Se obtuvieron resultados similares a los observados en los tumores. La Figura 5.12 muestra que los ácidos grasos más abundantes en estas líneas celulares también fueron 16:0, 18:0, 20:4n-6 y principalmente 18:1n-9. Obsérvese que ambas líneas celulares muestran una distribución muy similar en sus perfiles de ácidos grasos.

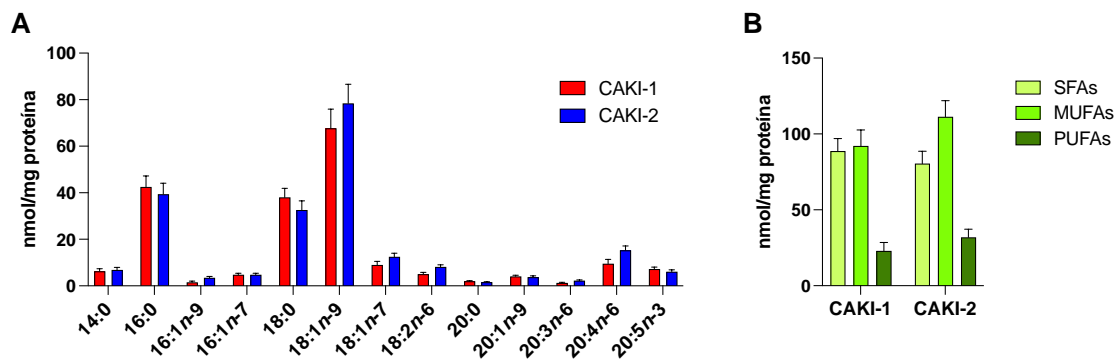


Figura 5.12. Perfil lipídico de ácidos grasos de las líneas celulares CAKI-1 y CAKI-2. (A) Transmetilación total de ácidos grasos presentes en todas las especies lipídicas existentes en las líneas celulares CAKI-1 y CAKI-2. Se puede observar que la especie mayoritaria es el 18:1n-9. (B) Distribución de SFAs, MUFAs y PUFAs en ambas líneas celulares. Los datos se expresan como las medias \pm SEM y son representativos de tres experimentos independientes.

Si bien ambas líneas celulares son consideradas un óptimo modelo de CRCC, teniendo en cuenta que CAKI-2 se estableció a partir de un carcinoma renal primario de células claras y CAKI-1 deriva de una metástasis de piel, en consecuencia, para ajustar aún más el modelo, se seleccionó la línea celular CAKI-2 para los experimentos *in vitro* subsiguientes.

Como evidencia adicional del rol de SCD-1 en la generación de MUFAs, se realizó la inhibición farmacológica de la enzima en la línea celular CAKI-2 utilizando el inhibidor farmacológico CAY 10566 ABCAM® en concentraciones no citotóxicas. Como muestra la Figura 5.13, notables cambios lipidómicos se obtuvieron en los niveles de 18:0 y 18:1n-9 (** $p < 0,01$). Este perfil se obtuvo por transmetilación total considerando todas las especies de lípidos simultáneamente. Claramente se observa como la falta de catálisis en la desaturación produce acumulación de 18:0 en las células tratadas con CAY 10566 y por el contrario disminución de los niveles de 18:1n-9.

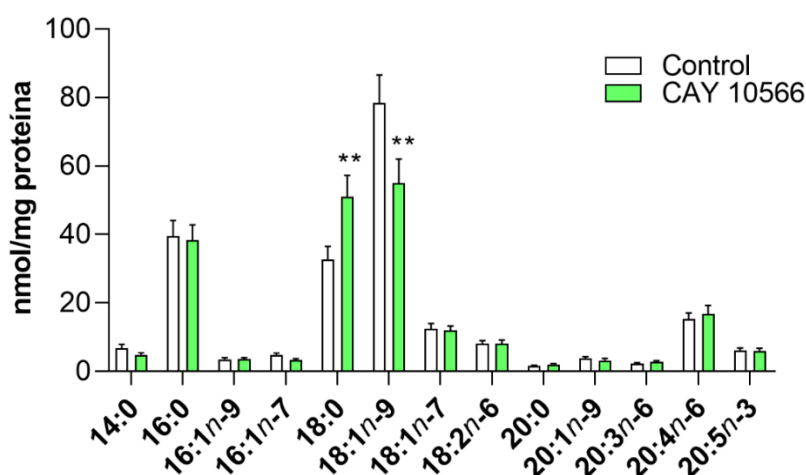


Figura 5.13. Lipidómica de la inhibición de SCD-1 en células CAKI-2. El tratamiento de las células CAKI-2 con el inhibidor enzimático CAY 10566 (3 μ M) durante 24 horas causó una disminución drástica en los niveles celulares de 18:1n-9 con el consiguiente aumento en los niveles de 18:0. Los cultivos y los ensayos lipidómicos se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de Two-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$.

En línea con lo demostrado por otros autores con diferentes metodologías (Qin et al., 2020), se observó que los tiempos de exposición prolongados (más de 24 horas) al inhibidor de la enzima (3 μ M) indujo disminuciones drásticas en la viabilidad celular ($34,65\% \pm 2,97$; $p < 0,001$) (Figura 5.14 B).

Si el 18:1n-9 es un factor relevante, involucrado en el desarrollo y proliferación celular, y la reducción de dicho ácido graso desempeña un papel clave al desencadenar la apoptosis, su adición a los cultivos celulares debería restaurar, al menos en parte, la proliferación celular en células con SCD-1 farmacológicamente inhibida. Para verificar esta hipótesis, los cultivos celulares de CAKI-2 con y sin inhibidor CAY 10566 (3 μ M), fueron tratados con 18:1n-9 (50 μ M), en diferentes tiempos (Figura 5.14). No se observaron modificaciones en la viabilidad celular en los cultivos sometidos a una restauración inmediata del 18:1n-9 (a las 0 y 2 horas de la adición del CAY 10566).

Sin embargo, la adición de 18:1n-9 posterior a las 2 horas no logró restaurar la viabilidad inicial, al contrario, se verificó un descenso en el porcentaje de células viables respecto al control. Por otro lado, los cambios de viabilidad celular hasta las 18 horas no sufrieron el mismo descenso respecto a los cultivos tratados únicamente con el inhibidor CAY 10566.

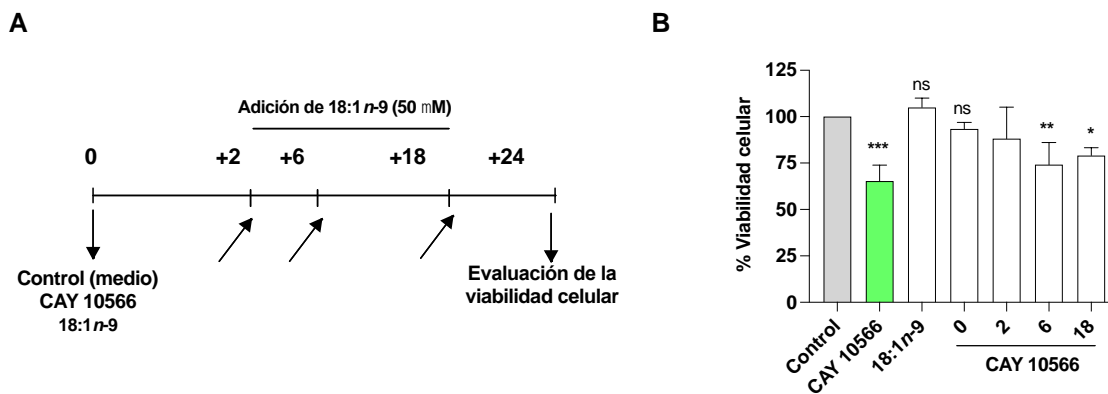


Figura 5.14. Inhibición de SCD-1 y rol del ácido oleico en células CAKI-2. (A) Diseño experimental utilizado en la inhibición de SCD-1. Las flechas inclinadas indican la adición de 18:1n-9 en diferentes tiempos. **(B)** La viabilidad celular se midió con el kit CellTiter 96®. En todos los casos, las células se cultivaron con suero bovino fetal al 1%. Los datos se expresan como la media \pm SEM, y son representativos de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, significativamente diferentes del control. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de One-way ANOVA, Múltiples comparaciones.

Además de la evaluación de la viabilidad/proliferación celular con XTT, el enfoque analítico fue dirigido a determinar si la inhibición de la enzima SCD-1 con CAY 10566 induciría apoptosis en CRCC; para esto las células CAKI-2 fueron marcadas con anexina V - FITC e yoduro de propidio como se detalla en la sección materiales y métodos. La Figura 5.15 muestra que las células tratadas con CAY 10566 manifestaron un ligero aumento en la tasa de muerte celular apoptótica, la cual era completamente prevenible si se encontraba presente el 18:1n-9 en los medios de incubación. En conjunto, estos datos sugieren que la disminución de la viabilidad que las células experimentaron cuando SCD-1 fue inhibida por CAY 10566 (Figura 5.14 B) se debió más bien a una reducción en la tasa de proliferación que a una muerte celular apoptótica inducida por fármacos.

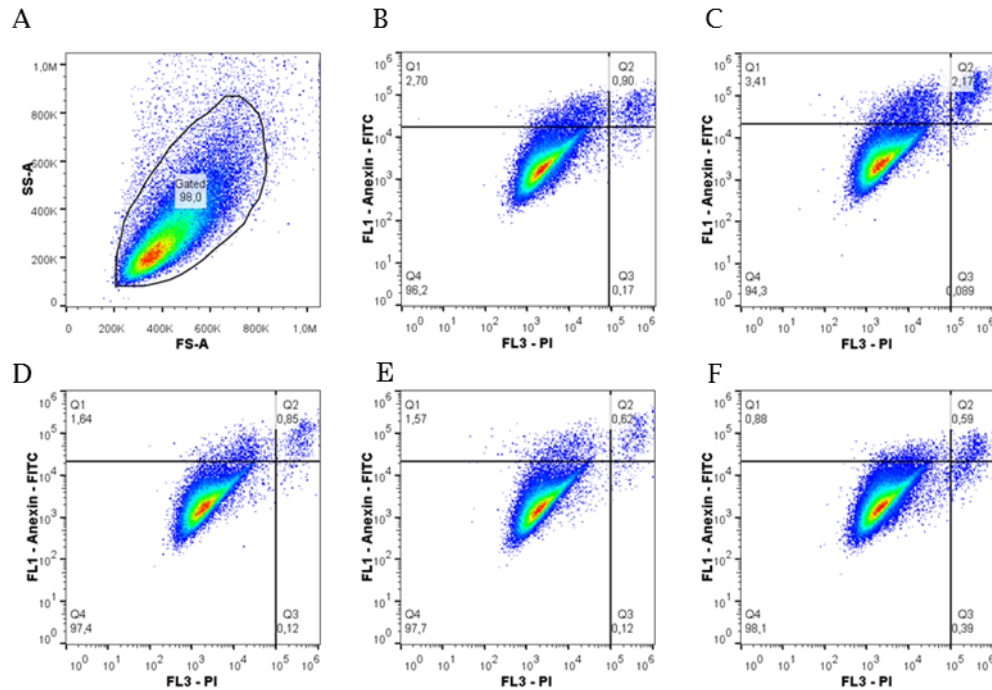


Figura 5.15. Análisis por citometría de flujo de marcadores apoptóticos en células CAKI-2 expuestas al inhibidor de SCD-1 y 18:1n-9. Se detectaron cambios apoptóticos en las membranas plasmáticas mediante marcación simultánea con Anexina V - FITC (FL1) y PI (FL3). **(A)** Estrategia de selección en células controles y tratadas. **(B)** Células no tratadas (controles). **(C)** Células tratadas con CAY 10566 3 μM . **(D-F)** Posterior al tratamiento de inhibición, se añadió 18:1n-9 (50 μM) a las células CAKI-2 a las 2, 6 y 18 horas respectivamente. En todos los casos la adición de 18:1n-9 disminuyó la muerte celular a niveles cercanos a los hallados en las células controles.

5.1.2. Expresión de la enzima SCD-1 en un modelo *in vitro* de hipoxia química inducida

Sabiendo que existe inducción enzimática vinculada al microambiente tumoral (Bao & Wong, 2021; Ifeanyi, 2014; Yang et al., 2014), y visto mediante el análisis de tumores renales una correlación directa en la expresión de SCD-1 y HIF-1 α (Figura 5.8 A), se planteó que dicha expresión enzimática podría deberse en parte al microambiente hipóxico tumoral. Por lo tanto, para demostrar si esta condición (celular y de su entorno) es realmente responsable o al menos en parte, de la inducción de SCD-1, las células CAKI-2 fueron tratadas con diferentes concentraciones de CoCl_2 durante 24 horas, para lograr generar hipoxia química *in vitro* (Jin et al., 2015; Wu & Yotnda, 2011).

En primera instancia, se evaluó la viabilidad celular frente a distintas concentraciones de CoCl_2 mediante ensayo de XTT; además se determinó la tasa de proliferación celular (tiempo de duplicación) en condiciones normales e hipóxicas y la constante de crecimiento (k). No se observaron cambios significativos en el porcentaje de viabilidad de las células CAKI-2 expuestas por 24 horas a concentraciones de 100 μM , 200 μM y 300 μM de CoCl_2 , sin embargo,

concentraciones iguales a 400 μM mostraron un descenso significativo del porcentaje de viabilidad (Figura 5.16). Por otra parte, tampoco se observaron variaciones significativas en los tiempos de duplicación celular y en la constante de crecimiento (k) (tabla 5.2), es decir, la adición de diferentes concentraciones de CoCl_2 (100 - 300 μM) no modificó la tasa de proliferación celular.

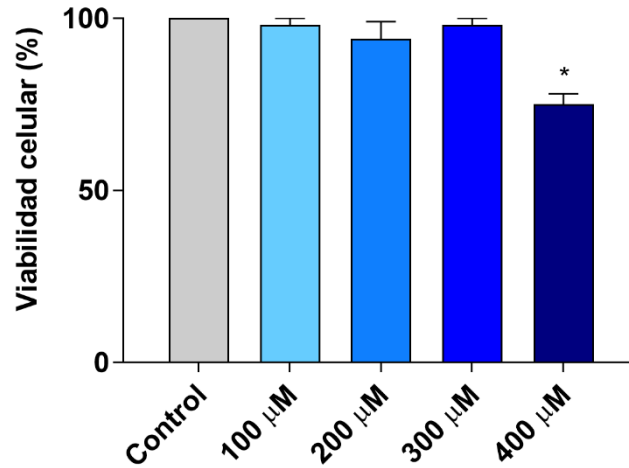


Figura 5.16. Ensayo de viabilidad de células CAKI-2 expuestas a CoCl_2 por 24 horas (rango de concentración: 0 - 400 μM). Se observó citotoxicidad celular cuando las células se expusieron a 400 μM de CoCl_2 . Los cultivos celulares y los ensayos de viabilidad celular se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de One-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$.

Tabla 5.2. Tasas de proliferación celular

	Control	100 μM	200 μM	300 μM
k	0,028	0,023	0,021	0,025
Tiempo de duplicación (h)	24,69	29,57	32,89	26,91

Constantes de crecimiento (k) y tiempo de duplicación celular para la línea celular CAKI-2, en condiciones normales e hipóxicas. Los datos se expresan como medias \pm SEM y son representativos de tres experimentos independientes.

A partir de los resultados anteriores y para confirmar que dicho diseño realmente establece un modelo de microambiente hipóxico, se midió por RT-qPCR la expresión relativa del ARNm de *HIF-1A* y *HIF-2A* en las células CAKI-2 expuestas a concentraciones de CoCl_2 no citotóxicas (0 - 300 μM). Los resultados demostraron una relación directamente proporcional entre la expresión de los HIFs y las concentraciones de CoCl_2 , con una expresión principalmente marcada en *HIF-1A* (Figura 5.17).

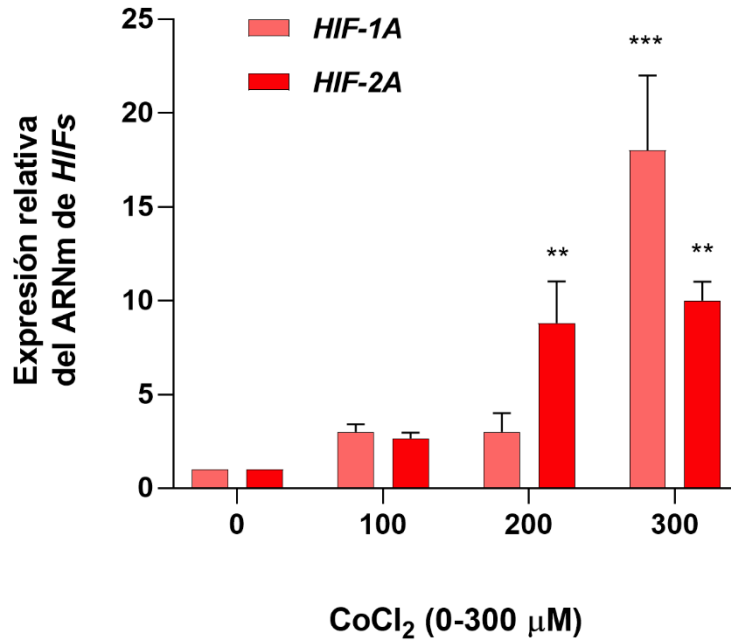


Figura 5.17. RT-qPCR de *HIF-1A* y *HIF-2A* en células CAKI-2 expuestas a concentraciones no citotóxicas de CoCl_2 . Los cultivos celulares de CAKI-2 y los ensayos de biología molecular se estudiaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de One-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Visto hasta allí que la adición de ciertas concentraciones de CoCl_2 a los cultivos celulares de CAKI-2 simulaba un microambiente hipóxico tumoral, se evaluó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente mediante metodología de biología molecular el ARNm de la enzima *SCD-1*. Los resultados demostraron, que la exposición a 300 μM de CoCl_2 por 24 horas, indujo una sobreexpresión de aproximadamente 200 veces respecto a las células controles no tratadas (Figura 5.18)

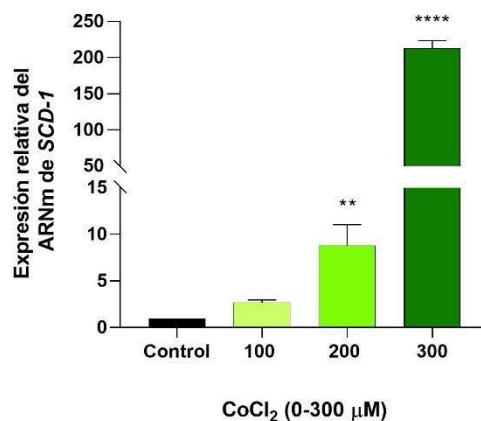


Figura 5.18. Sobreexpresión de *SCD-1* inducida por el microambiente hipóxico tumoral. RT-qPCR de *SCD-1* en células CAKI-2 expuestas por 24 horas a diferentes concentraciones de CoCl_2 . Los cultivos y los ensayos moleculares se estudiaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el software GraphPad Prism 7 - Análisis One-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Por lo cual, si el microambiente hipóxico tumoral generó una sobreexpresión de la enzima SCD-1, en dichas condiciones se esperaría hallar cambios en los perfiles lipidómicos con aumento de 18:1n-9, producto principal de SCD-1. En base a ello, a continuación, mediante GC/MS, se determinó el perfil lipidómico de las células CAKI-2 expuestas a concentraciones no citotóxicas de CoCl_2 para establecer la influencia del microambiente hipóxico en la actividad de la enzima desaturasa en estudio.

Se observó que los ácidos grasos saturados particularmente 16:0 y 18:0 experimentaron una reducción significativa ($p < 0,001$) en todos los tratamientos en la fracción correspondiente a PLs (Figura 5.19 A). Mientras que en las especies de TAG y CE se determinó mayor proporción de 18:1n-9 cuando se trabajó con concentraciones de 200 μM y principalmente 300 μM de CoCl_2 respecto a las células controles.

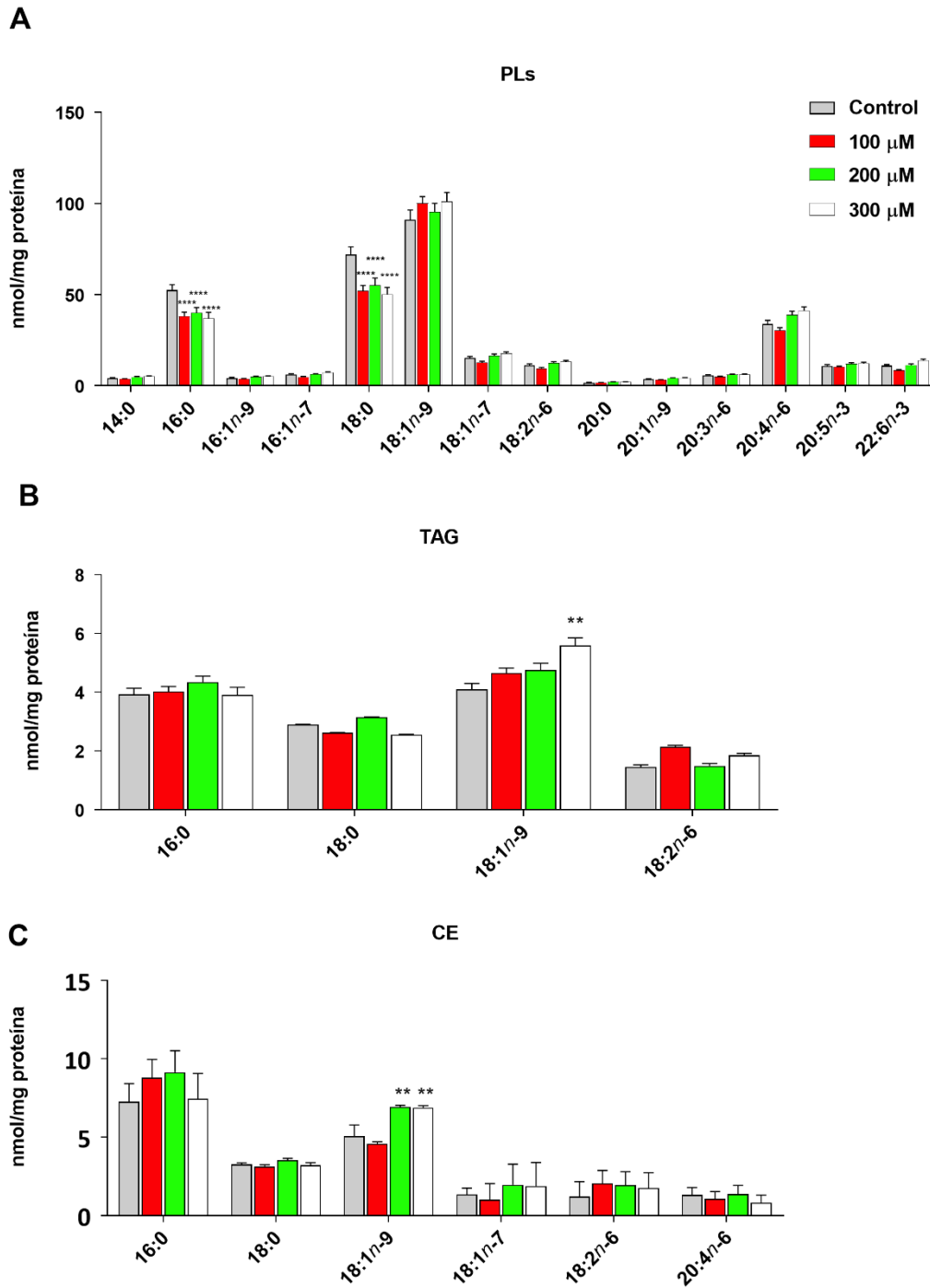


Figura 5.19. Perfil lipídico de células CAKI-2 en condiciones hipóxicas. Las células fueron tratadas con CoCl_2 en las concentraciones indicadas. Mediante GC/MS se determinaron las concentraciones de ácidos grasos en las fracciones de **(A)** fosfolípidos (PLs), **(B)** triacilglicéridos (TAG) y **(C)** ésteres de colesterol (CE). Los cultivos y los ensayos lipídicos se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el software GraphPad Prism 7 - Análisis de Two-way ANOVA, múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Posteriormente con el objetivo de evaluar modificaciones fenotípicas citoplasmáticas a nivel del almacenamiento de lípidos (en forma de LD) en esta línea celular sometida al modelo de hipoxia química, las células CAKI-2 fueron expuestas a concentraciones no citotóxicas de CoCl_2 y tratadas con el colorante Bodipy[®]. Luego mediante microscopía confocal se analizó la presencia de LD. Los resultados demostraron que a $300 \mu\text{M}$ de CoCl_2 (mayor inducción de hipoxia) hay mayor formación de LD, que actualmente se consideran verdaderas organelas de almacenamiento de lípidos neutros. No obstante, numerosos trabajos muestran que además de estar activamente involucradas en la proliferación celular, también se las asocian a procesos de estrés en estadio previos a la muerte celular (Guijas et al., 2014; Lee et al., 2013).

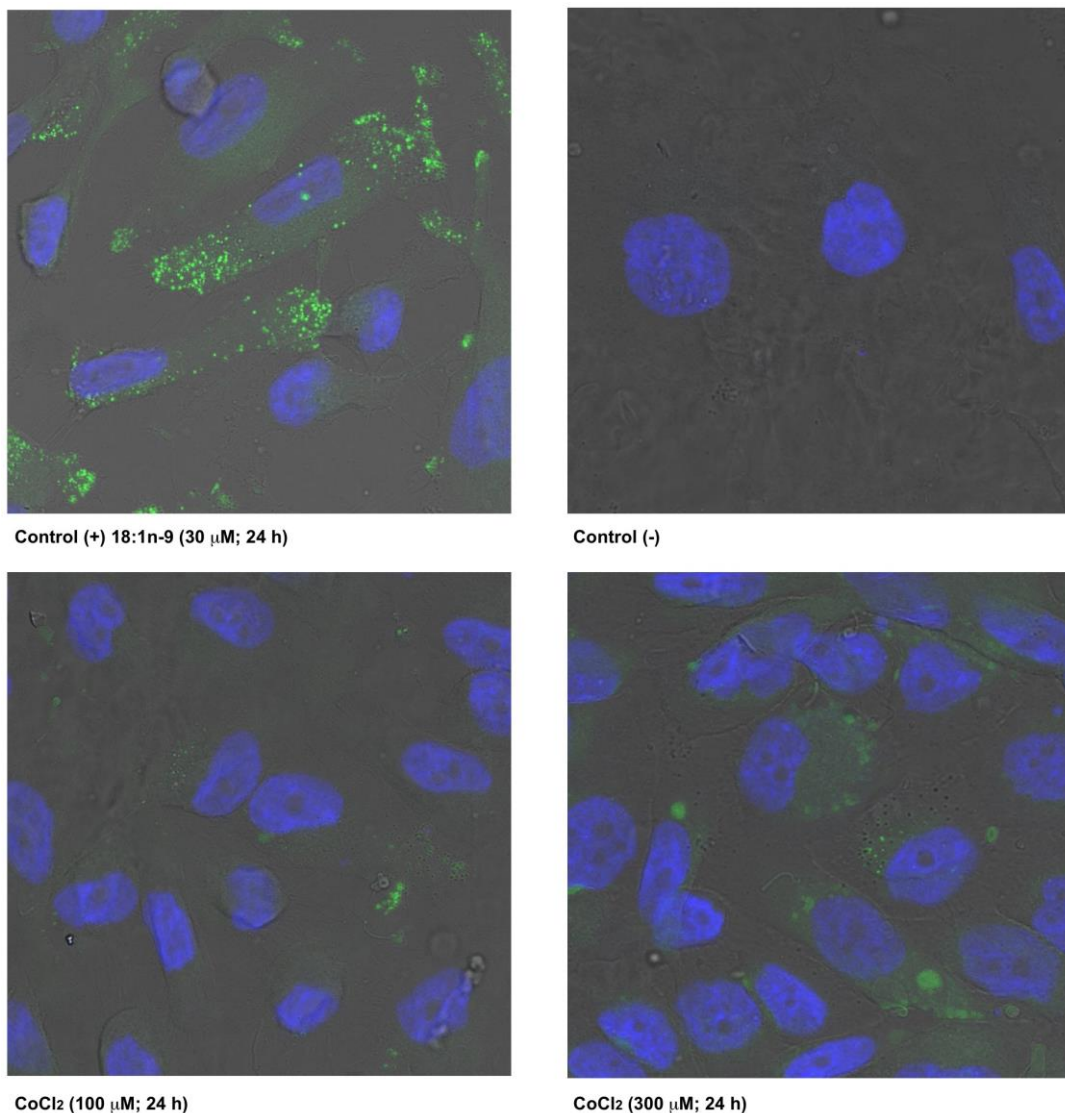


Figura 5.20. Determinación de Lipid droplets en CAKI-2 sometidas a hipoxia química. La formación de LD se evaluó mediante microscopía confocal. Las células se expusieron a 18:1n-9 ($30 \mu\text{M}$) durante 24 horas como control positivo de la formación de LD. La visualización de dichos LD se inició con la exposición celular a $100 \mu\text{M}$ de CoCl_2 y se hizo más evidente a $300 \mu\text{M}$ de CoCl_2 , durante 24 horas. Aumento original 400x.

CAPITULO 5

RESULTADOS

SECCIÓN 3

*Estudio del Microambiente Hipóxico y del
Metabolismo Lipídico del Carcinoma Renal de
Células Claras (CRCC)*

5.1. Expresión de la proteína de resistencia a múltiples fármacos de tipo 4 (MRP4/ABCC4) en el carcinoma renal de células claras (CRCC) y su rol en la regulación de la proliferación celular

Cómo se planteó en los apartados previos, una característica distintiva de este tipo de tumores es el alto contenido de lípidos que muestra su fenotipo celular. Anteriormente se demostró que la actividad enzimática tumoral de SCD-1, contribuye en gran medida a la biodisponibilidad de ácidos grasos insaturados. Desde los años 70's se conoce que particularmente los MUFAs sirven como sustratos para la producción de mediadores lipídicos que transmiten señales celulares en diferentes vías metabólicas.

La Figura 5.11 muestra que el contenido de los ácidos grasos 18:1n-9 y 20:4n-6, es significativamente más elevado en las muestras de tumores analizados en comparación con los tejidos normales. El 18:1n-9 se encuentra incrementado principalmente en las especies de TAG y CE, mientras que, por el contrario, el 20:4n-6 lo está en la especie de PLs.

El 20:4n-6 da lugar a la producción de múltiples moléculas lipídicas (eicosanoides) que juegan un rol esencial en los procesos inflamatorios y tumorales dado que es precursor de prostaglandinas y leucotrienos (DuBois, 2010; Fu et al., 2020). Una de las importantes vías de regulación de los niveles intracelulares de los eicosanoides se encuentra en el proceso de extrusión al espacio extracelular (Montani et al., 2013; Mosaad et al., 2020). Como se planteó en la introducción, múltiples transportadores de membrana participan en este proceso (ver apartado 1.6, 1.9 y tabla 1.1).

Particularmente para el caso de eicosanoides y nucleótidos cíclicos como el AMPc, un transportador de membrana denominado proteína de resistencia a múltiples fármacos de tipo 4 o abreviado MRP4 (DuBois, 2010) tiene como rol fisiológico la extrusión al espacio extracelular de dichas biomoléculas, con el fin de regular los niveles de concentración de acuerdo con las condiciones de homeostasis celular (Ver Apartado 1.9, Figura 1.6 y tabla 1.1).

Desde la caracterización inicial del AMPc, se lo ha establecido firmemente como una señal molecular versátil, involucrada tanto en la regulación del metabolismo glucídico como lipídico, así como también en los mecanismos celulares de diferenciación de adipocitos. Durante instancias de alta demanda de energía, como son los casos de procesos tumorigénicos, los TAG almacenados en LD son hidrolizados (Ravnskjaer et al., 2015). Además se sabe, que hormonas como la insulina y el glucagón, que regulan el metabolismo, se encuentran implicadas en procesos de extrusión del AMPc, modificando el balance i-AMPc/e-AMPc (Lv et al., 2017).

Adicionalmente, numerosas publicaciones que utilizan ensayos *in silico*, demostraron que en el microambiente hipóxico de otros tumores, diferentes al renal, se encuentra sobreexpresada la proteína MRP4 (Carozzo et al., 2015, 2019).

5.1.1. Estudio de MRP4 en CRCC

MRP4 es un transportador de la membrana celular, hallado en la zona apical de los túbulos contorneados proximales renales (entre otros tejidos), encargado del transporte de aniones y conocido como una bomba de eflujo para AMPc (Van Aubel et al., 2002). Mientras MRP4 extruye drogas y metabolitos desde el citoplasma celular hacia la luz tubular, la proteína OATP4C1 hallada en la región basal de dichos túbulos, tiene un flujo inverso de transporte de sustancias, permitiendo el ingreso de los mismos metabolitos al citoplasma de la célula (Sato et al., 2017). Para establecer la implicancia que la tasa de ambos transportadores tendría como moduladores celulares del AMPc, primero se realizó un análisis bioinformático para determinar el nivel de expresión del ARNm de *MRP4* y *OATP4C1* en CRCC y pacientes sanos, utilizando sondas específicas como se describe en materiales y métodos.

MRP4 mostró una clara sobreexpresión en tumores (n = 69), en comparación con los pacientes controles (n = 32; diferencia de mediana 169,3; p < 0,0001). En oposición, *OATP4C1* mostró niveles de expresión más bajos en tumores respecto a las muestras controles (Figura 5.21).

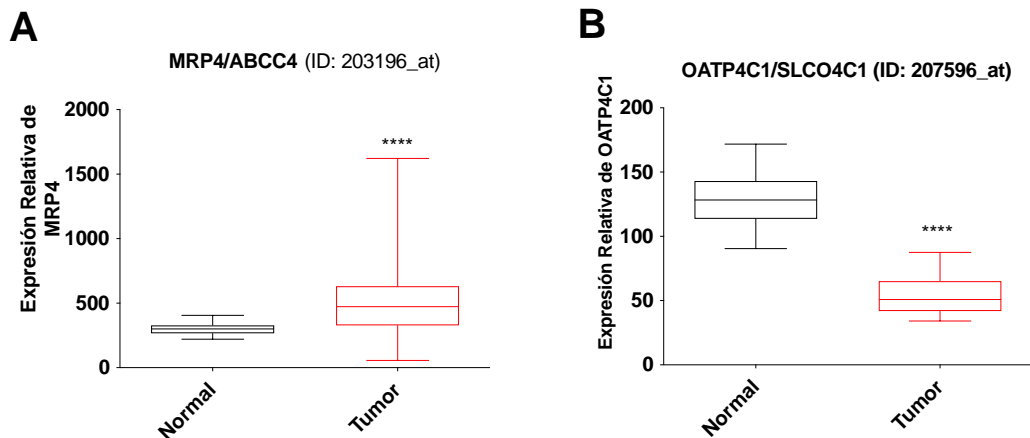


Figura 5.21. Análisis bioinformático de la expresión diferencial de *MRP4* y *OATP4C1* en tumores y muestras renales distales controles/normales. (A) Análisis *in silico* demostrando sobreexpresión diferencial de *MRP4* en muestras de CRCC en comparación con muestras no tumorales. (B) En oposición, *OATP4C1* está regulado negativamente en las muestras tumorales. Se muestran en ambos casos la identificación de las sondas utilizadas para *MRP4* y *OATP4C1*. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7. Se utilizó la prueba t de Student para determinar las diferencias significativas. Los valores son expresados como la media \pm SEM. ** p < 0,0001.**

La expresión opuesta de ambas proteínas transportadoras podría explicar la resistencia a la mayoría de las estrategias quimioterapéuticas exhibida por estos tumores. Paralelamente, la sobreexpresión de MRP4 podría implicar una hiperfuncionalidad, susceptible de ser tratada terapéuticamente.

De esta manera, primero se determinó el nivel de expresión del ARNm de *MRP4* y *OATP4C1* en muestras renales controles y tumores (core y periferia) por RT-qPCR. Los resultados mostraron una evidente sobreexpresión del transcripto de *MRP4*, al menos 20 veces superior respecto a los tejidos controles, considerando al core (media = 47,46) y periferia (media = 21,34). Mientras que, por otro lado, no se observaron cambios significativos en el transcripto de *OATP4C1*. Es importante considerar las variaciones interindividuales, las cuales contribuyen a aumentar las desviaciones estándar obtenidas en el análisis de MRP4 al ser comparadas las medias de cada fracción (normal, core, periferia), teniendo en cuenta que las muestras provienen de diferentes pacientes y en este punto no hubo una clasificación según estadios.

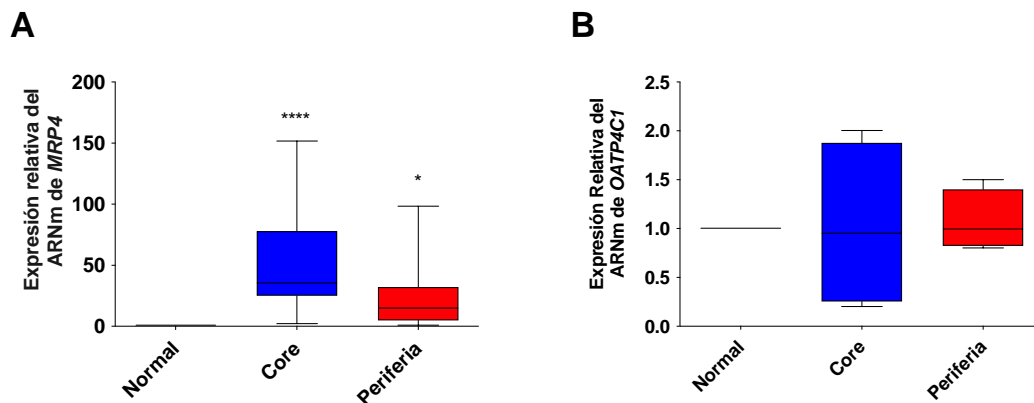


Figura 5.22. Cuantificación relativa del ARNm de *MRP4* y *OATP4C1*. (A) RT-qPCR de *MRP4* en muestras de CRCC (n = 18) en sus tres áreas de estudio, normalizado con β -actina. Obsérvese la sobreexpresión de *MRP4* en las secciones tumorales (Core y Periferia) en comparación con las secciones renales distales de los mismos pacientes. (B) RT-qPCR de *OATP4C1* en muestras de CRCC (n = 18) en sus tres áreas de estudio, normalizado con β -actina; no se aprecian diferencias significativas en las diferentes fracciones de estudio. Las muestras y los ensayos moleculares se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis One-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM. * p < 0,05, **** p < 0,0001).

Visto y considerando datos bibliográficos obtenidos en otros tumores (Carozzo et al., 2019; Copsel et al., 2011a; Ituarte et al., 2019) y los resultados empíricos mediante RT-qPCR, la atención se centró en MRP4.

Dadas las limitaciones que un estudio bioinformático posee y teniendo en cuenta la existencia de posibles modificaciones postranscripcionales, se procedió a analizar la expresión a nivel proteico (n = 18) en las mismas fracciones examinadas con técnicas de biología molecular.

En este caso se halló un aumento significativo de MRP4 de al menos 5-10 veces en comparación con las muestras controles.

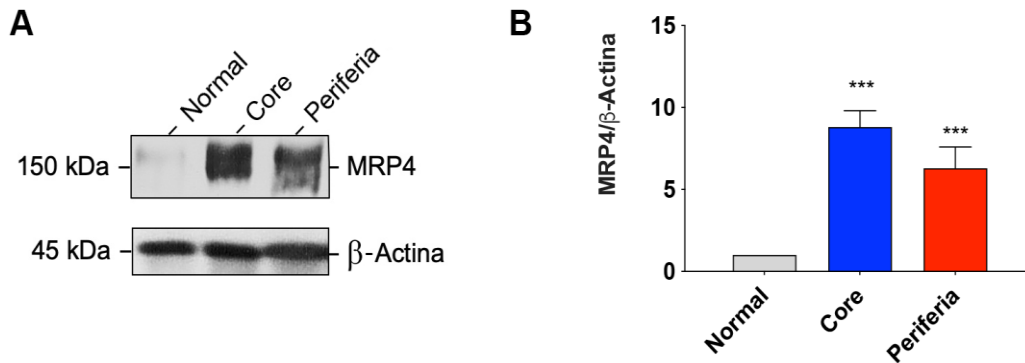


Figura 5.23. Análisis de MRP4 en CRCC por Western Blot. (A) Expresión proteica de MRP4 en los homogeneizados obtenidos a partir de las tres áreas de estudio en las muestras de CRCC. Como control de carga se utilizó un anticuerpo específico frente a β -actina y se sembraron 50 μ g de proteína en cada caso. **(B)** Cuantificación relativa de la expresión proteica de MRP4 respecto a la β -actina, realizada mediante densitometría de las bandas de interés utilizando el Software ImageJ®. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Las muestras y los ensayos de Western blot se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis One-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM. *** $p < 0,001$.

Luego de demostrar que la sobreexpresión de MRP4 en estos tumores existe tanto a nivel de transcripto como de la proteína misma, se procedió a determinar su localización celular, en orden de tener en conocimiento si además de las cantidades aberrantes también existían variaciones en su disposición. Para ello se llevó a cabo la técnica de IHQ en las muestras de CRCC en las fracciones en estudio, y en una muestra de colon como control positivo de la expresión de MRP4 (Liu et al., 2010).

Primero se investigó la localización de MRP4 en las muestras renales distales controles ($n = 10$), las cuales mostraron un patrón de distribución de tipo membranoso homogéneo. MRP4 fue circunscripto solo a nivel de las células de los túbulos renales proximales, mientras que a nivel glomerular se observó ausencia de marcación (Figura 5.24. A y D).

Por otro lado, en las muestras tumorales, MRP4 mostró una expresión intensa y en su mayoría de tipo heterogénea, con diferencias dependientes de las zonas: niveles de expresión de moderado a altos (puntaje +2 y +3) con patrón membranosa en el core tumoral (80%) (Figura 5.24. B y E), en contraste con una expresión leve y moderada (puntuación +1 y +2) en tejido periférico (100%) (Figura 5.24. C y F).

Además, se puede visualizar en la Figura 5.24. A-C y D-F la ilustración de dos pacientes con diferentes niveles de expresión de MRP4 en las tres fracciones de muestras en estudios. El

primero muestra una expresión más equilibrada de la proteína entre las áreas, mientras que el segundo denota claras diferencias entre el core y la periferia (paneles B-C y E-F respectivamente). Por lo cual, en oposición a lo observado en tejidos periféricos, el core del tumor muestra una alta expresión de focos intensos y heterogéneos de esta proteína (flechas en el panel E).

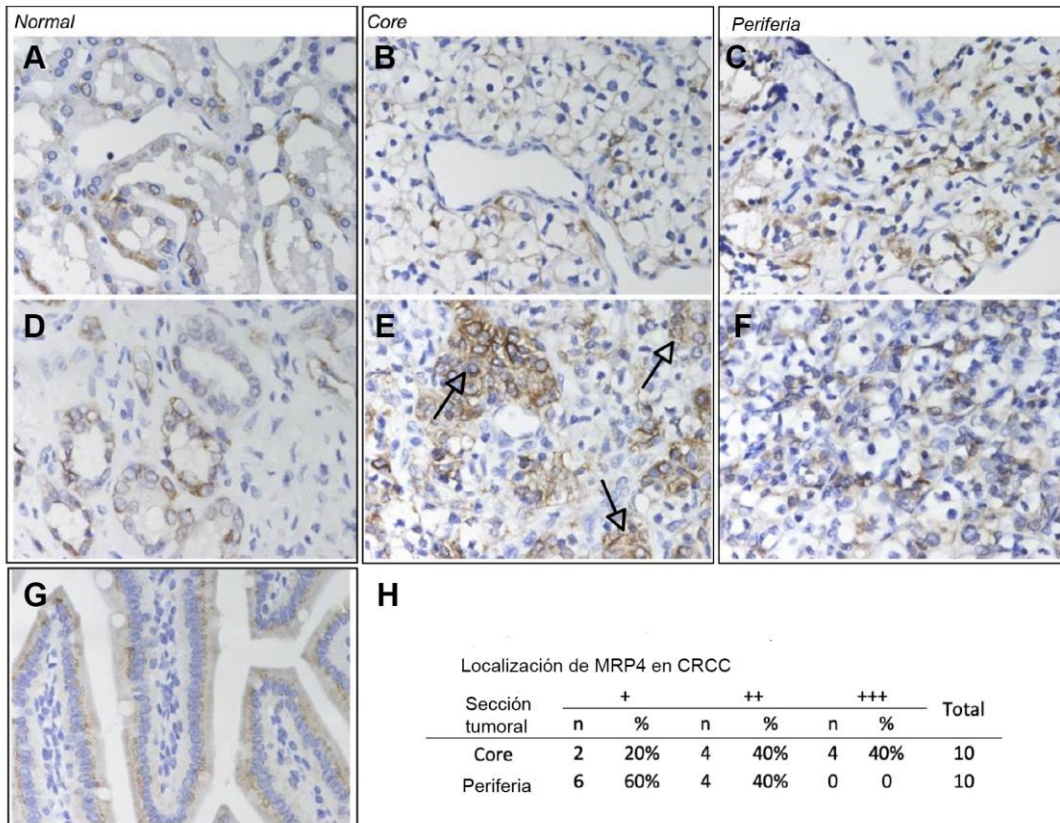


Figura 5.24. Inmunohistoquímica de MRP4 en CRCC: (A-C y D-F) Dos pacientes representativos de las muestras de CRCC analizadas por IHQ para determinar la localización de MRP4. **(A y D)** La IHQ en el tejido renal distal considerado normal demuestra ausencia total de expresión de la proteína a nivel glomerular, mientras que se observa una alta y ordenada expresión polarizada a nivel de los túbulos proximales. **(B y E)** La expresión de MRP4 en el core del tumor se muestra desordenada con focos intensos de expresión. **(C y F)** En contraste, los tejidos tumorales periféricos, demuestran una expresión de MRP4 débil, con focos infrecuentes de expresión intensa. **(G)** Control positivo de expresión de MRP4 en muestra de colon. **(H)** Semicuantificación de la expresión y localización de MRP4 en CRCC. Aumento 400x.

5.1.2. Expresión de MRP4 en líneas celulares renales: CAKI-1 y CAKI-2

Dada la importancia del hallazgo de un segundo marcador tumoral, además de SCD-1, con un perfil de expresión y localización diferencial en este tipo de tumores, se procedió a establecer un modelo *in vitro* en cultivos celulares, que permita la evaluación y validación preliminar de MRP4 como un marcador de pronóstico o blanco futuro de intervención terapéutica.

Primeramente, se midió el nivel de expresión tanto del ARNm como de la proteína MRP4 en dos líneas celulares que mejor representan al CRCC, pero con distintos grados de diferenciación. CAKI-1 células diferenciadas obtenidas de una metástasis en piel de carcinoma renal y CAKI-2,

células con menor grado de diferenciación, obtenidas directamente de tumores renales y posteriormente inmortalizadas (Glube, 2007; Peng et al., 2016).

Siguiendo la misma lógica utilizada en la IHQ (Figura 5.24), se utilizó la línea celular HCT-116 (Línea de células tumorales de colon), como control positivo de la expresión de MRP4 y como medida de expresión basal del transcripto de *MRP4*.

Inicialmente se analizó el transcripto de MRP4 mediante RT-qPCR en las tres líneas celulares mencionadas (HCT-116, CAKI-1 y CAKI-2). Como resultado se observó que CAKI-2 fue la línea celular que mostró el nivel de expresión máxima del ARNm de *MRP4* (3 veces mayor que las células CAKI-1, (Figura 5.25).

Teniendo en cuenta que los ARNm sufren procesamientos post-transcripcionales en los cuales el código puede modificarse y ello podría derivar en una falta o reducción en el proceso de traducción, se determinó la expresión proteica de MRP4 mediante Western blot en las líneas celulares CAKI-1 y CAKI-2 (Figura 5.26).

La Figura 5.26 muestra que ambas líneas celulares exhiben MRP4, pero claramente las células CAKI-2 expresan 1,5 veces más que CAKI-1. Esta diferencia fue analizada y cuantificada utilizando el software ImageJ.

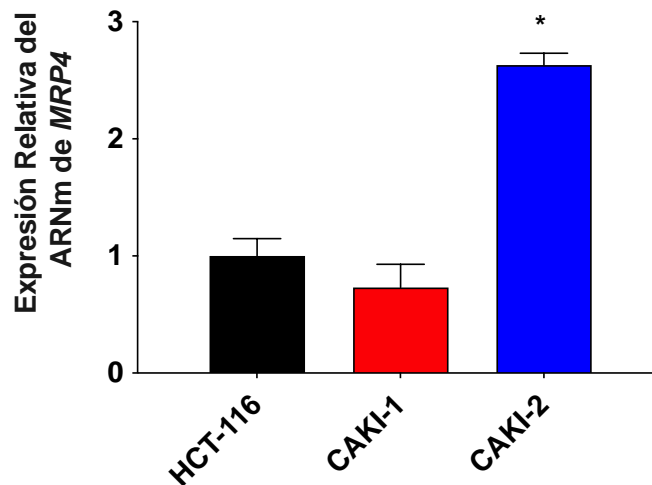


Figura 5.25. Cuantificado del ARNm de *MRP4* mediante RT-qPCR en las líneas celulares CAKI-1 y CAKI-2. La expresión del ARNm de *MRP4* se normalizó mediante el gen de la *B-actina*. La línea celular HCT-116 se utilizó como control positivo y como valor de base. Los cultivos y los ensayos moleculares se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis One-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$.

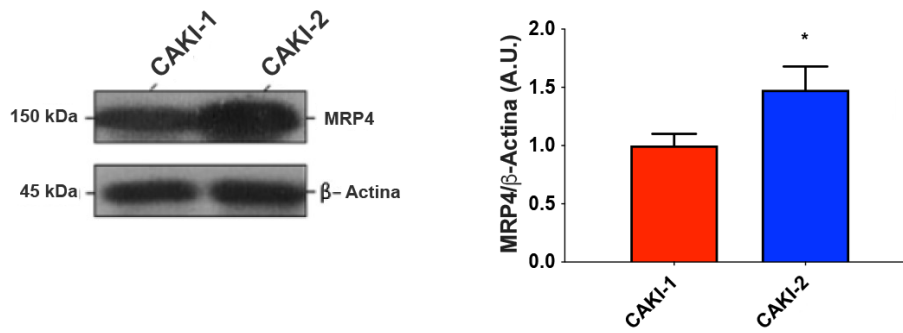


Figura 5.26. Expresión de la proteína MRP4 en las líneas celulares CAKI-1 y CAKI-2. (A) Análisis mediante Western blot el cual demuestra la expresión de MRP4 en las dos líneas celulares de CRCC estudiadas. (B) Análisis densitométrico de intensidades de bandas de MRP4 en CAKI-1 y CAKI-2. La expresión de la proteína MRP4 se normalizó utilizando la expresión de la β-actina. Los cultivos y los ensayos de Western blot se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7. Se recurrió a la prueba t de Student para determinar significancias estadísticas. Los valores son expresados como la media ± SEM. * $p < 0,05$.

De manera similar a los ensayos llevados a cabo en muestras tumorales, se evaluó la localización de MRP4 por inmunocitoquímica (ICQ). En este caso, no se observaron diferencias significativas en los patrones de distribución o localización de MRP4 entre las líneas celulares CAKIs. Tanto CAKI-1 como CAKI-2, presentaron agregados citoplasmáticos de la proteína MRP4 (flechas rojas y azules de la Figura 5.27 B y C respectivamente), en oposición al notable patrón membranoso evidenciado en las células HCT-116 (flechas negras; Figura 5.27 A).

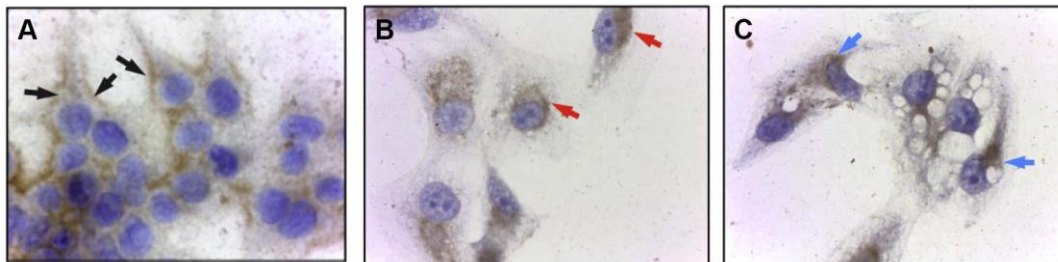


Figura 5.27. ICQ de MRP4 en células HCT-116 (A), CAKI-1 (B), CAKI-2 (C). Obsérvese el patrón de expresión y localización de MRP4 a nivel de membrana en las células de colon (flechas negras), en comparación con la intensa inmunomarcación citoplasmática en ambas líneas celulares CAKIs (CAKI-1: flechas rojas; CAKI-2: flechas azules). Aumento 400x.

5.1.3. Estudio del flujo de extrusión de AMPc mediado por MRP4 en las células CAKI-1 y CAKI-2 y su relación con la proliferación celular

MRP4 ha sido descrito como el principal transportador involucrado en la extrusión de AMPc en otras líneas celulares de cáncer (Carozzo et al., 2019; Copsel et al., 2011). Por dicho motivo, a continuación, se evaluó la cinética del AMPc en las líneas celulares CAKI-1 y CAKI-2. Para estudiar la acumulación intracelular y el flujo de salida del AMPc, las líneas celulares CAKIs fueron

tratadas con IBMX 1 mM (inhibidor de la enzima PDE) y FSK 25 μ M (activador directo de la enzima adenilato ciclasa). Luego se recogieron por separado los sobrenadantes y raspados celulares para la medición por radiometría de los niveles de AMPc extracelular (e-AMPc) y AMPc intracelular (i-AMPc) respectivamente (Figura 5.28 A y B).

Posteriormente, para demostrar si existían diferencias en la capacidad de extrusión de este nucleótido cíclico entre ambas líneas celulares, se calcularon los valores de las áreas bajo las curvas (AUC) tanto para los niveles de e-AMPc como para i-AMPc y luego se trazó la relación de las AUC e-AMPc/i-AMPc (Figura 5.28 C).

El valor de la relación e-AMPc/i-AMPc fue superior para las células CAKI-2 en contraste con las CAKI-1 (diferencia entre medias 0,073; $p = 0,007$). Esto demuestra una mayor capacidad de extrusión de AMPc por parte de la línea celular CAKI-2. Sorprendentemente, la relación entre ambas capacidades de extrusión fue aproximadamente $1,36 \pm 0,07$, valor que se encuentra en concordancia con la diferencia de expresión proteica de MRP4 hallada por Western Blot o más aun por RT-qPCR.

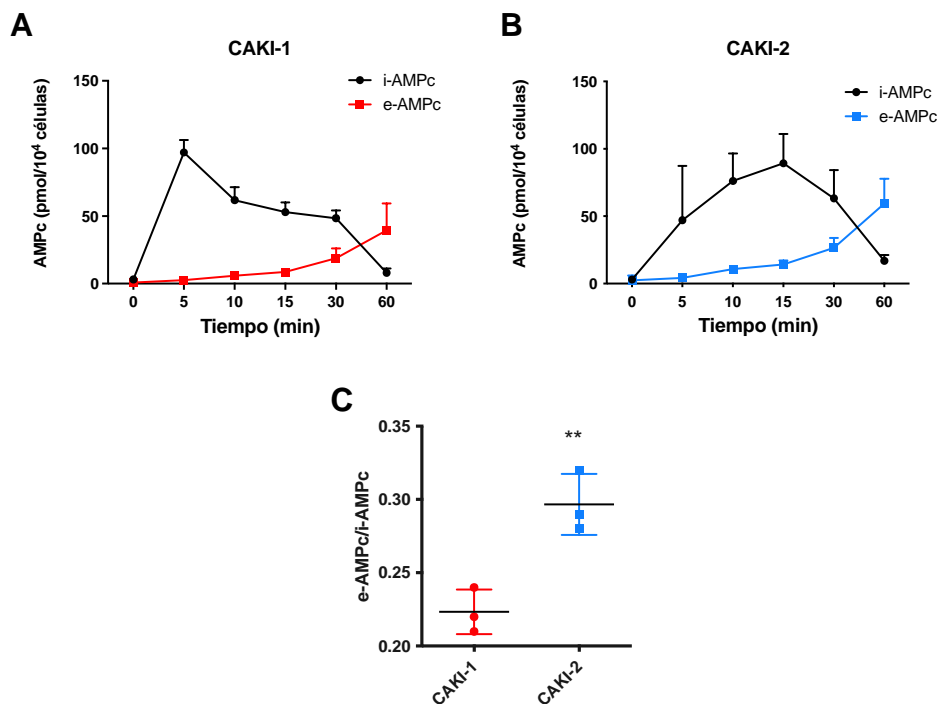


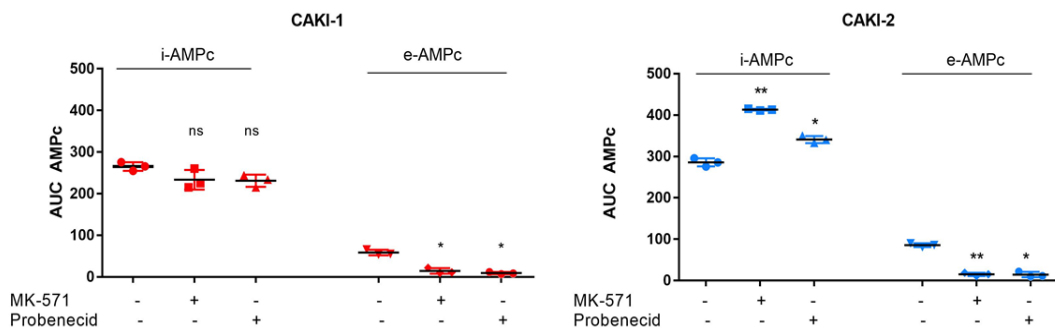
Figura 5.28. Ensayo de extrusión de AMPc en líneas celulares CAKI-1 y CAKI-2. (A) Las células CAKI-1 y CAKI-2, fueron incubadas con IBMX (1 mM) y posteriormente estimuladas con FSK (25 μ M) durante 5 minutos. El e-AMPc se midió en los sobrenadantes de cultivos, mientras que el i-AMPc se obtuvo a partir de los raspados celulares. (B) El aumento en la relación e-AMPc/i-AMPc puso de manifiesto una mayor tasa de extrusión de AMPc por parte de la línea celular CAKI-2. Los cultivos y los ensayos radiométricos se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7. Se recurrió a la prueba t de Student para determinar significancias estadísticas. Los valores son expresados como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$.

Para lograr una mejor caracterización de la extrusión de AMPc, los cultivos de células CAKIs, fueron incubados en las condiciones experimentales antes mencionadas (IBMX 1 mM + FSK 25 μ M), y además se añadieron dos inhibidores diferentes de la proteína MRP4 por separados: MK-571 (25 μ M; 5 minutos) y Probenecid (0.5 mM; 5 minutos).

El efecto sinérgico del aumento de la síntesis de AMPc (generada por las FSK 25 μ M), la inhibición de su degradación (por inhibición de la PDE mediante el IBMX 1 mM) y la inhibición simultánea de su extrusión (ya sea por MK-571 25 μ M o Probenecid 0.5 mM), produjeron un aumento significativo en la acumulación del i-AMPc en comparación con los controles que no contenían inhibidores de MRP4 (IBMX 1 mM + FSK 25 μ M) en CAKI-2.

Como se observa en la Figura 5.29, la inhibición farmacológica de MRP4 conduce a disminuciones significativas en los niveles del e-AMPc en ambas líneas celulares, lo que denota una inhibición efectiva de la extrusión de este nucleótido cíclico.

En resumen, estos resultados indican que MRP4 es el transportador responsable de modular los niveles de AMPc en los espacios tanto intracelular como extracelular, en las líneas celulares CAKI-1 y CAKI-2.



A la luz de las observaciones anteriores, se investigó a continuación el papel de MRP4 en la proliferación del CRCC.

Sabiendo que el AMPc se encuentra implicado en los procesos de proliferación celular, la extrusión de AMPc (cambios en los balances de AMPc extracelular e intracelular) fue relacionada de manera directamente proporcional con la expresión de MRP4 (Carozzo et al., 2019; Yaneff et al., 2019), por lo tanto, las células CAKI-2 debían proliferar con mayor velocidad por expresar mayores niveles de MRP4 en comparación con las células CAKI-1.

Efectivamente, en los experimentos desarrollados mediante el ensayo colorimétrico XTT® (y otros no mostrados en esta tesis), se observó mayor actividad metabólica en las células CAKI-2, lo cual está relacionada con una tasa proliferativa superior respecto a CAKI-1 (Figura 5.30).

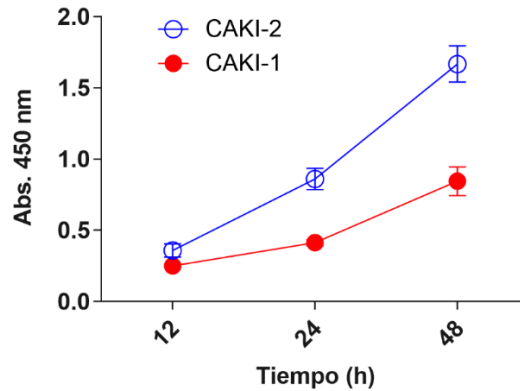


Figura 5.30. Proliferación de las líneas celulares CAKI-1 y CAKI-2. Obsérvese que la línea CAKI-2 posee un tiempo de duplicación celular menor respecto a CAKI-1, como lo demuestra el ensayo de proliferación XTT®.

Asimismo, con la finalidad de demostrar que el balance del AMPc extracelular/intracelular, o más bien las concentraciones del e-AMPc participan en los procesos de proliferación celular, las células CAKIs fueron privadas de SFB, y diferentes concentraciones de este nucleótido cíclico se añadieron al medio de cultivo para luego evaluar proliferación celular mediante ensayo de XTT® (Figura 5.31). Se puede observar que bajas concentraciones de AMPc exógeno (10 µM) indujeron hasta un 100% de aumento en el número de células CAKI-2. Sin embargo, este efecto pareciera tener un límite de saturación, ya que no se observó ningún cambio a dosis superiores a 10 µM.

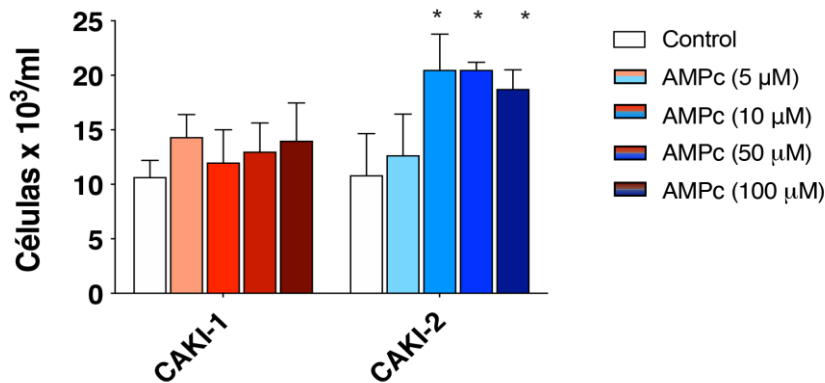


Figura 5.31. Efecto del AMPc exógeno sobre la proliferación celular. Las monocapas celulares de CAKI-1 y CAKI-2, se cultivaron hasta confluencia óptima para este ensayo. Luego fueron lavadas y privadas de SFB. Dos horas más tarde, se agregaron diferentes concentraciones de AMPc y se evaluó la proliferación celular luego de 48 horas de tratamiento mediante ensayo de XTT®. Los cultivos celulares y los ensayos de proliferación se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de Two-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media ± SEM. * p < 0,05.

Llamativamente, las células CAKI-2 las cuales presentaron mayor expresión de MRP4 y extruyeron más AMPc, mostraron mejor este efecto de respuesta a e-AMPc. Por otra parte, las células CAKI-1 no mostraron cambios significativos en la proliferación celular ante la exposición a diferentes concentraciones de AMPc exógeno.

Se corroboró el aumento del número total de células CAKI-2 mediante recuento en cámara de Neubauer utilizando colorante de exclusión azul de tripán (Figura 5.32).

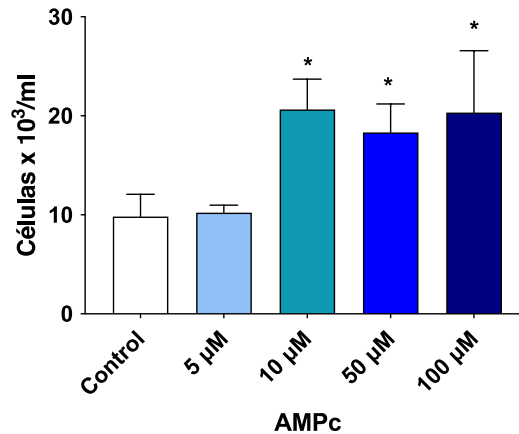


Figura 5.32. Efecto del AMPc exógeno sobre la proliferación de células CAKI-2. Las monocapas celulares de CAKI-2 se cultivaron hasta confluencia óptima para este ensayo. Luego fueron lavadas y privadas de SFB. Dos horas después, se agregaron diferentes concentraciones de AMPc y se evaluó la proliferación celular 48 horas más tarde mediante recuento manual en cámara de Neubauer en presencia de azul de tripán. Los cultivos celulares y los ensayos de proliferación en cámara de Neubauer se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de One-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$.

Visto así, que la adición de AMPc 10 μ M indujo proliferación en la línea celular CAKI-2, las mismas fueron tratadas nuevamente con AMPc 10 μ M por 48 horas y luego se analizaron las etapas del ciclo celular mediante citometría de flujo. Las células sometidas al tratamiento mostraron una disminución de la fase G0-G1 y un leve pero significativo aumento en la fase S de replicación del ADN (35,43%) en comparación con las células controles sin tratamiento (Figura 5.33), lo cual concuerda con los resultados de proliferación celular hallados.

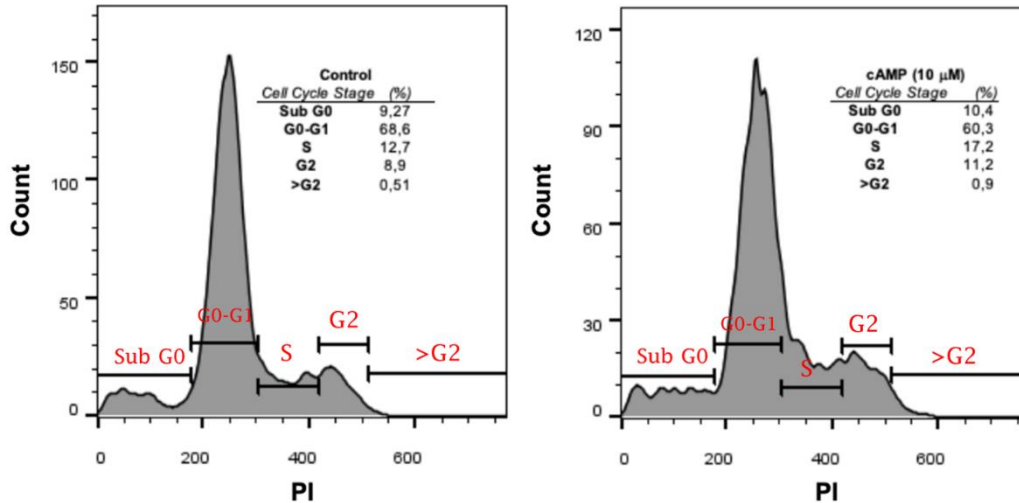


Figura 5.33. Implicancia del AMPc exógeno sobre el ciclo celular de células CAKI-2. Las etapas del ciclo celular se evaluaron por citometría de flujo utilizando tinción con ioduro de propidio (PI). Las células tratadas con AMPc por 48 horas mostraron una disminución significativa de la fase G0-G1 y leve aumento de la fase S. Los cultivos celulares y los ensayos de ciclo celular se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de Two-way ANOVA, Múltiples comparaciones.

5.1.4. Evaluación de la inhibición farmacológica de la actividad de MRP4 de células CAKI-2 en relación con las modificaciones fenotípicas, proliferación y apoptosis

Reportes previos y datos empíricos, demostraron que el equilibrio e-AMPc/i-AMPc es crucial para la proliferación celular (Carozzo et al., 2019). El incremento del i-AMPc induce inhibición de la proliferación, asociada con diferenciación celular en células de leucemia mieloide aguda (AML) (Copsel et al., 2011), y la disminución del e-AMPc está asociada con inhibición del crecimiento celular y la detención del ciclo celular en los modelos de adenocarcinoma ductal pancreático humano (PDAC) (Carozzo et al., 2019).

Considerando que es farmacológicamente posible modular el balance e-AMPc/i-AMPc (Figura 5.29), a continuación, se investigó los efectos bioquímicos originados a nivel celular. Teniendo en cuenta que la línea celular CAKI-2 posee un mayor grado de indiferenciación (mayor capacidad proliferativa y malignidad), presenta mayor expresión de MRP4 (Figuras 5.26) y en consecuencia mayor capacidad de extrusión de AMPc (Figura 5.28) o mayor acumulación de i-AMPc al inhibir MRP4 (Figura 5.29) respecto a CAKI-1, el trabajo se enfocó en esta línea celular como modelo de CRCC.

Cuando las células CAKI-2 fueron expuestas al inhibidor MK-571 (25 μM; inhibidor farmacológico selectivo de MRP4) y simultáneamente se estimuló la producción de i-AMPc con FSK (25 μM)

durante 18-24 horas, las células mostraron cambios muy notables en su morfología celular (extensión del citoplasma y adelgazamiento celular) compatible con estrés celular.

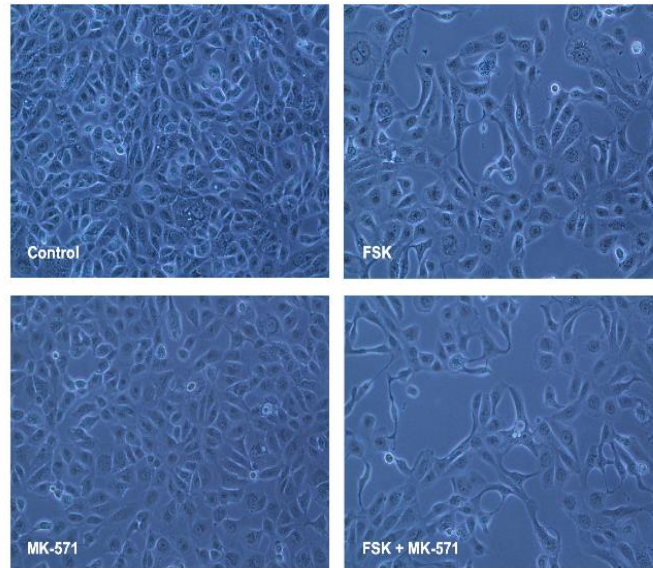


Figura 5.34. Cambios fenotípicos inducidos por estrés celular. Microfotografías de la línea celular CAKI-2 sometida a diferentes tratamientos durante 18-24 horas. Las células tratadas tienen morfologías muy diferentes (alargadas y delgadas) en comparación con el control (morfología poliédrica), principalmente cuando el tratamiento es sinérgico (FSK 25 μ M + MK-571 25 μ M). Los cultivos celulares y los ensayos farmacológicos se analizaron por triplicado. Aumento 200x.

Por otro parte, ya se demostró anteriormente de manera empírica y de forma bibliográfica (Guijas et al., 2014) que una considerable medida de evaluación del estrés celular es la observación de LD (Figura 5.20). Utilizando el tratamiento sinérgico (FSK 25 μ M + MK-571 25 μ M) durante 18 horas y diferentes enfoques, como el análisis por citometría de flujo y microscopía confocal, se determinó que el número de LD aumentó en dichas condiciones experimentales. La Figura 5.35 C muestra un aumento en la intensidad de fluorescencia de los medios (MFI) de las células tratadas (FSK + MK-571, ambos 25 μ M) en comparación con las células controles (diferencia entre medias: $81,33 \pm 5,81$; $p = 0,0002$), después de la tinción con Bodipy[®], un colorante específico de LD.

Simultáneamente, se observaron células CAKI-2 mediante microscopía confocal utilizando 18:1n-9 (30 μ M) como control positivo para permitir la biogénesis de LD (Ohsaki et al., 2010; Spangenburg et al., 2011). Mientras que los LD inducidos por 18:1n-9 mostraron una disposición apical denotando polarización celular, la imagen microscópica de las células tratadas con el inhibidor de MRP4 y FSK (ambos 25 μ M) demostró más bien una distribución de fluorescencia con patrón citoplasmático, compatible con un mayor número de LD y más pequeños (Figura 5.35 E y F respectivamente).

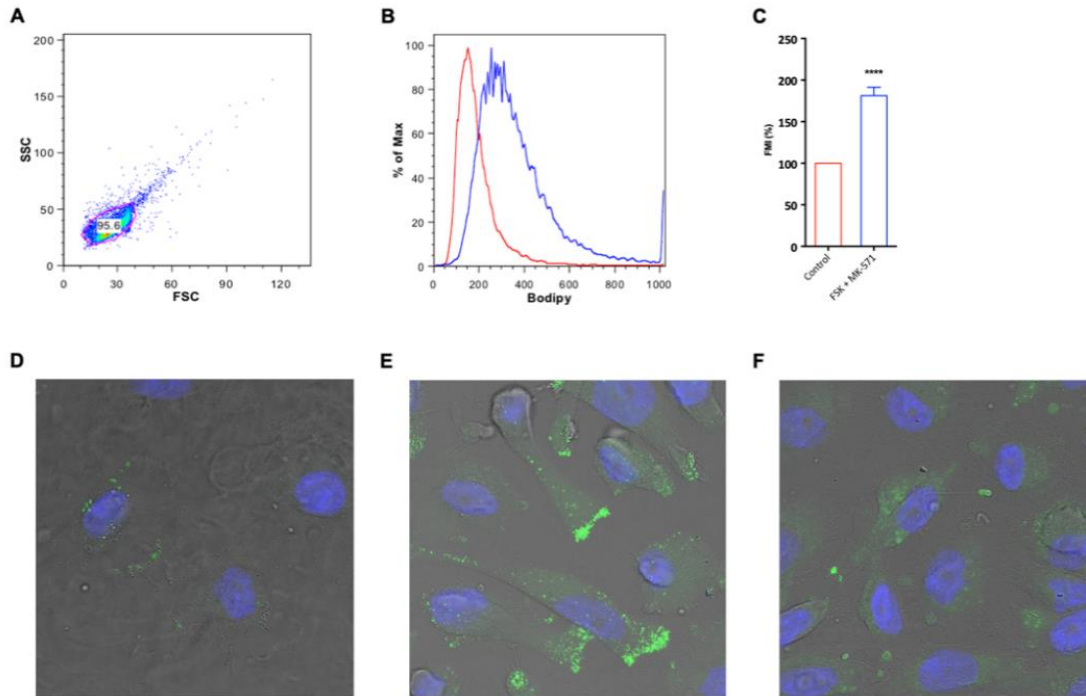


Figura 5.35. Cambios fenotípicos en CAKI-2 inducidos por la inhibición farmacológica de MRP4. (A) Estrategia de selección de células controles y tratadas. **(B)** Adquisición de 2.10^4 eventos en modo lineal de células CAKI-2 controles (rojo) y tratadas con FSK 25 μ M + MK-571 25 μ M (azul) durante 18 horas, ambas teñidas con Bodipy[®]. Se observó un desplazamiento a la derecha de las células tratadas, lo cual indica un aumento de LD citoplasmáticas (señal de estrés celular). **(C)** Intensidad de fluorescencia de los medios (porcentaje MFI) en las poblaciones celulares controles y tratadas. **(D)** Microscopía confocal de células CAKI-2 controles. **(E)** Control positivo de la biogénesis de LD inducida por 18:1n-9 (30 μ M). **(F)** Células CAKI-2 tratadas (MK-571 + FSK; ambas 25 μ M). Aumento original 400x. Los cultivos celulares, los ensayos de citometría de flujo y la microscopía confocal, fueron analizados por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 – unpaired t test. Los valores son expresados como la media \pm SEM. *** $p < 0,001$.

Para determinar diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición bioquímica de estos LD, se analizó mediante GC/MS el perfil de ácidos grasos contenidos en las fracciones de PLs, TAG y CE en las células CAKI-2 controles y tratadas con FSK 25 μ M y MK-571 25 μ M por 18-24 horas. Se observó mayor acumulación de SFAs, principalmente 16:0 y 18:0 (ácido palmítico y ácido esteárico respectivamente) en las fracciones de TAG y CE, en células tratadas simultáneamente con FSK 25 μ M y MK-571 25 μ M. En contraste, la fracción de PLs no mostró cambios significativos en la composición de ácidos grasos entre las células tratadas y los controles (Figura 5.36).

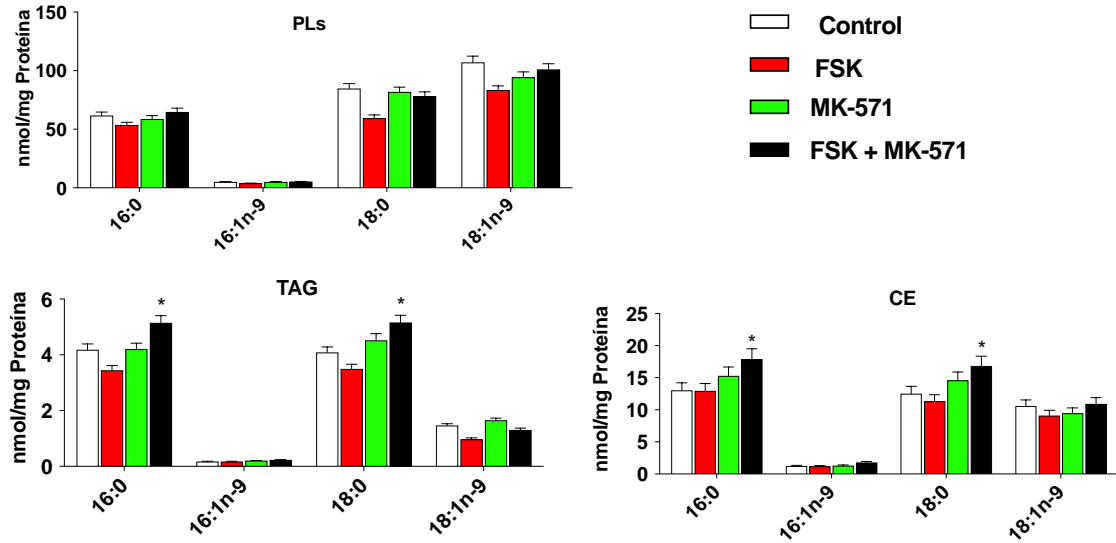


Figura 5.36. Perfil Lipídico de células CAKI-2 sometidas a FSK 25 μ M y MK-571 25 μ M. Se obtuvieron las fracciones lipídicas de las células controles y tratadas por 18-24 horas. El contenido de las especies de PLs, TAG y CE se analizó por GC/MS. Se observó mayor contenido de los ácidos grasos 16:0 y 18:0 en las células tratadas simultáneamente con FSK 25 μ M y MK-571 25 μ M en las especies correspondientes a TAG y CE. No se observan modificaciones significativas en la fracción de PLs. Los cultivos celulares y los ensayos lipídicos se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de Two-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$.

Cuando se ensayaron los tratamientos de inhibición antes mencionados en los cultivos de células CAKI-2, pero a tiempos superiores a las 24 horas (48 y 72 horas de tratamientos), se observó una reducción importante en la viabilidad celular (Figura 5.37).

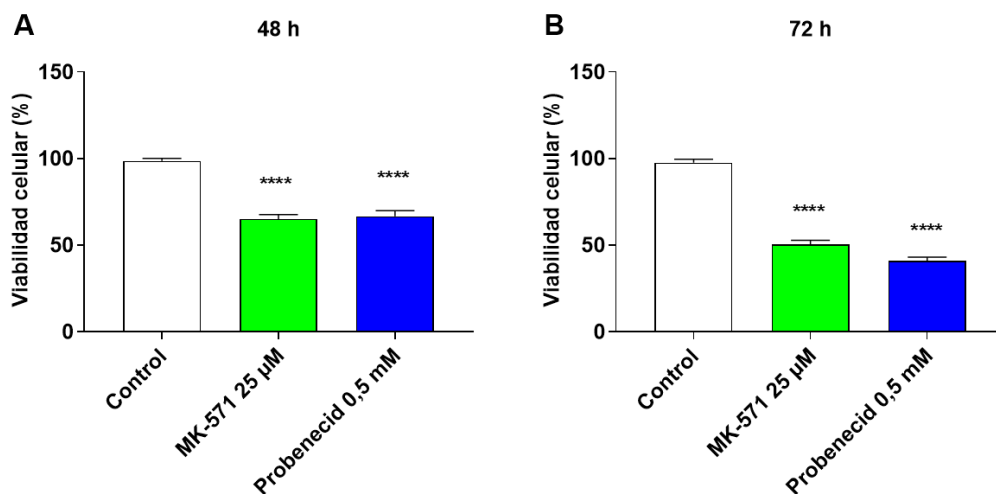


Figura 5.37. Viabilidad de células CAKI-2 sometidas a inhibidores de MRP4. Las células CAKI-2 tratadas con MK-571 25 μ M o Probenecid 0,5 mM (en ambos casos en presencia de FSK 25 μ M) durante 48 y 72 horas, exhibieron alteraciones en la viabilidad celular. Los cultivos celulares y los ensayos de inhibición de MRP4 se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de One-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM. **** $p < 0,0001$.

La viabilidad y/o la proliferación celular comprometida de las células CAKI-2, observadas a las 48 horas de tratamiento de inhibición de MRP4 con FSK 25 μ M + MK-571 25 μ M, fue compatible con el aumento de eventos en la etapa Sub G0 (19,1%) del ciclo celular, cuando se repitieron las condiciones experimentales y se analizaron por citometría de flujo (Figura 5.38).

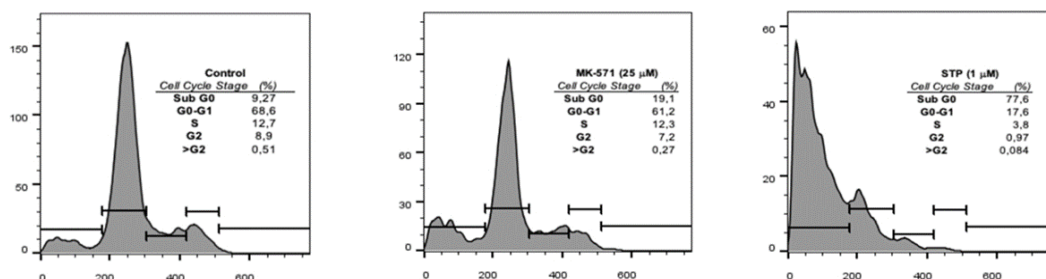


Figura 5.38. Ciclo celular de células CAKI-2 sometidas a inhibición farmacológica de MRP4. La evaluación de la inhibición de la proliferación por citometría de flujo y tinción con PI mostró una acumulación celular significativa en la etapa Sub G0 de las células CAKI-2 tratadas con FSK + MK-571 (ambas 25 μ M) durante 48 horas. Se utilizó Estaurosporina (STP 1 μ M) como control positivo de apoptosis celular. Los cultivos celulares y los ensayos de inhibición de MRP4 se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de Two-way ANOVA, Múltiples comparaciones.

Evidentemente, la inhibición farmacológica de MRP4 podría resultar en inhibición de la proliferación celular o más bien, en apoptosis celular. Por consiguiente, se evaluó mediante ICQ la activación de caspasas (Caspasa-3; vía efectora de apoptosis) cuando las células CAKI-2 fueron sometidas a la acción del inhibidor MK-571 (25 μ M) en presencia de FSK (25 μ M). La Figura 5.39 muestra mediante inmunodetección la activación de caspasa-3 en las células tratadas con MK-571 (25 μ M).

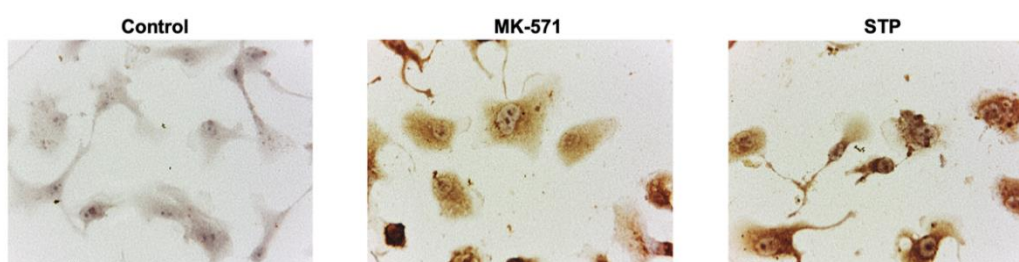


Figura 5.39. La inhibición de MRP4 indujo apoptosis en células CAKI-2. Se estudió la activación de caspasa 3 por ICQ. Las células CAKI-2 expuestas a FSK + MK-571 (ambas 25 μ M) por 48 horas mostraron inmunomarcación extensa de caspasa 3, de manera similar a las células tratadas con Estaurosporina (STP; 1 μ M) como control positivo de apoptosis. Magnificación 400x. Los cultivos celulares y los ensayos de apoptosis por ICQ se analizaron por triplicado.

No obstante, los diferentes fármacos antineoplásicos y algunos mediadores fisiológicos endógenos, como es el caso de los eicosanoides, han sido reportados previamente como sustratos principales de MRP4 (Russel et al., 2008). En orden de determinar si dichas moléculas de carácter lipídicas podrían acumularse en el compartimento citoplasmático y posteriormente influir con la proliferación celular (al igual que el AMPc previamente demostrado), se midió el perfil de eicosanoides en células CAKI-2 en las condiciones experimentales descritas previamente, es decir, en presencia del MK-571 y FSK (ambos 25 μ M). Usando extracción en fase sólida y HPLC acoplado a espectrometría de masas en tándem (TQP), se determinó un conjunto de 20 eicosanoides en las fracciones intracelulares y en el sobrenadante de los cultivos celulares en cuestión. Luego, de evaluar su producción en un amplio rango de exposición temporal (de 1-24 horas), no se hallaron diferencias significativas en el perfil de eicosanoides en el espacio intracelular. Por el contrario, en el espacio extracelular se observó acumulación de algunos eicosanoides como 12-HETE, tetranor-12-HETE y 14-HDoHE en las células CAKI-2 sometidas al inhibidor de MRP4 (Figura 5.40). Estas diferencias fueron evidentes a partir de las 18 horas de exposición, momento en el que ya se demostró, inicia el proceso de estrés celular, y posteriormente (48 horas) muerte celular por apoptosis. Estos resultados son compatibles con la hipótesis de que el AMPc es el metabolito hasta ahora involucrado principalmente en los efectos biológicos descritos anteriormente.

En conjunto, todos estos datos sugieren que, la inhibición de la función de MRP4 conduce a un desequilibrio de sus respectivos sustratos, provocando así inhibición de la proliferación celular y posterior inducción de apoptosis. Simultáneamente, dicha inhibición farmacológica causó cambios fenotípicos asociados al perfil lipídico celular.

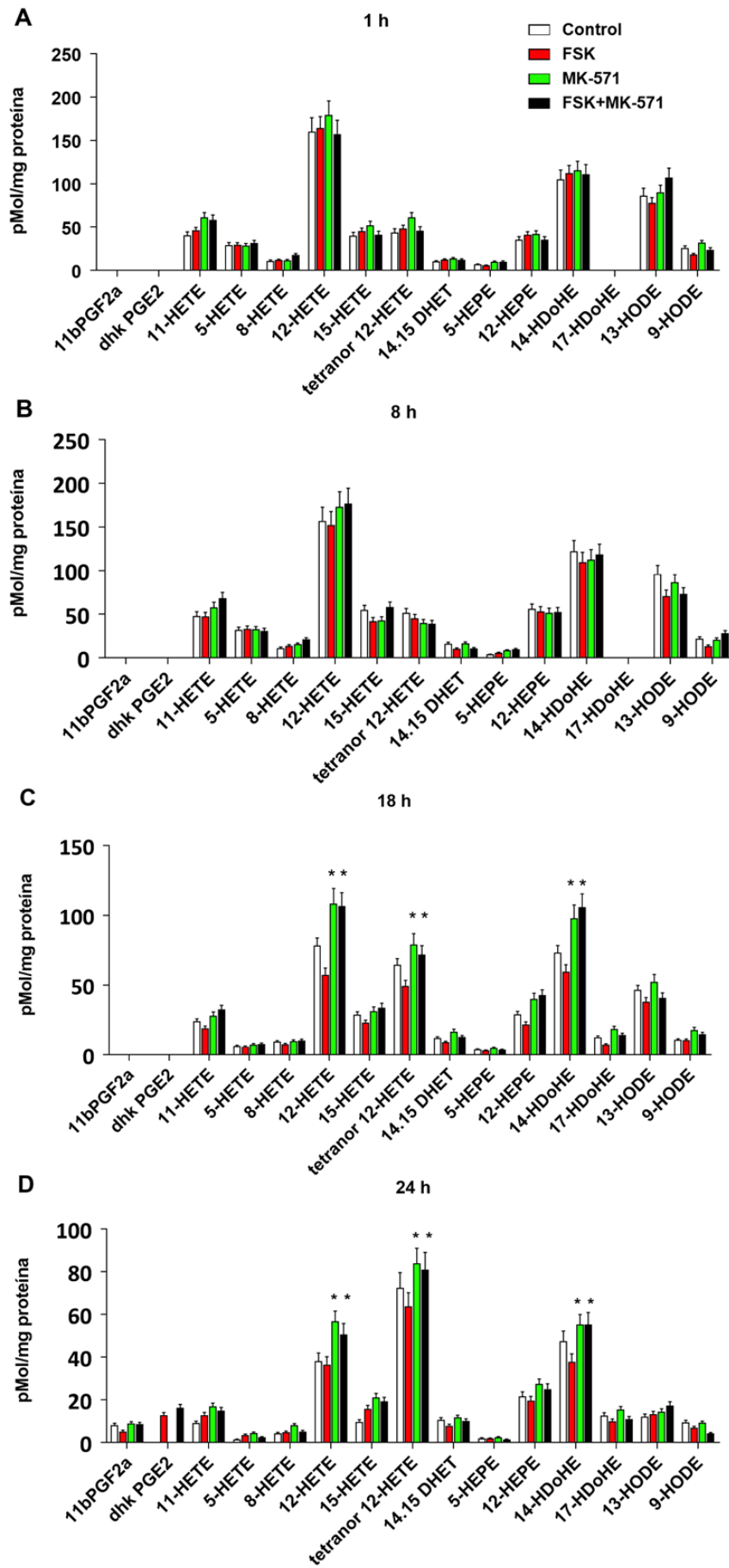


Figura 5.40. Perfil de eicosanoides en los sobrenadantes de las células CAKI-2 tratadas con el inhibidor de MRP4 (MK-571). El espacio extracelular muestra acumulación de algunos eicosanoides como 12-HETE, tetranor-12-HETE y 14-HDoHE. Las diferencias respecto al control son más notables a partir de las 18 horas de inhibición farmacológica. Los cultivos celulares y los ensayos lipidómicos se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de Two-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$.

5.1.5. Estudio de la expresión de MRP4 en condiciones hipóxicas

Se demostró que MRP4 presenta un patrón de expresión diferencial en tumores respecto a las secciones de tejidos controles consideradas normales, y también se observó la existencia de una expresión heterogénea de MRP4 en fracciones intratumorales: mayor expresión de MRP4 en el core respecto a la periferia tumoral. Además, se demostró que células expuestas a mayor grado de hipoxia como células CAKI-2 tratadas con 300 μM de CoCl_2 (o células del core tumoral) evidenciaron mayor expresión de SCD-1, quien a su vez manifestó una correlación directa con la producción de 18:1n-9 y con Ki-67 (marcador de proliferación celular). En concordancia con esta idea, el modelo de células CAKI-2 mostró la existencia de una relación directa entre el nivel de expresión de MRP4 y la capacidad de proliferación de esta línea celular. Por otro lado, numerosas publicaciones, indican que las células halladas en el core de los tumores a menudo se encuentran en hipoxia debido a su incapacidad para acceder a los capilares sanguíneos o al deterioro de estos últimos (Chanmee et al., 2014; Khan & Kerbel, 2018). Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, se investigó la existencia de una asociación directa entre ambos fenómenos: la hipoxia y la expresión de MRP4. Para verificar dicha hipótesis, se utilizaron concentraciones no citotóxicas de CoCl_2 .

Visto que exposiciones de 400 μM de CoCl_2 por un lapso de 24 horas provocó reducción en el porcentaje de viabilidad celular de la línea CAKI-2 (Figura 5.16), se repitió la evaluación de la expresión de *HIF-2A* hasta 300 μM de CoCl_2 , tanto por qPCR (Figura 5.41 A) como por ICQ (Figura 5.41 B - C). Los resultados demostraron que las células controles expresaron de manera basal *HIF-2A* y presentaron un patrón de inmunomarcación citoplasmático débil y homogéneo, en contraste con las células tratadas (por ejemplo, 300 μM) que revelaron nuevamente una sobreexpresión del ARNm y una translocación de la proteína desde el citoplasma al núcleo, manifestando un patrón de inmunomarcación perinuclear o nuclear (Figura 5.41 C - Ver flechas).

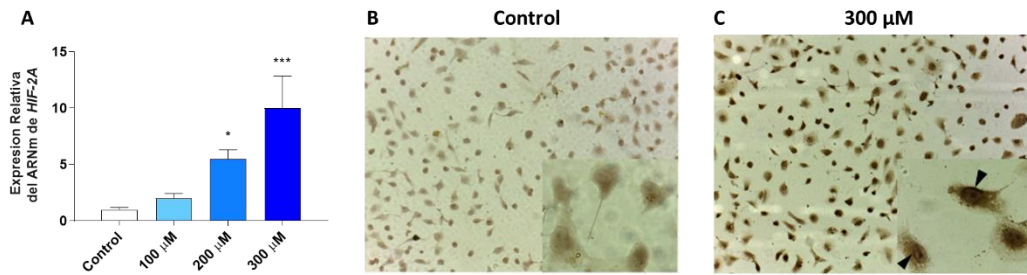


Figura 5.41. Expresión de HIF-2A en células CAKI-2 en condiciones de hipoxia química. (A) Variaciones significativas en la expresión del ARNm de HIF-2A son observadas a partir de 200 μM de CoCl₂. (B) Las células controles exhiben un patrón de inmunomarcación citoplasmática débil y homogénea. (C) Las células tratadas con CoCl₂ 300 μM revelaron marcación perinuclear o nuclear (flechas negras). Aumento 100x (cuadrantes inferiores derechos 400x). Los cultivos celulares y los ensayos se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de One-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media ± SEM. * p < 0,05, *** p < 0,001.

Confirmado que mediante la utilización de CoCl₂ se obtiene un microambiente hipoxico, se evaluó la expresión de MRP4 en las mismas condiciones antes mencionadas. Se encontró un aumento de la expresión relativa del ARNm de MRP4 dependiente de la concentración de CoCl₂. Particularmente con 300 μM CoCl₂, se detectó un aumento de 10 veces la expresión de MRP4 (Figura 5.42).

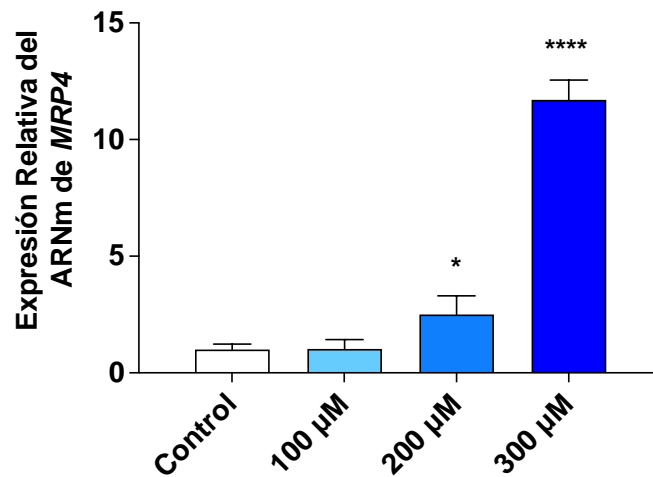


Figura 5.42. Expresión del ARNm de MRP4 medida en condiciones de normoxia e hipoxia química. Obsérvese la sobreexpresión del ARNm de MRP4 en células CAKI-2 expuestas a un microambiente hipoxico. Los cultivos celulares y los ensayos de RT-qPCR se analizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 7 - Análisis de One-way ANOVA, Múltiples comparaciones. Los valores son expresados como la media ± SEM. * p < 0,05, **** p < 0,0001.

CAPITULO 6

DISCUSIÓN

*Estudio del Microambiente Hipóxico y del
Metabolismo Lipídico del Carcinoma Renal de
Células Claras (CRCC)*

6.1. CRCC y el microambiente hipóxico

A pesar de los avances terapéuticos logrados al presente mediante diversos tratamientos, utilizando inhibidores de receptores de tirosin quinasas combinados con inmunoterapias, el cáncer de riñón aun causa aproximadamente cien mil muertes al año en todo el mundo. Debido a esto, es inminente el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas y seguras basadas en los mecanismos que gobiernan esta patología (Combe et al., 2015; Motzer et al., 2019).

En este trabajo, se estudió la proliferación, supervivencia y apoptosis de células de CRCC mediante la evaluación de dos proteínas principales, una enzima desaturasa de retículo endoplasmático conocida como SCD-1, y una bomba de eflujo de membrana celular denominada MRP4. Sin embargo, la expresión/actividad de dichas proteínas, se encuentran reguladas por ciertos factores de influencia directa como HIF-1 α , HIF-2 α , EPO, EPO-R, VEGF, VEGFR-2, AMPc y su microentorno tumoral hipóxico, los cuales cumplen un rol indispensable en los procesos antes mencionados.

Los CRCC se caracterizaron por mostrar macroscópicamente en el centro del tumor abundante contenido lipídico, mientras que en los límites de éste se observó necrosis y/o fibrosis junto con zonas hemorrágicas. Conjuntamente, las muestras tumorales presentaron una cápsula o pseudocápsula bien circunscrita que separaba el tumor de tejido adyacente, en concordancia con lo hallado en bibliografía (Grignon & Che, 2005). Con el fin de abordar estas diferencias en la heterogeneidad del tumor, se desarrolló un análisis separado del core y la periferia tumoral en comparación con el tejido renal adyacente control considerado normal, conforme a otros estudios centrados en CRCC (Ricketts & Linehan, 2014; Saito et al., 2016).

Se sabe que las células tumorales a menudo requieren adaptarse y sobrevivir en condiciones hipóxicas. Los HIFs son importantes mediadores en dicho ajuste, y ellos a su vez controlan genes implicados en el fenotipo y la progresión del tumor (Kaidi et al., 2006; Miyake et al., 2013). Las dos isoformas mejor caracterizadas son HIF-1 α y HIF-2 α . **Los resultados comparativos aquí obtenidos, mostraron sobreexpresión de HIF-1 α y HIF-2 α en la mayoría de las muestras de CRCC y en los ensayos *in vitro* con líneas celulares de CRCC respectivamente.** Aunque la mayoría de sus funciones se superponen, las mismas son controvertidas (Chuang et al., 2008; Y. Zhang et al., 2013). Estudios llevados a cabo por Wiesener et al., evidencian de manera *in vivo* la vinculación entre la regulación positiva de HIF-1 α y la inactivación funcional del gen Von Hippel-Lindeau (VHL) en el CRCC (Wiesener et al., 2001; Kaelin, 2007). Por otro lado, Chuang y colaboradores han descrito sobre el papel de HIF-1 α en la transición epitelial-mesenquimal en células de cáncer renal (Chuang et al., 2008). Es bien sabido que la transición epitelial-mesenquimal es un proceso en el que las células epiteliales polarizadas se convierten en células

mesenquimales móviles por alteraciones en la adhesión, morfología, arquitectura celular y capacidad de migración (Tun et al., 2010).

En un ambiente hipóxico, HIF-1 α activado aumenta la actividad de Snail y Twist, dos factores de transcripciones que reducen la expresión de E-caderina y promueven de esta manera la transición epitelial-mesenquimal; aún más, promueve los procesos de invasión, cambio de fenotipo similar a células madre cancerosas y resistencia a la quimioterapia.

HIF-1 α también puede intervenir en la expresión de enzimas que polimerizan y regular la alineación de las fibras de colágeno y la actividad de integrinas para promover la migración de las células tumorales (Jing et al., 2019).

Por otra parte, los tumores más grandes exhiben mayores condiciones hipóxicas, esto desencadena una mayor expresión de los HIFs y mayor síntesis de VEGF (Rioux-Leclercq et al., 2007). Además, se ha demostrado que la expresión de estas proteínas están involucradas en el crecimiento y agresividad tumoral, así como en la metástasis y progresión del cáncer (Badalian et al., 2007) y, por lo tanto, proporcionan objetivos para terapias antiangiogénicas (Fallah et al., 2019; Orevi et al., 2009; Yang & Chen, 2020; Masoud & Li, 2015).

Se han comunicado resultados contradictorios sobre la importancia de la sobreexpresión de VEGF en relación con el grado nuclear, estadio tumoral y neovascularización en CCR (Paradis et al., 2000; Song et al., 2014; Yoshino et al., 1998). **En el estudio actual, se observó la coexpresión de VEGF y VEGFR-2 en etapas tempranas del CRCC, lo que refuerza la evidencia del fenotipo proangiogénico que adopta dicho cáncer** (Song et al., 2014).

Por otra parte, EPO también se encuentra bajo el control directo de la hipoxia, debido a la unión de HIF-1 α al elemento sensible a la hipoxia del gen EPO (Lappin & Lee, 2019; G. L. Wang & Semenza, 1995). En consecuencia, la sobreexpresión de EPO y EPO-R en células cancerosas podría contribuir a la agresividad tumoral. Sin embargo, la contribución del par EPO/EPO-R a la progresión del cáncer no es completamente entendido debido a que su influencia en los diferentes carcinomas parecen ser bastantes variables (Baltaziak et al., 2013; Liang et al., 2014; Morais et al., 2013; Seibold et al., 2013).

Algunos artículos han comunicado que los CRCC coexpresan consistentemente EPO y EPO-R (Bai et al., 2017; Y. S. Lee et al., 2005) y se ha demostrado que la expresión citoplasmática de EPO en este carcinoma posee una asociación inversa con la supervivencia de los pacientes (Michael et al., 2007). Por otro lado, también se ha informado de la coexpresión de EPO y EPO-R en CRCC sin implicancias en el pronóstico (Papworth et al., 2009). Por lo cual, la importancia clínica de todos estos hallazgos en el tiempo presente es controvertido.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron una fuerte sobreexpresión de HIF-1 α , EPO y EPO-R en CRCC en concordancia con los hallazgos de Papworth et al., 2009. Sin embargo, cuando la expresión de EPO se relacionó con la etapa TNM y los grados nucleares en muestras de CRCC, una fuerte diferencia significativa se observó en el grupo de etapa inicial (T1G1). Estos resultados son diferentes de los reportados por los mencionados autores, quienes hallaron mayor expresión de EPO en las etapas superiores de los tumores (III – IV). Por lo tanto, se hipotetizó que la sobreexpresión de EPO en etapas primarias del tumor podría ser esencial para desencadenar la proliferación celular.

Por otra parte, una característica metabólica universal de las células tumorales en división es un aumento de la actividad de la vía lipogénica como consecuencia de enormes demandas de lípidos necesarios para la síntesis de membranas biológicas, reservas energéticas, transducción de señales, entre otros. Numerosas observaciones han demostrado que esta demanda se satisface con un aumento de la biosíntesis de los lípidos *de novo*. Por lo tanto, el proceso de síntesis de lípidos en sí puede contribuir al fenotipo tumorigénico (Peck & Schulze, 2016; Santos & Schulze, 2012). Diversas enzimas (como por ejemplo acetil-CoA acetiltransferasa; ATP citrato liasa; acil-CoA sintetasa, esteroil-CoA desaturasa, entre otras) que participan en la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol son reguladas por las proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (SREBPs), y algunas de ellas muestran sobreexpresión en diferentes tipos de cáncer. SCD-1, un objetivo de las SREBPs ha sido observado sobreexpresado en varios tipos de tumores (Angelucci et al., 2015; D Hess & Igal, 2011). Von Roemeling y colaboradores han demostrado que la sobreexpresión de SCD-1 acrecienta la viabilidad y progresión del CRCC; por lo que ellos han propuesto a SCD-1 como un nuevo objetivo terapéutico (Christina A. Von Roemeling et al., 2013). **Los resultados informados en este trabajo mostraron un aumento de SCD-1 en CRCC tanto a nivel del ARNm como de la proteína**, y dicho aumento mostró cambios notables según el tamaño del tumor y el grado nuclear Fuhrman. **Por otra parte, también se observó una correlación positiva entre SCD-1 y HIF-1 α , así como entre SCD-1 y Ki-67.** Estos resultados concuerdan con los hallados en carcinoma colorrectal por Valli et al., quienes concluyen que tanto la expresión como la actividad de la enzima SCD-1 se encuentran regulados por HIF-1 α (Valli et al., 2014). En tanto Kelin She et al., demostraron sobreexpresión de SCD-1 en carcinoma de pulmón en líneas celulares humanas (A549) y en un modelo *in vivo* murino; así también determinaron correspondencia entre la expresión de SCD-1, el grado de proliferación celular (medido por el índice Ki-67) y la resistencia a la terapia antitumoral (She et al., 2019). Estos resultados intentan demostrar la implicancia del microambiente hipóxico tumoral en la regulación de enzimas clave necesarias para la proliferación celular descontrolada.

Estos nuevos datos, obtenidos en medición simultánea de ligandos y receptores implicados en la hipoxia tumoral, complementan la información bibliográfica hasta ahora disponible, donde se propone la inhibición de la enzima SCD-1 como una potencial estrategia terapéutica para detener la proliferación celular del CRCC (Christina A. Von Roemeling et al., 2013).

6.2. SCD-1 es una enzima clave para la señalización celular lipídica en CRCC

Previamente se ha observado que las enzimas implicadas en las rutas de biosíntesis de ácidos grasos son esenciales para el crecimiento y supervivencia de las células cancerosas. Actualmente se las estudian como posibles dianas con fines terapéuticos (Currie et al., 2013). Entre ellos, se demostró que SCD-1 es un regulador clave del equilibrio MUFA/SFA en varios tipos de tumores, y su bloqueo desencadena apoptosis celular (Mason et al., 2012; Minville-Walz et al., 2010).

El análisis de las muestras renales determinó un elevado contenido de lípidos en el core tumoral, el cual se mostró como un patrón constante. Al desarrollar un estudio más amplio de lipidómica no dirigida, se determinó que estos tumores poseen grandes acumulaciones de CE y TAG (Figura 5.11), resultados que se encuentran en consonancia con la bibliografía analizada (Saito et al., 2016). Este desequilibrio en el balance lipídico está asociado con las condiciones particulares que adoptan las células tumorales, para adecuar su metabolismo a un crecimiento sin control y continuo (Beloribi-Djefafia et al., 2016; Hanahan & Weinberg, 2011). Por lo tanto, en este trabajo de tesis se analizó los niveles de ácidos grasos en los PLs y los lípidos neutros (TAG y CE). Los resultados obtenidos mediante ensayos lipidómicos demostraron que el perfil de ácidos grasos en la fracción de PLs no manifestó marcadas diferencias cuando el control se comparó con las secciones tumorales: core y periferia. Ambas secciones (normal y tumoral) poseían tipos y cantidades de ácidos grasos similares, con la excepción del ácido oleico (18:1n-9) y ácido araquidónico (20:4n-6), los cuales se incrementaron en el core tumoral. Sin embargo, la distribución de ácidos grasos en las fracciones de TAG y CE en la región tumoral, mostraron sensibles cambios respecto al control, pero principalmente una mayor cuantía de lípidos en el core tumoral (Figura 5.11). **El ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0) y en particular 18:1n-9, aumentaron considerablemente en el core tumoral en comparación con la periferia o el tejido normal en las fracciones correspondientes a los lípidos neutros.**

Informes anteriores han demostrado que la inhibición farmacológica de SCD-1 induce la apoptosis celular y, por lo tanto, podría ser un objetivo terapéutico atractivo en el tratamiento del cáncer (Daniel Hess et al., 2010; Christina A. Von Roemeling et al., 2013). Sin embargo, no hay informes que muestren los cambios lipidómicos que causa esta inhibición en CRCC. En este trabajo mediante ensayos *in vitro* de inhibición enzimática con células CAKI-2, se halló un

aumento significativo del ácido esteárico y la consiguiente disminución del 18:1n-9, consecuencias atribuibles a la neutralización de la actividad de la enzima desaturasa en estudio (Figura 5.13). También se observó que tiempos más prolongados (24 horas) de exposición al inhibidor enzimático (CAY 10566, 3 μ M), generaron reducciones drásticas en la viabilidad celular. El papel esencial de SCD-1 en la mitogénesis de células cancerosas, fue demostrado por varios trabajos en los que la supresión de dicha enzima por medios genéticos y/o farmacológicos condujo a una tasa más lenta de proliferación celular y disminución de la supervivencia (Christina A. Von Roemeling et al., 2013). **En este estudio, se determinó que la tasa de inhibición de la viabilidad en las células CAKI-2 tratadas con CAY 10566 estaba fuertemente correlacionada con el grado de inactivación de SCD-1, estableciendo así una relación positiva entre la tasa de síntesis de MUFAs y la replicación celular, y como ya se mencionó anteriormente se vuelve a verificar la relación existente entre Ki-67 y SCD-1.** Por esta razón, tras iniciar la inhibición de la enzima, en diferentes momentos se restauró el 18:1n-9 en los cultivos celulares y se observó modificaciones en la viabilidad celular, en comparación con las células tratadas únicamente con CAY 10566. Tomando en conjunto, el perfil lipídico y los experimentos de viabilidad celular, se concluyó que **los cambios en los niveles de 18:1n-9 son críticos para estas células tumorales.** Simultáneamente, se ha observado que el contenido en exceso de ácidos grasos de cadena larga, especialmente los SFA, desencadena la muerte celular programada en un proceso conocido como toxicidad mediada por lípidos o lipoapoptosis (Schaffer, 2003). Por lo tanto, estos dos efectos (aumento de SFA y disminución de 18:1n-9, causada por la inhibición de SCD-1) evidentemente sinergizan y explican la citotoxicidad observada por inhibición farmacológica a largo plazo.

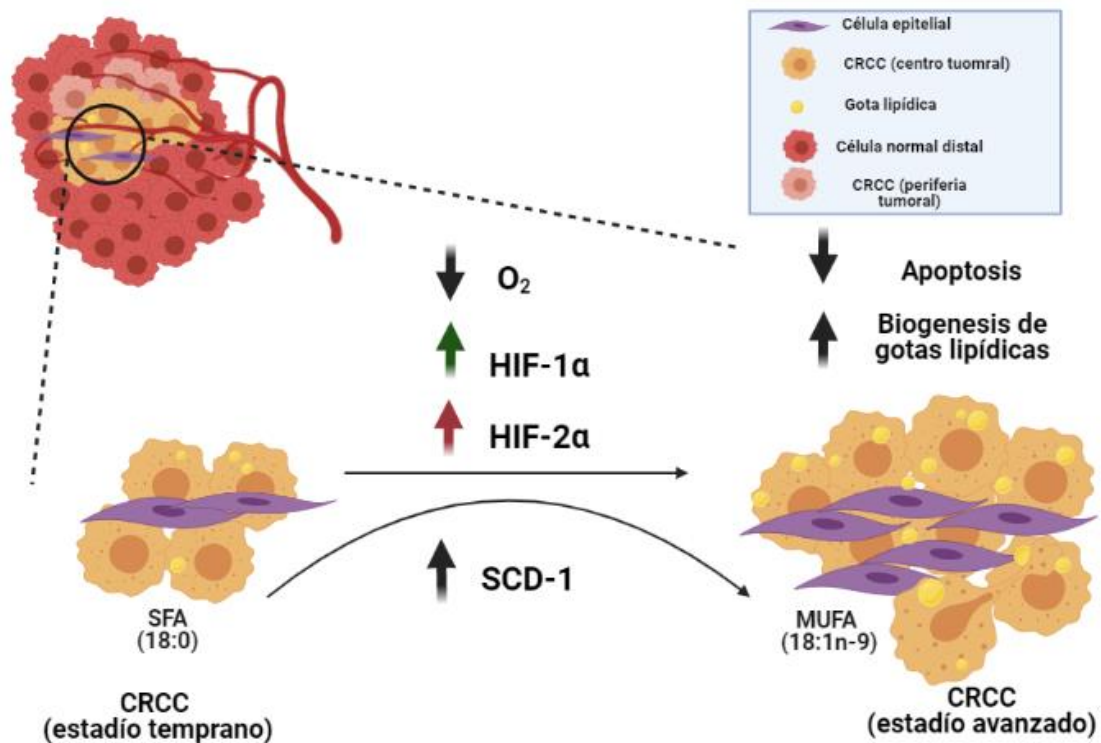
Por otro lado, y como ya se ha mencionado, se ha informado que los HIFs cumplen un rol crucial en la modulación de respuestas hipóxicas celulares, al verse alterado el metabolismo celular, que incluye modificaciones en la expresión génica de elementos asociados al metabolismo glucídico y lipídico, promoviendo así la progresión tumoral (Beloribi-Djefafli et al., 2016; Fujisue et al., 2013). Se ha demostrado que la hipoxia estimula la expresión de SCD-1 y la proliferación en células madre mesenquimales humanas y en CRCC (H. J. Lee et al., 2015; Y. Zhang et al., 2013). **En este estudio, luego de someter a la línea celular CAKI-2 a un proceso de hipoxia química *in vitro*, se determinó una sobreexpresión de la enzima SCD-1** (200 veces; dosis dependiente de CoCl_2), imitando de esta manera las condiciones microambientales del core tumoral (Chanmee et al., 2014). En este sentido, aunque existen evidencias de que SCD-1 puede ser modulada por mecanismos postranscripcionales que involucran vías dependientes e independientes de ubiquitina-proteasoma (Kato et al., 2006), los niveles de SCD-1 de mamíferos parecen estar determinados principalmente por su tasa de transcripción (Igal, 2010).

La adaptación al estrés hipóxico es fundamental en la progresión y malignidad tumoral (Arvelo & Cotte, 2009; Khouzama; et al., 2020; Muz et al., 2015). Dado que la hipoxia celular generó aumentos en la producción de 18:1n-9, en consecuencia, las células CAKI-2 mostraron una biogénesis de LD crecientes, y esto se encontró en línea con la dosis de CoCl_2 utilizada. Además, se utilizó una sobrecarga de 18:1n-9 en las mismas células, para demostrar simultáneamente que el aumento de 18:1n-9 es responsable de la amplificación en el número de LD. La acumulación de LD citoplasmáticos, es un claro signo de adaptación al estrés celular. Por lo tanto, la lipotoxicidad que implica el aumento de la síntesis de lípidos se neutraliza (o al menos en parte) con la producción de estos orgánulos (Koeberle et al., 2012; Qin et al., 2020).

A diferencia de otros orgánulos, la biogénesis y la degradación de LD deben analizarse en el contexto de la síntesis y la renovación de sus componentes principales: **los lípidos neutros**. Su síntesis está impulsada por la disponibilidad de precursores como TAG y CE (Grignon & Che, 2005; Ricketts & Linehan, 2014). Por lo tanto, luego se realizó un análisis lipídomico usando GC/MS para determinar los niveles de ácidos grasos en los PL y los lípidos neutros. En la fracción de PL, se observaron importantes disminuciones en los SFA 16:0 y 18:0, lo cual concuerda con el incremento de la expresión de SCD-1. Sin embargo, no se observó cambios en los niveles de 18:1n-9 en esta fracción. Por el contrario, los aumentos de 18:1n-9 se observaron en lípidos neutros, principalmente en los CE. Dado que estas disminuciones en los SFA no están relacionadas cuantitativamente con el 18:1n-9 recién formado por la catálisis de SCD-1, la mayor parte del 18:1n-9 debe redirigirse a la oxidación mitocondrial (Tamura et al., 2019) o, más probablemente (dado el contexto hipóxico), liberarse al espacio extracelular. Por lo tanto, todos los tipos de carcinomas que sobreexpresan esta enzima muestran altas tasas de proliferación celular, y esto solo puede hacerse en contextos celulares con alta producción de energía metabólica (Hess et al., 2010; Igal, 2010; Mason et al., 2012; Noto et al., 2013; Roongta et al., 2011; Scaglia et al., 2009).

Los hallazgos aquí descritos apoyan el concepto de que SCD-1 puede ser un objetivo potencialmente útil para el desarrollo de futuros tratamientos del CRCC (Von Roemeling et al., 2013)(Peck et al., 2016) centrados en el diseño específico de inhibidores de la actividad catalítica de esta enzima (Imamura et al., 2017). Asimismo, la asociación de inhibidores de SCD-1 con agentes terapéuticos dirigidos a las vías de señalización y sus receptores (es decir, cascadas mediadas por tirosina quinasa, como pazopanib, sunitinib, axitinib y cabozantinib, o temsirolimus, que se dirige a mTOR, entre otros) que ya se encuentran en uso en oncología médica, también podría ser una opción atractiva de futura implementación (Motzer et al., 2019). A pesar de estas consideraciones hipotéticas, establecer el valor de los inhibidores de SCD-1

como agente protector para el tratamiento de CRCC requerirá pruebas experimentales más extensas y una validación preclínica cuidadosa.



6.3. MRP4 es un transportador que regula el balance de AMPc y está implicado en la proliferación celular en CRCC

Desde hace mucho tiempo se tiene conocimiento, de que uno de los mecanismos de resistencia adquirido por los tumores se basa en la existencia de proteínas de transporte dependientes de la hidrólisis de ATP encargada de la extrusión de quimioterapéuticos (Li et al., 2017; Y.-K. Zhang et al., 2015). Entre ellos, se ha descrito a la proteína MRP4 como responsable (o al menos en parte) de la quimioresistencia o como factor esencial para la proliferación celular en muchos tumores, como por ejemplo, páncreas (Z. Zhang et al., 2012), neuroblastoma (Huynh et al., 2012), leucemia mieloide aguda (Copsel et al., 2011b), pulmón (Zhao et al., 2014), ovario (Bagnoli et al., 2013), esófago (Sun et al., 2014), vesícula biliar (Ituarte et al., 2019), colon (Holla et al., 2008; Wang et al., 2015); así también se lo ha postulado como un marcador pronóstico debido a su sobreexpresión en comparación a los tejidos normales donde la expresión es muy débil (Bagnoli et al., 2013; Morrissey et al., 2013).

Mientras que otros MRP se han informado aumentados en diferentes tipos de tumores, en este trabajo, se informa por primera vez, que MRP4 se sobreexpresa en CRCC.

Así, utilizando algoritmos de búsqueda en plataformas virtuales, se desarrolló un análisis *in silico* de la expresión del ARNm de dos transportadores con sentido opuestos de bombeo: MRP4 y OATP4C1 (Morrissey et al., 2013). Como se muestra en los resultados obtenidos, la combinación de la sobreexpresión de MRP4 y la regulación a la baja de OATP4C1 muestra el escenario ideal para proponer MRP4 como posible objetivo de acción farmacológica. **En este estudio, se encontró que todos los CRCC sobreexpresaron MRP4.** Esto es muy llamativo y distinguible, ya que los tejidos renales normales presentan niveles bajos de expresión de MRP4.

Un estudio proteómico de transportadores funcionales en la corteza renal sana, determinó niveles de expresiones muy bajas para MRP4 (menos a 1 pg/mg de proteína) (Prasad et al., 2016), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por inmunoblotting en este trabajo.

Por tanto, la expresión de MRP4 observada aquí es comparable a las informadas en tumores de páncreas (Carozzo et al., 2019; Z. Zhang et al., 2012), colon (Holla et al., 2008), osteosarcoma (Lin et al., 2015), y se considera sobreexpresado en comparación con ciertas leucemias (Oevermann et al., 2009).

El análisis por secciones (core tumoral, periferia tumoral y tejido renal adyacente) de la expresión/localización de MRP4, **demostró una marcada heterogeneidad de expresión de este transportador en los tejidos tumorales**, algo ya descrito para MRP4 en tumores de próstata (Montani et al., 2013).

Dadas las posibles implicancias terapéuticas que se han descrito para MRP4 en otros carcinomas, y con el fin de desarrollar algunas pruebas funcionales, se estudió a MRP4 en líneas celulares, para validar un modelo de análisis *in vitro* de este transportador.

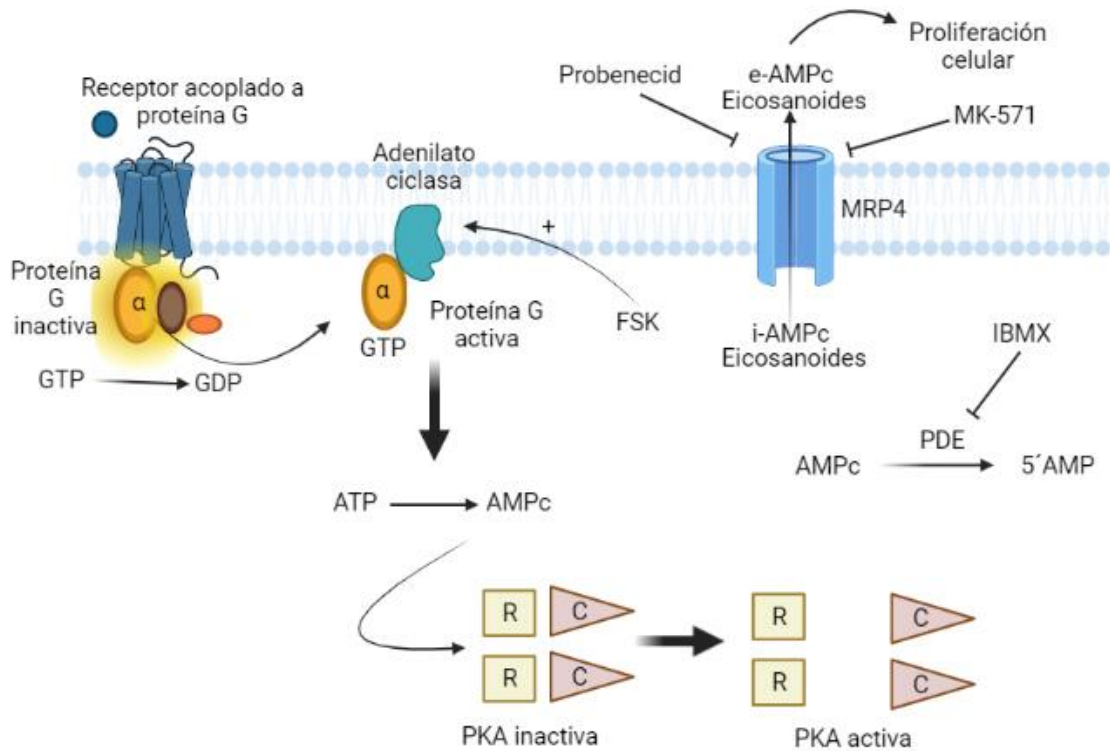
Como se mencionó anteriormente, primero se utilizaron dos líneas celulares con diferentes grados de diferenciación, CAKI-1 obtenida de una metástasis cutánea de carcinoma renal (bien diferenciado) (Glube et al., 2007), y la línea celular CAKI-2, proveniente de un CRCC (menos diferenciado) (Myszcyszyn et al., 2015; Peng et al., 2016). Así, en línea con lo observado por Carozzo y colaboradores, quienes analizaron la correlación entre el grado de diferenciación y la expresión de MRP4 en tres líneas celulares de cáncer de páncreas (Carozzo et al., 2019), se observó que **los niveles de MRP4 en CAKI-2 fueron ligeramente más altos que los de CAKI-1 tanto a nivel transcripcional (expresión del ARNm) como traduccional (expresión proteica)**. De manera similar se observó la misma tendencia en leucemias (Copsel et al., 2011a; Oevermann et al., 2009) y linfomas (X. Zhang et al., 2015), donde la malignidad y el grado de dediferenciación están notablemente relacionados.

Dado que ambas líneas CAKI expresaron MRP4, a continuación, se evaluó sus facultades funcionales para extruir AMPc en cultivos *in vitro*. Como se esperaba (por asociación a su baja diferenciación), CAKI-2 mostró una mayor capacidad de extrusión de AMPc (aproximadamente 30%), confirmando de esta manera que dicha línea celular presenta realmente mayor expresión del transportador MRP4.

Adicionalmente, se confirmó la implicancia de MRP4 en el proceso de extrusión de AMPc, utilizando inhibidores farmacológicos selectivos del transportador en estudio. Por lo tanto, se revalidó el papel que posee MRP4 para modular los niveles de AMPc tanto en los compartimentos intracelulares como extracelulares. En base a estos hallazgos, y como se muestran en los resultados obtenidos por XTT, **CAKI-2 posee una tasa de proliferación superior a CAKI-1**. Estos datos también confirmaron que, en carcinomas renales, una mayor expresión de MRP4 se asocia con una mayor tasa de duplicación y, en consecuencia, mayor malignidad.

Diferentes estudios demostraron que MRP4, MRP5 y MRP8 inducen la extrusión de nucleótidos cíclicos en varios tipos celulares; sin embargo, MRP4 emergió como el principal transportador de AMPc (Russel et al., 2008). En este sentido, Copsel y colaboradores, caracterizaron aún más el flujo de extrusión de AMPc por MRP4, en células humanas de leucemia mieloide, verificando el efecto del bloqueo farmacológico de la proliferación celular y la diferenciación a un fenotipo no neoplásico (Copsel et al., 2011a). Basado en ello, se utilizó el mismo modelo de inhibición farmacológica para modular la vía del AMPc en el CRCC. En efecto, ambos inhibidores, Probenecid y MK-571, fueron efectivos al aumentar la concentración del AMPc intracelular o reduciendo el AMPc extracelular, y por lo tanto, disminuyendo la proliferación de las células CAKI-2. Este modelo farmacológico de inhibición fue verificado también en otros tipos de carcinomas, y más aún, este transportador fue silenciado (mediante la utilización de ARN de interferencias) dando lugar a resultados equivalentes (Carozzo et al., 2019).

Así, los resultados obtenidos en este trabajo, en conjunto con datos bibliográficos, apoyan la hipótesis que el AMPc extracelular induce proliferación celular, mientras que, por otra parte, los incrementos descontrolados del AMPc intracelular inducen estrés y apoptosis celular. A partir de estos datos, se pudo asumir que, similar a lo observado en leucemia mieloide y carcinoma de páncreas, el AMPc cumple un doble rol en CRCC en función de su compartimentalización (extracelular o intracelular).



Se ha reportado que las células CAKI-2, presentan microvellosidades y microfilamentos con pocas mitocondrias y abundantes LD (Jorgen et al., 1977). Previamente se mencionó que una característica notable del fenotipo del CRCC es su alto contenido en lípidos (Grignon & Che, 2005), con características lipidómicas específicas (Saito et al., 2016). En consonancia con información bibliográfica, las líneas celulares que lo representan también exhiben estos orgánulos llenos de lípidos.

Los LD se originan por diversas causas, en diferentes condiciones, pero sin dudas, el estrés celular o un desequilibrio en el metabolismo de los lípidos, son señales básicas y patognomónicas que desencadenan la biogénesis de estos orgánulos. Se cree que los ácidos grasos que conforman los LD pueden funcionar como protectores contra factores estresantes (Guijas et al., 2014; Lee et al., 2013).

La combinación de fármacos utilizados en este trabajo, para lograr la inhibición de MRP4 (FSK + inhibidores) indujo notables cambios morfológicos celulares, visibles con microscopía óptica en las primeras horas de exposición. Un análisis más detallado de las células en las condiciones descritas, utilizando citometría de flujo y microscopía confocal, confirmó la biogénesis de LD. Adicionalmente, se realizó un análisis del contenido de ácidos grasos en los LD. Como se muestra en los resultados obtenidos (Figura 5.34), las células tratadas solo con FSK experimentaron un marcado adelgazamiento y mostraron una cuantía mucho menor en el número de LD en

comparación con las células control (datos no mostrados). Aunque hubo una aparente disminución de 16:0, 18:0 y 18:1, no hubo variaciones estadísticas significativas (Figura 5.36). Algo similar ocurrió con la disminución de tamaño en los LD cuando la línea celular de adipocitos 3T3-L1 fue estimulada con FSK (Paar et al., 2012). Cuando las células fueron tratadas con la combinación de FSK + MK-571 (Figura 5.34), se observaron cambios morfológicos similares (estiramiento y adelgazamiento celular) a los tratados únicamente con FSK. Sin embargo, aumentos significativos de 16:0 y 18:0 se detectaron en las fracciones de TAG y CE en estas células (Figura 5.36), lo que demuestra que, la inhibición de la función de MRP4 es el fundamento de las modificaciones en la composición de los lípidos celulares.

Primero se pensó, que en consonancia a lo que se halló para otras líneas celulares (por ejemplo, leucemia mieloide), estas condiciones experimentales tenderían a inducir una diferenciación celular hacia un fenotipo no neoplásico similar a los adipocitos (Fajardo et al., 2014; Shayo et al., 2004). Sin embargo, se observó que los tiempos de exposición prolongados a la combinación FSK + MK-571, indujeron apoptosis.

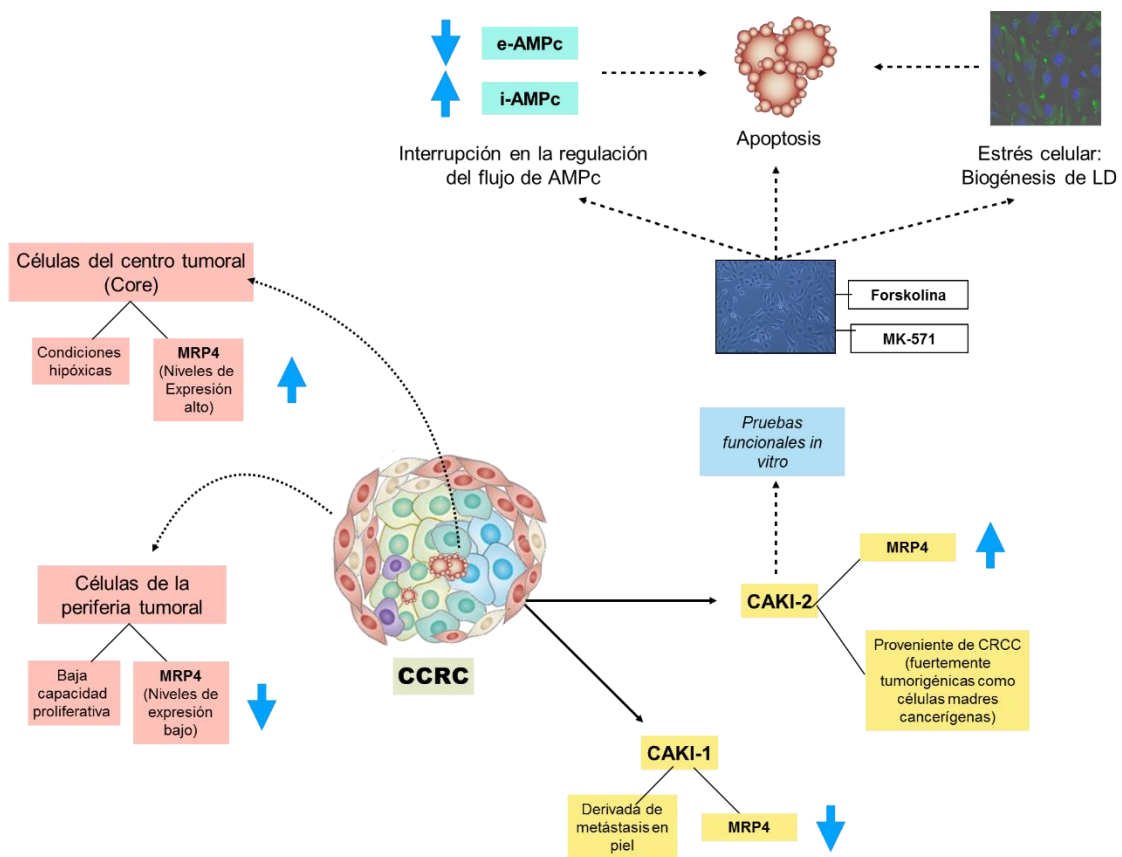
Aunque la idea de la transdiferenciación celular a un fenotipo adipogénico es una opción de investigación atractiva, existen controversias sobre la misma. Varios estudios han demostrado que las células tumorales reactivan la síntesis de lípidos *de novo* (Santos & Schulze, 2012b) y en particular, Saito y colaboradores demostraron claramente mediante un enfoque lipídico no dirigido, que los TAG y CE se acumulan en CRCC (Saito et al., 2016). Sin embargo, los datos empíricos de este trabajo muestran que, cuando este aumento en la biosíntesis de lípidos se logra en combinación con el bloqueo de MRP4, las células detienen su proliferación y desencadenan apoptosis celular. Por tanto, queda por determinar si el aumento de la síntesis de lípidos en estas células tumorales es positivo o no.

Otro punto clave que entrelaza y rige muchos aspectos importantes en los procesos metabólicos esenciales en las células tumorales es la hipoxia. Previamente se describió la relación entre proliferación, supervivencia y apoptosis con la expresión de moléculas claves relacionadas con la hipoxia tumoral en CRCC: HIF-1 α , EPO, EPO-R, VEGF, VEGFR-2 (Stoyanoff et al., 2016). Además, en este trabajo también se demostró que MRP4 está regulado positivamente en estos tumores. Por lo tanto, se investigó la existencia de alguna relación directa entre ambos fenómenos (hipoxia y expresión de MRP4), con el fin de tener en conocimiento si la función de MRP4 también se encontraba asociada con el fenotipo de este tumor. Se demostró así que, utilizando el modelo de hipoxia química establecido, MRP4 exhibió un aumento significativo en su expresión. Aunque este es un dato novedoso para CRCC, se encuentra perfectamente en

coherencia con los datos anteriores obtenidos, ya que: a) se observó una expresión diferencial de MRP4 en core y periferia tumoral en CRCC; b) la existencia de una expresión aumentada de marcadores de hipoxia en el core tumoral; c) las células tumorales exhibieron una capacidad proliferativa aumentada bajo condiciones hipóxicas; y d) se observó mayor expresión de MRP4 en la línea celular CAKi-2, células con mayor capacidad proliferativa.

Aunque estos resultados son preliminares y por lo tanto experimentos adicionales son requeridos para determinar el mecanismo de activación de la síntesis de MRP4, estos hallazgos podrían indicar puntos claves regulados por la hipoxia que modulan la expresión de MRP4 y, en consecuencia, los niveles de AMPc.

Con todos los datos exhibidos aquí, se presenta evidencia directa de que la proteína transportadora MRP4 es un marcador diferencial en CRCC, quien se encuentra involucrado en la vía de señalización del AMPc y, por lo tanto, podría ser un nuevo blanco de acción farmacológico, para ser empleado en estrategias terapéuticas en el tratamiento del CRCC.



CAPITULO 7

CONCLUSIONES

*Estudio del Microambiente Hipóxico y del
Metabolismo Lipídico del Carcinoma Renal de
Células Claras (CRCC)*

En base a los objetivos planteados y los resultados alcanzados en este trabajo de tesis, se concluye que:

1. Los tumores provenientes de nefrectomías de pacientes con CRCC, mostraron una fuerte expresión de marcadores de hipoxia como: HIF-1 α , EPO, EPO-R, VEGF y VEGFR-2.
2. La expresión de la enzima SCD-1 muestra una correlación estadística directa con el factor de transcripción de hipoxia HIF-1 α y el marcador de proliferación Ki-67 en los diferentes estadios y grados tumorales.
3. La composición lipídica del CRCC es dependiente de la sección tumoral analizada (microheterogeneidad: core y periferia) y del microambiente hipóxico.
4. SCD-1 se sobreexpresa en CRCC y se encuentra particularmente influenciada por la hipoxia. Su neutralización farmacológica en modelos *in vitro* compromete la proliferación de células tumorales.
5. MRP4 se sobreexpresa en muestras de tejido neoplásico de pacientes con CRCC.
6. MRP4 es un modulador del balance i-AMPc/e-AMPc y su inhibición farmacológica induce cambios fenotípicos, inhibe la proliferación de células CAKI-2 y finalmente desencadena la muerte celular por apoptosis.
7. Tanto SCD-1 como MRP4 constituyen potenciales blancos terapéuticos explotables para el desarrollo de futuros tratamientos en el CRCC, así como también biomarcadores de diagnóstico o de pronóstico de esta afección maligna.

CAPITULO 8

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*Estudio del Microambiente Hipóxico y del
Metabolismo Lipídico del Carcinoma Renal de
Células Claras (CRCC)*

BIBLIOGRAFIA

- Abu, E. O., & Oluwatowaju, I. (2009). Omega-3 index determined by gas chromatography with electron impact mass spectrometry. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 80(4), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.03.001>
- Angelucci, C., Maulucci, G., Colabianchi, A., Iacopino, F., D’Alessio, A., Maiorana, A., Palmieri, V., Papi, M., De Spirito, M., Di Leone, A., Masetti, R., & Sica, G. (2015). Stearoyl-CoA desaturase 1 and paracrine diffusible signals have a major role in the promotion of breast cancer cell migration induced by cancer-associated fibroblasts. *Br J Cancer*, 112(10), 1675–1686. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.135>
- Arvelo, F., & Cotte, C. (2009). Hipoxia en la malignidad del cáncer. Revisión. *Investigacion Clinica*, 50(4), 529–546.
- Badalian, G., Derecskei, K., Szendroi, A., Szendroi, M., & Timar, J. (2007). EGFR and VEGFR2 protein expressions in bone metastases of clear cell renal cancer. *Anticancer Res*, 27(2), 889–894. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17465216>
- Bagnoli, M., Beretta, G. L., Gatti, L., Pilotti, S., Alberti, P., Tarantino, E., Barbareschi, M., Canevari, S., Mezzanzanica, D., & Perego, P. (2013). Clinicopathological impact of ABCC1/MRP1 and ABCC4/MRP4 in epithelial ovarian carcinoma. *BioMed Research International*, 2013, 143202. <https://doi.org/10.1155/2013/143202>
- Bai, T., Wang, D., & Yang, X. (2017). Role of hypoxia-inducible factor in clear cell renal cell carcinoma and its application in targeted therapy. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10(7), 9909–9917.
- Baltaziak, M., Wincewicz, A., Kanczuga-Koda, L., Lotowska, J. M., Koda, M., Sulkowska, U., Baltaziak, M., Podbielski, M., Sobaniec-Lotowska, M. E., & Sulkowski, S. (2013). The relationships between hypoxia-dependent markers: HIF-1alpha, EPO and EPOR in colorectal cancer. *Folia Histochemica et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 51(4), 320–325. <https://doi.org/10.5603/FHC.2013.0043>
- Bao, M. H. R., & Wong, C. C. L. (2021). Hypoxia, metabolic reprogramming, and drug resistance in liver cancer. *Cells*, 10(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/cells10071715>
- Bar-Shavit, R., Maoz, M., Kancharla, A., Nag, J. K., Agranovich, D., Grisaru-Granovsky, S., & Uziely,

- B. (2016). G protein-coupled receptors in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms17081320>
- Barrett, T., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., Tomashevsky, M., Marshall, K. A., Phillippy, K. H., Sherman, P. M., Holko, M., Yefanov, A., Lee, H., Zhang, N., Robertson, C. L., Serova, N., Davis, S., & Soboleva, A. (2013). NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets - Update. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 991–995. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1193>
- Beavo, J. A. (2002). Cyclic nucleotide research — still expanding after half a century. *Molecular Cell Biology*, 3(September), 710–718.
- Beloribi-Djefaflija, S., Vasseur, S., & Guillaumond, F. (2016). Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*, 5(1), e189. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.49>
- Benson, J. D., Chen, Y. N. P., Cornell-Kennon, S. A., Dorsch, M., Kim, S., Leszczyniecka, M., Sellers, W. R., & Lengauer, C. (2006). Validating cancer drug targets. *Nature*, 441(7092), 451–456. <https://doi.org/10.1038/nature04873>
- Bielecka, Z. F., Czarnecka, A. M., Solarek, W., Kornakiewicz, A., & Szczylik, C. (2014). Mechanisms of Acquired Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Clear - Cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC). *Curr Signal Transduct Ther*, 8(3), 218–228. <https://doi.org/10.2174/1574362409666140206223014>
- Bligh, E.G. and Dyer, W. J. (1959). A Rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., & Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: The multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(16), 1295–1302. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.16.1295>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Breckler, M., Berthouze, M., Laurent, A. C., Crozatier, B., Morel, E., & Lezoualc’h, F. (2011). Rap- linked cAMP signaling Epac proteins: Compartmentation, functioning and disease implications. *Cellular Signalling*, 23(8), 1257–1266. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.03.007>

- Bröderdorf, S., Zang, S., Schaletzki, Y., Grube, M., Kroemer, H. K., & Jedlitschky, G. (2014). cAMP regulates expression of the cyclic nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) through the EPAC pathway. *Pharmacogenetics and Genomics*, 24(10), 522–526. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000084>
- Buxhofer-Ausch, V., Secky, L., Wlcek, K., Svoboda, M., Kounnis, V., Briasoulis, E., Tzakos, A. G., Jaeger, W., & Thalhammer, T. (2013). Tumor-Specific Expression of Organic Anion-Transporting Polypeptides: Transporters as Novel Targets for Cancer Therapy. *Journal of Drug Delivery*, 2013(Figure 1), 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/863539>
- Carozzo, A., Diez, F., Gomez, N., Cabrera, M., Shayo, C., Davio, C., & Fernández, N. (2015). Dual role of cAMP in the transcriptional regulation of Multidrug Resistance-Associated Protein 4 (MRP4) in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *PLoS ONE*, 10(3), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120651>
- Carozzo, A., Yaneff, A., Gomez, N., Di Siervi, N., Sahores, A., Diez, F., Attorresi, A. I., Rodriguez-Gonzalez, A., Monczor, F., Fernandez, N., Abba, M., Shayo, C., & Davio, C. (2019). Identification of MRP4/ABCC4 as a target for reducing the proliferation of pancreatic ductal adenocarcinoma cells by modulating the cAMP efflux. *Molecular Pharmacology*, 13–25. <https://doi.org/10.1124/mol.118.115444>
- Carrillo, C., Cavia, M. D. M., & Alonso-Torre, S. R. (2012). Efecto antitumoral del ácido oleico; mecanismos de acción; revisión científica. *Nutricion Hospitalaria*, 27(6), 1860–1865. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6010>
- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., & Itano, N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers*, 6(3), 1670–1690. <https://doi.org/10.3390/cancers6031670>
- Chen, L., Ren, J., Yang, L., Li, Y., Fu, J., Li, Y., Tian, Y., Qiu, F., Liu, Z., & Qiu, Y. (2016). Stearoyl-CoA desaturase-1 mediated cell apoptosis in colorectal cancer by promoting ceramide synthesis. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 19665. <https://doi.org/10.1038/srep19665>
- Chen, X., & Song, E. (2019). Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(2), 99–115. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0004-1>
- Cho-Chung, Y. S., Clair, T., Tortora, G., & Yokozaki, H. (1991). Role of site-selective cAMP analogs in the control and reversal of malignancy. *Pharmacol Ther*, 50(1), 1–33.

- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Christie, W. W. (1998). Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. In *Lipids* (Vol. 33, Issue 4, pp. 343–353). *Lipids*. <https://doi.org/10.1007/s11745-998-0214-x>
- Chuang, M. J., Sun, K. H., Tang, S. J., Deng, M. W., Wu, Y. H., Sung, J. S., Cha, T. L., & Sun, G. H. (2008). Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Science*, *99*(5), 905–913. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00756.x>
- Cokic, B. B. B., Cokic, V. P., Suresh, S., Wirt, S., & Noguchi, C. T. (2014). Nitric oxide and hypoxia stimulate erythropoietin receptor via MAPK kinase in endothelial cells. *Microvascular Research*, *92*, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2014.01.009>
- Colaci, P., Santinelli, F., Baldarena, C., López, G., Mías, F., Inda, A. M., & García, M. (2020). *Tumores renales de células claras : factores pronósticos y supervivencia posoperatoria* *Clear cell renal tumors : prognostic factors and postoperative survival*. *84*(March 2019), 33–40.
- Combe, P., Guillebon, E. De, Thibault, C., Granier, C., & Tartour, E. (2015). *Oncolmmunology Therapeutic vaccines in metastatic renal cell carcinoma*. *April 2015*, 37–41. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2014.1001236>
- Copsel, S., Bruzzone, A., May, M., Beyrath, J., Wargon, V., Cany, J., Russel, F. G. M., Shayo, C., & Davio, C. (2014). Multidrug resistance protein 4/ATP binding cassette transporter 4: a new potential therapeutic target for acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, *5*(19), 9308–9321. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2425>
- Copsel, S., Garcia, C., Diez, F., Vermeulem, M., Baldi, A., Bianciotti, L. G., Russel, F. G. M., Shayo, C., & Davio, C. (2011). Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(9), 6979–6988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.166868>
- Courtney, K. D., Ma, Y., de Leon, A. D., Christie, A., Xie, Z., Woolford, L., Singla, N., Joyce, A., Hill, H., Madhuranthakam, A. J., Yuan, Q., Xi, Y., Zhang, Y., Chang, J., Fatunde, O., Arriaga, Y., Frankel, A. E., Kalva, S., Zhang, S., ... Brugarolas, J. (2020). HIF-2 complex dissociation, target

- inhibition, and acquired resistance with PT2385, a first-in-class HIF-2 inhibitor, in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 26(4), 793–803. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1459>
- Cruz, A. L. S., Barreto, E. de A., Fazolini, N. P. B., Viola, J. P. B., & Bozza, P. T. (2020). Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death and Disease*, 11(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2297-3>
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., & Farese, R. V. (2013). Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metabolism*, 18(2), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.017>
- De Rooij, J., Rehmann, H., Van Triest, M., Cool, R. H., Wittinghofer, A., & Bos, J. L. (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20829–20836. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001113200>
- Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, 42(7), 1007–1017. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)31588-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)31588-1)
- Deeley, R. G., Westlake, C., & Cole, S. P. C. (2006). Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiological Reviews*, 86(3), 849–899. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2005>
- Deniz, F., Dilek, K., Hande, M., Umit, U. M., & Handan, K. (2015). Ki-67 and caspase expression in breast carcinoma: Does variance in locational sampling exist? *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 11305–11313.
- Dill, A. L., Eberlin, L. S., Zheng, C., Costa, A. B., Iba, D. R., Cheng, L., Masterson, T. A., Koch, M. O., Vitek, O., & Cooks, R. G. (2010). Multivariate statistical differentiation of renal cell carcinomas based on lipidomic analysis by ambient ionization imaging mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 398(7–8), 2969–2978. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4259-6>
- Drabkin, H. A., & Gemmill, R. M. (2010). Obesity, cholesterol, and clear-cell renal cell carcinoma (RCC). *Adv Cancer Res*, 107, 39–56. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(10\)07002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(10)07002-8)
- DuBois, D. W. and R. N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*, 10(3), 181–193. <https://doi.org/10.1038/nrc2809>
- Eder, K. (1995). Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 671(1–2), 113–131.

<https://doi.org/10.1016/0378-4347> (95)00142-6

- Elfiky, A. A., Aziz, S. A., Conrad, P. J., Siddiqui, S., Hackl, W., Maira, M., Robert, C. L., & Kluger, H. M. (2011). Characterization and targeting of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal cell cancer. *Journal of Translational Medicine*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-133>
- Fajardo, A. M., Piazza, G. A., & Tinsley, H. N. (2014). The role of cyclic nucleotide signaling pathways in cancer: Targets for prevention and treatment. *Cancers*, 6(1), 436–458. <https://doi.org/10.3390/cancers6010436>
- Fallah, A., Sadeghinia, A., Kahroba, H., Samadi, A., Heidari, H. R., Bradaran, B., Zeinali, S., & Molavi, O. (2019). Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 110(December 2018), 775–785. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.022>
- Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J., & Norris, M. D. (2010). ABC transporters in cancer: More than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer*, 10(2), 147–156. <https://doi.org/10.1038/nrc2789>
- Fraga, A., Ribeiro, R., & Medeiros, R. (2009). Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urológicas Españolas*, 33(9), 941–951. [https://doi.org/10.1016/s0210-4806\(09\)72891-8](https://doi.org/10.1016/s0210-4806(09)72891-8)
- Fu, Y., Zou, T., Shen, X., Nelson, P. J., Li, J., Wu, C., Yang, J., Zheng, Y., Bruns, C., Zhao, Y., Qin, L., & Dong, Q. (2020). Lipid metabolism in cancer progression and therapeutic strategies. *MedComm*, 2(1), 27–59. <https://doi.org/10.1002/mco2.27>
- Fuchs, B., Süß, R., Teuber, K., Eibisch, M., & Schiller, J. (2011). Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 1218, Issue 19, pp. 2754–2774). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.066>
- Fuhrman, S. (1982). *Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma*. 655–663.
- Fujisue, Y., Nakagawa, T., Takahara, K., Inamoto, T., Kiyama, S., Azuma, H., & Asahi, M. (2013). Induction of erythropoietin increases the cell proliferation rate in a hypoxia-inducible factor-1-dependent and -independent manner in renal cell carcinoma cell lines. *Oncology Letters*, 5(6), 1765–1770. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1283>
- Gao, Y., Li, J., Xi, H., Cui, J., Zhang, K., Zhang, J., Zhang, Y., Xu, W., Liang, W., Zhuang, Z., Wang,

- P., Qiao, Z., Wei, B., & Chen, L. (2020). Stearoyl-CoA-desaturase-1 regulates gastric cancer stem-like properties and promotes tumour metastasis via Hippo/YAP pathway. *British Journal of Cancer, March*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0827-5>
- Gerdesi, J., Schwabh, U., Lemke, H., & Stein, H. (1983). PRODUCTION OF A MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY REACTIVE WITH A HUMAN NUCLEAR ANTIGEN ASSOCIATED WITH CELL PROLIFERATION. *Int. J. Cancer, 31*, 13–20. [https://doi.org/10.1016/s0262-1762\(02\)80123-7](https://doi.org/10.1016/s0262-1762(02)80123-7)
- Glube, N. (2007). The potential of the human kidney cell line, Caki-1, as an in vitro screening system for drug interactions with organic cation transporters. *Deposit.Ddb.De*. http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=986306444&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=986306444.pdf
- Grau Patrick Wagner. (2011). El factor HIF-1 inducido por la hipoxia y la sensibilidad al oxígeno. Rol del hierro intracelular. *Acta Med Per, 28(2)*, 163–168.
- Greef, B., & Eisen, T. (2016). Medical treatment of renal cancer: New horizons. *British Journal of Cancer, 115(5)*, 505–516. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.230>
- Grignon, D. J., & Che, M. (2005). Clear cell renal cell carcinoma. *Clinics in Laboratory Medicine, 25(2)*, 305–316. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2005.01.012>
- Guijas, C., Meana, C., Astudillo, A. M., Balboa, M. A., & Balsinde, J. (2016). Foamy Monocytes Are Enriched in cis-7-Hexadecenoic Fatty Acid (16:1n-9), a Possible Biomarker for Early Detection of Cardiovascular Disease. *Cell Chemical Biology, 23(6)*, 689–699. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.04.012>
- Guijas, C., Rodríguez, J. P., Rubio, J. M., Balboa, M. A., & Balsinde, J. (2014). Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1841(12)*, 1661–1671. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.10.004>
- Guštin, E., Jarc, E., Kump, A., & Petan, T. (2017). Lipid droplet formation in hela cervical cancer cells depends on cell density and the concentration of exogenous unsaturated fatty acids. *Acta Chimica Slovenica, 64(3)*, 549–554. <https://doi.org/10.17344/acsi.2016.2908>
- Haase, V. H. (2012). Renal cancer: oxygen meets metabolism. *Exp Cell Res, 318(9)*, 1057–1067. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.026>
- Hamada, S., Horiguchi, A., Asano, T., Kuroda, K., Asakuma, J., Ito, K., Asano, T., Miyai, K., & Iwaya, K. (2014). Prognostic impact of fatty acid synthase expression in upper urinary tract

- urothelial carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*, 44(5), 486–492.
<https://doi.org/10.1093/jjco/hyu020>
- Hamada, S., Horiguchi, A., Kuroda, K., Ito, K., Asano, T., Miyai, K., & Iwaya, K. (2014a). Elevated fatty acid synthase expression in prostate needle biopsy cores predicts upgraded Gleason score in radical prostatectomy specimens. *Prostate*, 74(1), 90–96.
<https://doi.org/10.1002/pros.22732>
- Hamada, S., Horiguchi, A., Kuroda, K., Ito, K., Asano, T., Miyai, K., & Iwaya, K. (2014b). Increased fatty acid synthase expression in prostate biopsy cores predicts higher Gleason score in radical prostatectomy specimen. *BMC Clin Pathol*, 14(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-14-3>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hardee, M. E., Arcasoy, M. O., Blackwell, K. L., Kirkpatrick, J. P., & Dewhirst, M. W. (2006). Erythropoietin biology in cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(2), 332–339.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1771>
- Henderson, M. J., Haber, M., Porro, A., Munoz, M. A., Iraci, N., Xue, C., Murray, J., Flemming, C. L., Smith, J., Fletcher, J. I., Gherardi, S., Kwak, C. K., Russel, A. J., Valli, E., London, W. B., Buxton, A. B., Ashton, L. J., Sartorelli, A. C., Cohn, S. L., ... Norris, M. D. (2011). ABCB multidrug transporters in childhood neuroblastoma: Clinical and biological effects independent of cytotoxic drug efflux. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(16), 1236–1251. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr256>
- Hess, D., & Igal, R. A. (2011). Genistein downregulates de novo lipid synthesis and impairs cell proliferation in human lung cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 236(6), 707–713.
<https://doi.org/10.1258/ebm.2011.010265>
- Hess, Daniel, Chisholm, J. W., & Igal, R. A. (2010). Inhibition of stearoylCoA desaturase activity blocks cell cycle progression and induces programmed cell death in lung cancer cells. *PLoS ONE*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011394>
- Holla, V. R., Backlund, M. G., Yang, P., Newman, R. a., & DuBois, R. N. (2008). Regulation of prostaglandin transporters in colorectal neoplasia. *Cancer Prevention Research*, 1(2), 93–99. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-07-0009>
- Hsieh, J. J., Le, V. H., Oyama, T., Ricketts, C. J., Ho, T. H., & Cheng, E. H. (2018). Chromosome 3p

- loss—orchestrated VHL, HIF, and epigenetic deregulation in clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 36(36), 3533–3539. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.79.2549>
- Hummon, A. B., Lim, S. R., Difilippantonio, M. J., & Ried, T. (2007). Isolation and solubilization of proteins after TRIZOL[®] extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques*, 42(4), 467–472. <https://doi.org/10.2144/000112401>
- Huynh, T., Norris, M. D., Haber, M., & Henderson, M. J. (2012). ABCC4/MRP4: a MYCN-regulated transporter and potential therapeutic target in neuroblastoma. *Frontiers in Oncology*, 2(December), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00178>
- Ifeanyi, O. E. (2014). Hypoxia and Enzyme Metabolism : A Review. *World Eng. & Appl. Sci. J.*, 5(2), 40–43. <https://doi.org/10.5829/idosi.weasj.2014.5.2.1119>
- Igal, R. A. (2010). Stearoyl-coa desaturase-1: A novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis*, 31(9), 1509–1515. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq131>
- Igal, R. A. (2011). Roles of stearylCoA desaturase-1 in the regulation of cancer cell growth, survival, and tumorigenesis. *Cancers*, 3(2), 2462–2477. <https://doi.org/10.3390/cancers3022462>
- Imamura, K., Tomita, N., Kawakita, Y., Ito, Y., Ono, K., & Nii, N. (2017). Bioorganic & Medicinal Chemistry Discovery of Novel and Potent Stearoyl Coenzyme A Desaturase 1 (SCD1) Inhibitors as Anticancer Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(14), 3768–3779. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.016>
- Itoi, T., Yamana, K., Bilim, V., Takahashi, K., & Tomita, F. (2004). Impact of frequent Bcl-2 expression on better prognosis in renal cell carcinoma patients. *Br J Cancer*, 90(1), 200–205. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601454>
- Ituarte, C., Arroyo, G., Inklemona, C., Nuñez, C., Barros, E., Maroni, R., Alvi, M. M., Virginia, M., Bürgesser, O. M., Davio, C., Sahores, A., & May, M. (2019). Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en Cáncer de Vesícula Biliar y Vías Biliares en pacientes del noroeste argentino. *Asociacion Argentina de Oncol Clin*, 24(2), 35–42.
- Iwata, T., Miyata, Y., Kanda, S., Nishikido, M., Hayashi, T., Sakai, H., & Kanetake, H. (2008). Lymphangiogenesis and Angiogenesis in Conventional Renal Cell Carcinoma: Association with Vascular Endothelial Growth Factors A to D Immunohistochemistry. *Urology*, 71(4),

- 749–754. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2007.10.063>
- J. Cooper, S., W. Tun, H., M. Roper, S., & Kim, Y. (2012). Current Status of Biomarker Discovery in Human clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, *01*(S2). <https://doi.org/10.4172/2155-9929.s2-005>
- Janardhan, S., Srivani, P., & Sastry, G. (2006). Choline Kinase: An Important Target for Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, *13*(10), 1169–1186. <https://doi.org/10.2174/092986706776360923>
- Jesus, T. (2005). Fisiología Humana. In *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* (Tercera, Vol. 53, Issue 9). McGraw-Hill Interamericana. <http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/245180/245180.pdf%0Ahttps://hdl.handle.net/20.500.12380/245180%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jsames.2011.03.003%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.gr.2017.08.001%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.precamres.2014.12>
- Jiang, J., Tang, Y. L., & Liang, X. H. (2011). EMT: A new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biology and Therapy*, *11*(8), 714–723. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.8.15274>
- Jiang, L., Wang, W., He, Q., Wu, Y., Lu, Z., Sun, J., Liu, Z., Shao, Y., & Wang, A. (2017). Oleic acid induces apoptosis and autophagy in the treatment of Tongue Squamous cell carcinomas. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11842-5>
- Jin, G., Liu, B., You, Z., Bambakidis, T., Dekker, E., Maxwell, J., Halaweish, I., Linzel, D., Alam, H. B., & Arbor, A. (2015). Development of a novel neuroprotective strategy: Combined treatment with hypothermia and valproic acid improves survival in hypoxic hippocampal cells. *Surgery*, *156*(2), 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.03.038>.Development
- Jones, J., Otu, H., Spentzos, D., Kolia, S., Inan, M., Beecken, W. D., Fellbaum, C., Gu, X., Joseph, M., Pantuck, A. J., & Libermann, T. A. (2005). *Gene Signatures of Progression and Metastasis in Renal Cell Cancer*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2225>
- Jorgen, F., Fogh, J. M., & Orfeo, T. (1977). One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in. *J Natl Cancer*, *59*(1), 221–226.
- Kaelin, W. G. (2007). The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein and Clear Cell Renal Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *13*(2 II), 680–685. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1865>

- Kaidi, A., Qualtrough, D., Williams, A. C., & Paraskeva, C. (2006). Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. *Cancer Research*, *66*(13), 6683–6691. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0425>
- Kamphorst, J. J., Cross, J. R., Fan, J., De Stanchina, E., Mathew, R., White, E. P., Thompson, C. B., & Rabinowitz, J. D. (2013). Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(22), 8882–8887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307237110>
- Kato, H., Sakaki, K., & Mihara, K. (2006). Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of mammalian ER stearoyl-CoA desaturase. *Journal of Cell Science*, *119*(11), 2342–2353. <https://doi.org/10.1242/jcs.02951>
- Khan, K. A., & Kerbel, R. S. (2018). Improving immunotherapy outcomes with anti-angiogenic treatments and vice versa. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *15*(5), 310–324. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.9>
- Khouzama, R. A., Hassan Venkatesh Gouthama, R. F. Z., & Ali N Chamseddineb, Amirtharaj Francisa, Stéphanie Buartc, Stéphane Terryc, S. C. (2020). Integrating tumor hypoxic stress in novel and more adaptable strategies for cancer immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology*, *65*, 140–154. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2020.01.00>
- Kim, S. J., Choi, H., Park, S. S., Chang, C., & Kim, E. (2011). Stearoyl CoA desaturase (SCD) facilitates proliferation of prostate cancer cells through enhancement of androgen receptor transactivation. *Molecules and Cells*, *31*(4), 371–377. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0043-5>
- Klatte, T., Seligson, D. B., Riggs, S. B., Leppert, J. T., Berkman, M. K., Kleid, M. D., Yu, H., Kabbinavar, F. F., Pantuck, A. J., & Belldegrun, A. S. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, *13*(24), 7388–7393. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0411>
- Koeberle, A., Shindou, H., Harayama, T., & Shimizu, T. (2012). Palmitoleate is a mitogen, formed upon stimulation with growth factors, and converted to palmitoleoyl-phosphatidylinositol. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(32), 27244–27254. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274829>

- Kool, M., Haa, M. De, Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Eijk, M. J. T. Van, & Juijn, J. a. (1997). Analysis of Expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, Homologues of the Multidrug Resistance-associated Protein Gene (MRP1), in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Research*, 57(May 2014), 3537–3547.
- Kroeze, S. G. C., Bijenhof, A. M., Bosch, J. L. H. R., & Jans, J. J. M. (2010). Diagnostic and prognostic tissue markers in clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Biomarkers*, 7(6), 261–268. <https://doi.org/10.3233/CBM-2010-0195>
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 228, 680–685. <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-change-bimolecular-lipid-membrane-presence-certain-antibiotics/>
- Lai, S. Y., & Grandis, J. R. (2006). Understanding the presence and function of erythropoietin receptors on cancer cells. *Journal of Clinical Oncology*, 24(29), 4675–4676. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.1190>
- Lappin, T. R., & Lee, F. S. (2019). Update on mutations in the HIF: EPO pathway and their role in erythrocytosis. *Blood Reviews*, 37, 100590. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100590>
- Lee, H. J., Ryu, J. M., Jung, Y. H., Oh, S. Y., Lee, S. J., & Han, H. J. (2015). Novel pathway for hypoxia-induced proliferation and migration in human mesenchymal stem cells: Involvement of HIF-1 α , FASN, and mTORC1. *Stem Cells*, 33(7), 2182–2195. <https://doi.org/10.1002/stem.2020>
- Lee, S. J., Zhang, J., Choi, A. M. K., & Kim, H. P. (2013). Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2013/327167>
- Lee, Y. S., Vortmeyer, A. O., Lubensky, I. A., Vogel, T. W., Ikejiri, B., Ferlicot, S., Benoit, G., Giraud, S., Oldfield, E. H., Linehan, W. M., Teh, B. T., Richard, S., & Zhuang, Z. (2005). Coexpression of erythropoietin and erythropoietin receptor in von Hippel-Lindau disease-associated renal cysts and renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 11(3), 1059–1064.
- Lefkimiatis, K., & Zaccolo, M. (2014). *cAMP signaling in subcellular compartments*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.03.008>
- Lemus-Varela, M. L., Flores-Soto, M. E., Cervantes-Munguía, R., Torres-Mendoza, B. M. G., Gudiño-Cabrera, G., Chaparro-Huerta, V., Ortuño-Sahagún, D., & Beas-Zárate, C. (2010).

- Expression of HIF-1 α , VEGF and EPO in peripheral blood from patients with two cardiac abnormalities associated with hypoxia. *Clinical Biochemistry*, 43(3), 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.09.022>
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (2005). Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3), 216–237. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.012>
- Li, J., Bauer, M., Moe, B., Leslie, E. M., & Li, X. F. (2017). Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4) Protects Cells from the Toxic Effects of Halobenzoquinones [Research-article]. *Chemical Research in Toxicology*, 30(10), 1815–1822. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00156>
- Liang, K., Qiu, S., Lu, Y., & Fan, Z. (2014). Autocrine/paracrine erythropoietin regulates migration and invasion potential and the stemness of human breast cancer cells. *Cancer Biology and Therapy*, 15(1), 89–98. <https://doi.org/10.4161/cbt.26717>
- Lin, F., He, Z., Hu, B., Tang, L., Zheng, S., Sun, Y., Sheng, Z., & Yao, Y. (2015). The overexpression of MRP4 is related to multidrug resistance in osteosarcoma cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 11(1), 18. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.143334>
- Liotti, A., Cosimato, V., Mirra, P., Calì, G., Conza, D., Secondo, A., Luongo, G., Terracciano, D., Formisano, P., Beguinot, F., Insabato, L., & Ulianich, L. (2018). Oleic acid promotes prostate cancer malignant phenotype via the G protein-coupled receptor FFA1/GPR40. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 7367–7378. <https://doi.org/10.1002/jcp.26572>
- Liu, Y.-H., Di, Y.-M., Zhou, Z.-W., Mo, S.-L., & Zhou, S.-F. (2010). Multidrug resistance-associated proteins and implications in drug development. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 37(1), 115–120. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05252.x>
- Liu, Z., Xiao, Y., Yuan, Y., Zhang, X., Qin, C., Xie, J., Hao, Y., Xu, T., & Wang, X. (2013). Effects of oleic acid on cell proliferation through an integrin-linked kinase signaling pathway in 786-O renal cell carcinoma cells. *Oncology Letters*, 5(4), 1395–1399. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1160>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ljungberg, B., Hanbury, D. C., Kuczyk, M. a, Merseburger, A. S., Mulders, P., Patard, J., & Sinescu,

- J. (2009). Guía del carcinoma de células renales. *Actas Urológicas Españolas*, 33(3), 270–279. <https://doi.org/10.4321/S0210-48062009000300009>
- Loboda, A., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2012). HIF-1 versus HIF-2 - Is one more important than the other? *Vascular Pharmacology*, 56(5–6), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2012.02.006>
- Lv, S., Qiu, X., Li, J., Liang, J., Li, W., Zhang, C., Zhang, Z. N., & Luan, B. (2017). Glucagon-induced extracellular cAMP regulates hepatic lipid metabolism. *Journal of Endocrinology*, 234(2), 73–87. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0649>
- Malhotra, R., Tyson, D. W., Rosevear, H. M., & Brosius, F. C. (2008). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a critical mediator of hypoxia induced apoptosis in cardiac H9c2 and kidney epithelial HK-2 cells. *BMC Cardiovascular Disorders*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-8-9>
- Mason, P., Liang, B., Li, L., Fremgen, T., Murphy, E., Quinn, A., Madden, S. L., Biemann, H. P., Wang, B., Cohen, A., Komarnitsky, S., Jancsics, K., Hirth, B., Cooper, C. G. F., Lee, E., Wilson, S., Krumbholz, R., Schmid, S., Xiang, Y., Carter, K. (2012). SCD1 inhibition causes cancer cell death by depleting mono-unsaturated fatty acids. *PLoS ONE*, 7(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033823>
- Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007>
- Masson, N., & Ratcliffe, P. J. (2014). Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-3>
- McLafferty, F. W. (1959). Mass Spectrometric Analysis: Molecular Rearrangements. *Analytical Chemistry*, 31(1), 82–87. <https://doi.org/10.1021/ac60145a015>
- Michael, A., Politi, E., Havranek, E., Corbishley, C., Karapanagiotou, L., Anderson, C., Relph, K., Syrigos, K. N., & Pandha, H. (2007). Prognostic significance of erythropoietin expression in human renal cell carcinoma. *BJU International*, 100(2), 291–294. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2007.06978.x>
- Miyake, M., Goodison, S., Lawton, A., Zhang, G., Gomes-Giacoaia, E., & Rosser, C. J. (2013). Erythropoietin is a JAK2 and ERK1/2 effector that can promote renal tumor cell

- proliferation under hypoxic conditions. *Journal of Hematology and Oncology*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-65>
- Mohamed, M. (2017). Biomarkers Role in Prognosis and Survival Outcomes in Patients with Renal Tumors: Review Article. *Urology & Nephrology Open Access Journal*, 4(6), 14–16. <https://doi.org/10.15406/unoaj.2017.04.00148>
- Montani, M., Herrmanns, T., Müntener, M., Wild, P., Sulser, T., & Kristiansen, G. (2013). Multidrug resistance protein 4 (MRP4) expression in prostate cancer is associated with androgen signaling and decreases with tumor progression. *Virchows Archiv*, 462(4), 437–443. <https://doi.org/10.1007/s00428-013-1390-8>
- Morais, C., Johnson, D. W., Vesey, D. A., & Gobe, G. C. (2013). Functional significance of erythropoietin in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-14>
- Morán, E., Rogel, R., Soto, A., Ruiz-Cerdá, J. L., Budía, A., Salom, J. V., & Jiménez-Cruz, J. F. (2012). Utilidad de los nuevos esquemas de agrupación de los grados de Fuhrman en la práctica clínica para el tumor renal de células claras. *Actas Urológicas Españolas*, 36(6), 352–358. <https://doi.org/10.1016/J.ACURO.2011.11.006>
- Morrissey, K. M., Stocker, S. L., Wittwer, M. B., Xu, L., & Giacomini, K. M. (2013). Renal Transporters in Drug Development. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53(1), 503–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140317>
- Mosaad, E., Peiris, H. N., Holland, O., Morean Garcia, I., & Mitchell, M. D. (2020). The Role(s) of Eicosanoids and Exosomes in Human Parturition. *Frontiers in Physiology*, 11(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.594313>
- Motzer, R. J., Jonasch, E., Michaelson, M. D., Nandagopal, L., Gore, J. L., George, S., Alva, A., Haas, N., Harrison, M. R., Plimack, E. R., Sosman, J., Agarwal, N., Bhayani, S., Choueiri, T. K., Costello, B. A., Derweesh, I. H., Gallagher, T. H., Hancock, S. L., Kyriakopoulos, C., ... Zuccarino-Catania, G. (2019). NCCN Guidelines Insights: Kidney Cancer, Version 2.2020. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 17(11), 1278–1285. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2019.0054>
- Mukherjee, A., Kenny, H. a., & Lengyel, E. (2017). Unsaturated Fatty Acids Maintain Cancer Cell Stemness. *Cell Stem Cell*, 20(3), 291–292. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.02.008>
- Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., & Azab, A. K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression,

- angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*, 3, 83–92. <https://doi.org/10.2147/hp.s93413>
- Myszczyzyn, A., Czarnecka, A. M., Matak, D., Szymanski, L., Lian, F., Kornakiewicz, A., Bartnik, E., Kukwa, W., Kieda, C., & Szczylik, C. (2015). The Role of Hypoxia and Cancer Stem Cells in Renal Cell Carcinoma Pathogenesis. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(6), 919–943. <https://doi.org/10.1007/s12015-015-9611-y>
- Norris, M. D. (2005). Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(4), 547–553. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-04-0161>
- Noto, a, Raffa, S., De Vitis, C., Roscilli, G., Malpicci, D., Coluccia, P., Di Napoli, a, Ricci, a, Giovagnoli, M. R., Aurisicchio, L., Torrisi, M. R., Ciliberto, G., & Mancini, R. (2013). Stearoyl-CoA desaturase-1 is a key factor for lung cancer-initiating cells. *Cell Death & Disease*, 4(12), e947. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.444>
- Oevermann, L., Scheitz, J., Starke, K., Köck, K., Kiefer, T., Dölken, G., Nießen, J., Greinacher, A., Siegmund, W., Zygmunt, M., Kroemer, H. K., Jedlitschky, G., & Ritter, C. a. (2009). Hematopoietic stem cell differentiation affects expression and function of MRP4 (ABCC4), a transport protein for signaling molecules and drugs. *International Journal of Cancer*, 124(10), 2303–2311. <https://doi.org/10.1002/ijc.24207>
- Ohsaki, Y., Shinohara, Y., Suzuki, M., & Fujimoto, T. (2010). A pitfall in using BODIPY dyes to label lipid droplets for fluorescence microscopy. *Histochemistry and Cell Biology*, 133(4), 477–480. <https://doi.org/10.1007/s00418-010-0678-x>
- Orevi, G., Matuan-Ilija, K., Babarovi, E., Hadisejdi, I., Grahovac, M., & Grahovac, B. (2009). Hypoxia inducible factor-1 α correlates with vascular endothelial growth factor A and C indicating worse prognosis in clear cell renal cell carcinoma. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 28, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-40>
- Paar, M., Jüngst, C., Steiner, N. A., Magnes, C., Sinner, F., Kolb, D., Lass, A., Zimmermann, R., Zumbusch, A., Kohlwein, S. D., & Wolinski, H. (2012). Remodeling of lipid droplets during lipolysis and growth in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11164–11173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.316794>
- Papworth, K., Bergh, A., Grankvist, K., Ljungberg, B., & Rasmuson, T. (2009). Expression of erythropoietin and its receptor in human renal cell carcinoma. *Tumor Biology*, 30(2), 86–

92. <https://doi.org/10.1159/000216844>
- Paradis, V., Ben Lagha, N., Zeimoura, L., Blanchet, P., Eschwege, P., Ba, N., Benoît, G., Jardin, A., & Bedossa, P. (2000). Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Archiv*, *436*(4), 351–356. <https://doi.org/10.1007/s004280050458>
- Peck, B., & Schulze, A. (2016). Lipid Desaturation - the next step in targeting lipogenesis in cancer? *FEBS Journal*, *15*, 2767–2778. <https://doi.org/10.1111/febs.13681>
- Peck, B., Schug, Z. T., Zhang, Q., Dankworth, B., Jones, D. T., Smethurst, E., Patel, R., Mason, S., Jiang, M., Saunders, R., Howell, M., Mitter, R., Spencer-Dene, B., Stamp, G., McGarry, L., James, D., Shanks, E., Aboagye, E. O., Critchlow, S. E., Schulze, A. (2016). Inhibition of fatty acid desaturation is detrimental to cancer cell survival in metabolically compromised environments. *Cancer & Metabolism*, *4*, 6. <https://doi.org/10.1186/s40170-016-0146-8>
- Peng, L., Hu, Y., Chen, D., Linghu, R., Wang, Y., Kou, X., Yang, J., & Jiao, S. (2016). Ubiquitin specific protease 21 upregulation in breast cancer promotes cell tumorigenic capability and is associated with the NOD-like receptor signaling pathway. *Oncology Letters*, *12*(6), 4531–4537. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5263>
- Perroud, B., Lee, J., Valkova, N., Dhirapong, A., Lin, P.-Y. Y., Fiehn, O., Kultz, D., Weiss, R. H., Kültz, D., & Weiss, R. H. (2006). Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. *Mol Cancer*, *5*, 64. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-64>
- Petan, T., Jarc, E., & Jusović, M. (2018). Lipid droplets in cancer: Guardians of fat in a stressful world. *Molecules*, *23*(8), 11–15. <https://doi.org/10.3390/molecules23081941>
- Pinto, C. S., Raman, A., Reif, G. A., Magenheimer, B. S., White, C., Calvet, J. P., & Wallace, D. P. (2016). Phosphodiesterase isoform regulation of cell proliferation and fluid secretion in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, *27*(4), 1124–1134. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015010047>
- Porro, A., Haber, M., Diolaiti, D., Iraci, N., Henderson, M., Gherardi, S., Valli, E., Munoz, M. a., Xue, C., Flemming, C., Schwab, M., Wong, J. H., Marshall, G. M., Della Valle, G., Norris, M. D., & Perini, G. (2010). Direct and coordinate regulation of ATP-binding cassette transporter genes by Myc factors generates specific transcription signatures that significantly affect the chemoresistance phenotype of cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(25), 19532–19543. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.078584>
- Prasad, B., Johnson, K., Billington, S., Lee, C., Chung, G. W., Brown, C. D. A., Kelly, E. J.,

- Himmelfarb, J., & Unadkat, J. D. (2016). Abundance of drug transporters in the human kidney cortex as quantified by quantitative targeted proteomics. *Drug Metabolism and Disposition*, *44*(12), 1920–1924. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.072066>
- Pulfer, M., & Murphy, R. C. (2003). Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews*, *22*(5), 332–364. <https://doi.org/10.1002/mas.10061>
- Qin, X. Y., Su, T., Yu, W., & Kojima, S. (2020). Lipid desaturation-associated endoplasmic reticulum stress regulates MYCN gene expression in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death and Disease*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2257-y>
- Qiu, B., & Simon, M. (2016). BODIPY 493/503 Staining of Neutral Lipid Droplets for Microscopy and Quantification by Flow Cytometry. *Bio-Protocol*, *6*(17), 1–6. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1912>
- Rabjerg, M., Oliván-Viguera, A., Hansen, L. K., Jensen, L., Sevelsted-Møller, L., Walter, S., Jensen, B. L., Marcussen, N., & Köhler, R. (2015). High expression of KCa3.1 in patients with clear cell renal carcinoma predicts high metastatic risk and poor survival. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122992>
- Rall, T. W., & Sutherland, E. W. (1958). Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *The Journal of Biological Chemistry*, *232*(2), 1065–1076. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)77422-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)77422-5)
- Rama, A. R., Alvarez, P. J., Madeddu, R., & Aranega, A. (2014). ABC transporters as differentiation markers in glioblastoma cells. *Molecular Biology Reports*, *41*(8), 4847–4851. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3423-z>
- Raval, R. R., Lau, K. W., Tran, M. G., Sowter, H. M., Mandriota, S. J., Li, J. L., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Harris, A. L., & Ratcliffe, P. J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol*, *25*(13), 5675–5686. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5675-5686.2005>
- Ravnskjaer, K., Madiraju, A., & Montminy, M. (2015). Role of the cAMP Pathway in Glucose and Lipid Metabolism. *Handbook of Experimental Pharmacology*, January, 251–263. https://doi.org/DOI 10.1007/164_2015_32
- Ricketts, C. J., & Linehan, W. M. (2014). Intratumoral heterogeneity in kidney cancer. *Nature Genetics*, *46*(3), 214–215. <https://doi.org/10.1038/ng.2904>
- Rioux-Leclercq, N., Fergelot, P., Zerrouki, S., Leray, E., Jouan, F., Bellaud, P., Epstein, J. I., &

- Patard, J. J. (2007). Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases. *Human Pathology*, *38*(10), 1489–1495. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.02.014>
- Roongta, U. V, Pabalan, J. G., Wang, X., Ryseck, R. P., Fargnoli, J., Henley, B. J., Yang, W. P., Zhu, J., Madireddi, M. T., Lawrence, R. M., Wong, T. W., & Rupnow, B. A. (2011). Cancer cell dependence on unsaturated fatty acids implicates stearyl-CoA desaturase as a target for cancer therapy. *Mol Cancer Res*, *9*(11), 1551–1561. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0126>
- Rubio, J. M., Rodríguez, J. P., Gil-de-Gómez, L., Guijas, C., Balboa, M. A., & Balsinde, J. (2015). Group V Secreted Phospholipase A 2 Is Upregulated by IL-4 in Human Macrophages and Mediates Phagocytosis via Hydrolysis of Ethanolamine Phospholipids. *The Journal of Immunology*, *194*(7), 3327–3339. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401026>
- Russel, Frans G.M., Koenderink, J. B., & Masereeuw, R. (2008). Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends in Pharmacological Sciences*, *29*(4), 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.01.006>
- Saito, K., Arai, E., Maekawa, K., Ishikawa, M., Fujimoto, H., Taguchi, R., Matsumoto, K., Kanai, Y., & Saito, Y. (2016). Lipidomic Signatures and Associated Transcriptomic Profiles of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Scientific Reports*, *6*(January), 28932. <https://doi.org/10.1038/srep28932>
- Salazar, L., & Moreno, F. (2017). Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar. *Salutem Scientia Spiritus*, *2*(2), 12–23.
- Sampath, J., Adachi, M., Hatse, S., Naesens, L., Balzarini, J., Flatley, R. M., Matherly, L. H., & Schuetz, J. D. (2002). Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci*, *4*(3), E14. <https://doi.org/10.1208/ps040314>
- Santos, C. R., & Schulze, A. (2012). Lipid metabolism in cancer. *FEBS J*, *279*(15), 2610–2623. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x>
- Sato, T., Mishima, E., Mano, N., Abe, T., & Yamaguchi, H. (2017). Potential drug interactions mediated by renal organic anion transporter OATP4C1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *362*(2), 271–277. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.241703>
- Scaglia, N., Chisholm, J. W., & Igal, R. A. (2009). Inhibition of stearylCoA desaturase-1

- inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: Role of AMPK. *PLoS ONE*, 4(8), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006812>
- Schaffer, J. E. (2003). Lipotoxicity: When tissues overeat. In *Current Opinion in Lipidology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 281–287). <https://doi.org/10.1097/00041433-200306000-00008>
- Seibold, N. D., Schild, S. E., Gebhard, M. P., Noack, F., & Rades, D. (2013). Prognosis of patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: Impact of tumor cell expression of EPO and EPO-R. In *Strahlentherapie und Onkologie* (Vol. 189, Issue 7, pp. 559–565). <https://doi.org/10.1007/s00066-013-0320-7>
- Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev*, 8(5), 588–594. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794818>
- Shayo, C., Legnazzi, B. L., Monczor, F., Fernández, N., Riveiro, M. E., Baldi, A., & Davio, C. (2004). The time-course of cyclic AMP signaling is critical for leukemia U-937 cell differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(3), 798–804. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.166>
- She, K., Fang, S., Du, W., Fan, X., He, J., Pan, H., Huang, L., He, P., & Huang, J. (2019). SCD1 is required for EGFR-targeting cancer therapy of lung cancer via re-activation of EGFR/PI3K/AKT signals. *Cancer Cell International*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0809-y>
- Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R. J., & Chen, Z. S. (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chinese Journal of Cancer*, 31(2), 58–73.
- Song, S. H., Jeong, I. G., You, D., Hong, J. H., Hong, B., Song, C., Jung, W. Y., Cho, Y. M., Ahn, H., & Kim, C. S. (2014). VEGF/VEGFR2 and PDGF-B/PDGFR-β expression in non-metastatic renal cell carcinoma: A retrospective study in 1,091 consecutive patients. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(11), 7681–7689.
- Spangenburg, E. E., Pratt, S. J. P., Wohlers, L. M., & Lovering, R. M. (2011). Use of BODIPY (493/503) to Visualize Intramuscular Lipid Droplets in Skeletal Muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2011/598358>
- Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182(C), 50–68. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-P](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P)
- Stoyanoff, T. R., Rodríguez, J. P., Todaro, J. S., Espada, J. D., Colavita, J. P. M., Brandan, N. C., Torres, A. M., & Aguirre, M. V. (2016). Tumor biology of non-metastatic stages of clear cell

- renal cell carcinoma; overexpression of stearoyl desaturase-1, EPO/EPO-R system and hypoxia-related proteins. *Tumor Biology*, 37(10), 13581–13593. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5279-4>
- Stubbs, C., Bardoli, A. D., Afshar, M., Pirrie, S., Miscoria, M., Wheeley, I., & Porfiri, E. (2017). A study of angiogenesis markers in patients with renal cell carcinoma undergoing therapy with sunitinib. *Anticancer Research*, 37(1), 253–259. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11315>
- Suburu, J., & Chen, Y. Q. (2012). Lipids and prostate cancer. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 98(1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.03.003>
- Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>
- Sun, Y., Shi, N., Lu, H., Zhang, J., Ma, Y., Qiao, Y., Mao, Y., Jia, K., Han, L., Liu, F., Li, H., Lin, Z., Li, X., & Zhao, X. (2014). *ABCC4* copy number variation is associated with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 35(9), 1941–1950. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu043>
- Svensson, R. U., Parker, S. J., Eichner, L. J., Kolar, M. J., Wallace, M., Brun, S. N., Lombardo, P. S., Van Nostrand, J. L., Hutchins, A., Vera, L., Gerken, L., Greenwood, J., Bhat, S., Harriman, G., Westlin, W. F., Harwood, H. J., Saghatelian, A., Kapeller, R., Metallo, C. M., & Shaw, R. J. (2016). Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models. *Nature Medicine*, 22(10), 1108–1119. <https://doi.org/10.1038/nm.4181>
- Szenajch, J., Wcislo, G., Jeong, J. Y., Szczylik, C., & Feldman, L. (2010). The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells. From clinic to bench - a critical review. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1806(1), 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.04.002>
- Tamura, K., Horikawa, M., Sato, S., Miyake, H., & Setou, M. (2019). Discovery of lipid biomarkers correlated with disease progression in clear cell renal cell carcinoma using desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. In *Oncotarget* (Vol. 10, Issue 18). www.oncotarget.com
- Tasken, K., & Aandahl, E. M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, 84(1), 137–167.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2003>

Tatli Dogan, H., Kiran, M., Bilgin, B., Kiliçarslan, A., Sendur, M. A. N., Yalçın, B., Ardiçoğlu, A., Atmaca, A. F., & Gumuskaya, B. (2018). Prognostic significance of the programmed death ligand 1 expression in clear cell renal cell carcinoma and correlation with the tumor microenvironment and hypoxia-inducible factor expression. *Diagnostic Pathology*, *13*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13000-018-0742-8>

Tresguerres, J. *Fisiología Humana*. Editorial *Mc-Graw Hill Interamericana*; 3 ed; 2005. 1178 p.

Thurnher, M. (2016). Small Drops Get Fat: Unexpected Fatty Acid in Cytoplasmic Lipid Droplets. *Cell Chemical Biology*, *23*(6), 637–638. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.06.001>

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *65*(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>

Tracz-Gaszewska, Z., & Dobrzyn, P. (2019). Stearoyl-CoA desaturase 1 as a therapeutic target for the treatment of cancer. *Cancers*, *11*(7), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers11070948>

Tun, H. W., Marlow, L. A., Von Roemeling, C. A., Cooper, S. J., Kreinest, P., Wu, K., Luxon, B. A., Sinha, M., Anastasiadis, P. Z., & Copland, J. A. (2010). Pathway signature and cellular differentiation in clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One*, *5*(5), e10696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010696>

Turajlic, S., Swanton, C., & Boshoff, C. (2018). Kidney cancer: The next decade. *Journal of Experimental Medicine*, *215*(10), 2477–2479. <https://doi.org/10.1084/JEM.20181617>

Ueda, K., Nakatsu, Y., Yamamotoya, T., Ono, H., Inoue, Y., Inoue, M. K., Mizuno, Y., Matsunaga, Y., Kushiya, A., Sakoda, H., Fujishiro, M., Takahashi, S. I., Matsubara, A., & Asano, T. (2019). Prolyl isomerase Pin1 binds to and stabilizes acetyl CoA carboxylase 1 protein, thereby supporting cancer cell proliferation. *Oncotarget*, *10*(17), 1637–1648. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26691>

Valente, M. J., Henrique, R., Costa, V. L., Jerónimo, C., Carvalho, F., Bastos, M. L., de Pinho, P. G., & Carvalho, M. (2011). A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens. *PLoS ONE*, *6*(5), 21–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019337>

Valli, A., Rodriguez, M., Moutsianas, L., Fischer, R., Huang, H., Stiphout, R. Van, Jones, D., Mccarthy, M., Mccullagh, J., Yanes, O., Harris, A., & Kessler, B. (2014). Hypoxia induces a

- lipogenic cancer cell phenotype via HIF1 α - dependent and -independent pathways. *Oncotarget*, 6(4), 1920–1941.
- Van Aubel, R. a M. H., Smeets, P. H. E., Peters, J. G. P., Bindels, R. J. M., & Russel, F. G. M. (2002). The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 13(3), 595–603. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856762>
- Van de Ven, R., Oerlemans, R., van der Heijden, J. W., Scheffer, G. L., de Gruijl, T. D., Jansen, G., & Scheper, R. J. (2009). ABC drug transporters and immunity: novel therapeutic targets in autoimmunity and cancer. *J Leukoc Biol*, 86(5), 1075–1087. <https://doi.org/10.1189/jlb.0309147>
- Verine, J., Colin, D., Nheb, M., Prapotnich, D., Ploussard, G., Cathelineau, X., Desgrandchamps, F., Mongiat-Artus, P., & Feugeas, J.-P. (2018). Architectural Patterns are a Relevant Morphologic Grading System for Clear Cell Renal Cell Carcinoma Prognosis Assessment: Comparisons With WHO/ISUP Grade and Integrated Staging Systems. *American Journal of Surgical Pathology*, 00(00), 1–19. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001025>
- Von Roemeling, C A, Marlow, L. A., Wei, J. J., Cooper, S. J., Caulfield, T. R., Wu, K., Tan, W. W., Tun, H. W., & Copland, J. A. (2013). Stearoyl-CoA desaturase 1 is a novel molecular therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 19(9), 2368–2380. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3249>
- Wallace. (1998). Anatomy and Physiology of the Kidney. *Aorn journal*, 68(5), 799–820. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-4391-1.50007-2>
- Wang, C., Ma, J., Zhang, N., Yang, Q., Jin, Y., & Wang, Y. (2015). The acetyl-CoA carboxylase enzyme: A target for cancer therapy? *Expert Review of Anticancer Therapy*, 15(6), 667–676. <https://doi.org/10.1586/14737140.2015.1038246>
- Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 270, Issue 3, pp. 1230–1237). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.3.1230>
- Wang, K., Sun, Y., Tao, W., Fei, X., & Chang, C. (2017). Androgen receptor (AR) promotes clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) migration and invasion via altering the circHIAT1/miR-195-5p/29a-3p/29c-3p/CDC42 signals. *Cancer Letters*, 394(January), 1–12.

- <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.036>
- Wang, Z., Xu, Y., Meng, X., Watari, F., Liu, H., & Chen, X. (2015). Suppression of c-Myc is involved in multi-walled carbon nanotubes' down-regulation of ATP-binding cassette transporters in human colon adenocarcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *282*(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.11.002>
- Wen, J., Luo, J., Huang, W., Tang, J., Zhou, H., & Zhang, W. (2015). The Pharmacological and Physiological Role of Multidrug Resistant Protein 4 (MRP4). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *571*(September), 358–375. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.225656>
- Wenk, M. R. (2010). Lipidomics: new tools and applications. *Cell*, *143*(6), 888–895. [https://doi.org/S0092-8674\(10\)01352-8](https://doi.org/S0092-8674(10)01352-8) [pii]10.1016/j.cell.2010.11.033 [doi]
- Westenfelder, C., & Baranowski, R. L. (2000). Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. In *Kidney international* (Vol. 58). <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00211.x>
- Wielinga, P. R., van der Heijden, I., Reid, G., Beijnen, J. H., Wijnholds, J., & Borst, P. (2003). Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *J Biol Chem*, *278*(20), 17664–17671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212723200>
- Wiesener, M. S., Munchenhagen, P. M., Berger, I., Morgan, N. V, Roigas, J., Schwiertz, A., Jurgensen, J. S., Gruber, G., Maxwell, P. H., Loning, S. A., Frei, U., Maher, E. R., Grone, H. J., & Eckardt, K. U. (2001). Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res*, *61*(13), 5215–5222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11431362>
- Wlcek, K., Svoboda, M., Thalhammer, T., Sellner, F., Krupitza, G., & Jaeger, W. (2008). Altered expression of organic anion transporter polypeptide (OATP) genes in human breast carcinoma. *Cancer Biology and Therapy*, *7*(9), 1450–1455. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.9.6282>
- Wu, D., & Yotnda, P. (2011). Induction and testing of hypoxia in cell culture. *Journal of Visualized Experiments*, *54*, 2–5. <https://doi.org/10.3791/2899>
- Wymann, M. P., & Schneider, R. (2008). Lipid signalling in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *9*(2), 162–176. <https://doi.org/nrm2335> [pii] 10.1038/nrm2335 [doi]
- Xie, M., Rich, T. C., Scheitrum, C., Conti, M., & Richter, W. (2011). Inactivation of multidrug

- resistance proteins disrupts both cellular extrusion and intracellular degradation of cAMP. *Mol Pharmacol*, 80(2), 281–293. <https://doi.org/10.1124/mol.111.071134>
- Yaneff, A., Sahores, A., Gómez, N., Carozzo, A., Shayo, C., & Davio, C. (2019). MRP4/ABCC4 As a New Therapeutic Target: Meta-Analysis to Determine cAMP Binding Sites as a Tool for Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*, 26(7), 1270–1307. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171229133259>
- Yang, C., Jiang, L., Zhang, H., Shimoda, L. A., Deberardinis, R. J., & Semenza, G. L. (2014). Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 542). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00022-4>
- Yang, D. C., & Chen, C. H. (2020). Potential New Therapeutic Approaches for Renal Cell Carcinoma. *Seminars in Nephrology*, 40(1), 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2019.12.010>
- Yin, H., Qiu, X., Shan, Y., You, B., Xie, L., Zhang, P., Zhao, J., & You, Y. (2021). HIF-1 α downregulation of miR-433-3p in adipocyte-derived exosomes contributes to NPC progression via targeting SCD1. *Cancer Science*, 112(4), 1457–1470. <https://doi.org/10.1111/cas.14829>
- Yoshino, S., Kato, M., & Okada, K. (1998). Evaluation of the prognostic significance of microvessel count and tumor size in renal cell carcinoma. *International Journal of Urology*, 5(2), 119–123. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.1998.tb00258.x>
- Yu, S., Sun, L., Jiao, Y., & Lee, L. T. O. (2018). The role of G protein-coupled receptor kinases in cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 14(2), 189–203. <https://doi.org/10.7150/ijbs.22896>
- Yu, Z., Zhang, C., Chai, R., Du, Y., Gao, X., Xing, J., Yu, E., Zhang, W., Zhang, X., Cao, G., & Fu, C. (2014). Prognostic significance and molecular mechanism of ATP-binding cassette subfamily C member 4 in resistance to neoadjuvant radiotherapy of locally advanced rectal carcinoma. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085446>
- Zhang, F., & Du, G. (2012). Dysregulated lipid metabolism in cancer. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(8), 167–174. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v3.i8.167>
- Zhang, G., Wang, Z., Qian, F., Zhao, C., & Sun, C. (2015). Silencing of the ABCC4 gene by RNA interference reverses multidrug resistance in human gastric cancer. *Oncology Reports*, 33(3), 1147–1154. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3702>

- Zhang, X., Zhao, L., Li, X., Wang, X., Li, L., Fu, X., Sun, Z., Li, Z., Nan, F., Chang, Y., & Zhang, M. (2015). ATP-binding cassette sub-family C member 4 (ABCC4) is overexpressed in human NK/T-cell lymphoma and regulates chemotherapy sensitivity: Potential as a functional therapeutic target. *Leukemia Research*, 39(12), 1448–1454. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2015.10.001>
- Zhang, Y.-K., Wang, Y.-J., Gupta, P., & Chen, Z.-S. (2015). Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy. *The AAPS Journal*, 17(4), 802–812. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9757-1>
- Zhang, Y., Wang, H., Zhang, J., Lv, J., & Huang, Y. (2013). Positive feedback loop and synergistic effects between hypoxia-inducible factor-2 α and stearyl-CoA desaturase-1 promote tumorigenesis in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Science*, 104(4), 416–422. <https://doi.org/10.1111/cas.12108>
- Zhang, Z., Wang, J., Shen, B., Peng, C., & Zheng, M. (2012). The ABCC4 gene is a promising target for pancreatic cancer therapy. *Gene*, 491(2), 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.09.029>
- Zhao, X., Guo, Y., Yue, W., Zhang, L., Gu, M., & Wang, Y. (2014). ABCC4 is required for cell proliferation and tumorigenesis in non-small cell lung cancer. *Oncotargets and Therapy*, 7, 343–351. <https://doi.org/10.2147/OTT.S56029>
- Zhou, Y., Bollu, L. R., Tozzi, F., Ye, X., Bhattacharya, R., Gao, G., Dupre, E., Xia, L., Lu, J., Fan, F., Bellister, S., Ellis, L. M., & Weihua, Z. (2013). ATP citrate lyase mediates resistance of colorectal cancer cells to SN38. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(12), 2782–2791. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0098>