



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

COMPORTAMIENTO DE HIF- α Y SU ASOCIACIÓN CON LOS NIVELES DE SIAH EN UNA LÍNEA CELULAR DE CCR INDUCIDO QUÍMICAMENTE EN RATA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
IQAL. JORGE LUIS COPADO ROMERO

TUTOR PRINCIPAL
Dra. María Elena Ibarra Rubio
[Facultad de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Leticia Rocha Zavaleta
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dra. Aliesha Araceli González Arenas
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. Junio, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

“Comportamiento de HIF- α y su asociación con los niveles de SIAH en una línea celular de CCR inducido químicamente en rata”

que presenté para obtener el grado de **maestría** es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser 'JL Copado Romero', escrita sobre una línea horizontal.

Jorge Luis Copado Romero
No. Cuenta. 313660744

COPADO ROMERO JORGE LUIS
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **12 de marzo de 2024**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Comportamiento de HIF-(alfa) y su asociación con los niveles de SIAH en una línea celular de CCR inducido químicamente en rata**", dirigida por el/la Dr(a). **IBARRA RUBIO MARÍA ELENA**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

CAMACHO ARROYO IGNACIO	PMDCBQ	PRESIDENTE
GÓMORA MARTÍNEZ JUAN CARLOS	PMDCBQ	SECRETARIO
COELLO COUTIÑO MARTHA PATRICIA	PMDCBQ	VOCAL
RODRÍGUEZ DORANTES MAURICIO	PMDCBQ	VOCAL
SALAZAR MARTÍNEZ ANA MARÍA	PMDCBQ	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de marzo de 2024



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

A mi mamá...

*Te dedico este trabajo porque sé lo mucho que te
hubiera gustado verlo culminado y tener este
escrito en tus manos, gracias por darle un sentido
especial y un motivo a todo el esfuerzo...*

*En cada una de estas páginas está impreso el
deseo de que un día con ayuda de la ciencia
podamos evitar que el cáncer destruya más
vidas...*

Vives siempre en mi corazón...udi udi

En memoria de
María del Carmen Romero Chávez†

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por apoyarme incondicionalmente para cumplir este sueño, por cada llamada y palabra de aliento, por siempre confiar en mí y alentarme a crecer. A ustedes les debo todo y sé que no me alcanzará la vida para pagarles, pero haré lo posible para demostrar lo lejos que puedo llegar con lo que me han dado. Gracias por ser el mejor ejemplo de lucha, fortaleza y resiliencia.

A mi papá, por nunca rendirte y enseñarme que nuestras limitaciones están en la mente y no en el cuerpo.

A mi mamá, por dar siempre lo mejor de ti hasta el final, yo sé que donde quiera que estés sigues siempre aquí conmigo, te amo por siempre.

A mi hermana, por ser mis ojos, mis oídos y mis manos a la distancia; por ser mi fan número 1 y siempre estar ahí para apoyarme.

A la doctora Ibarra por abrirme las puertas de su laboratorio, por todo el tiempo dedicado para que esto se lograra aun cuando siempre todo era urgente, por sus consejos, correcciones, enseñanzas y tantas horas de pláticas; pero gracias sobre todo por ser más que solo una tutora para mí.

Al maestro José por las pláticas, consejos y sobre todo su paciencia para enseñarme y ayudarme siempre que era necesario.

A mis compañeras de laboratorio Vero, Maribel, Caro y Vale, por tantas risas y chismes que hacen más divertidas las horas en el laboratorio.

A toda mi familia, por siempre estar al pendiente y motivándome a seguir persiguiendo mis sueños.

A mis amigos, a todos y cada uno de ellos, por enseñarme que los lazos de familia no se forman solo a través de la sangre. Gracias por seguir ahí a pesar de la distancia; y a los amigos que hice durante este proceso, gracias por hacer mi llegada a una nueva ciudad mucho más sencilla.

No hay líneas suficientes para mencionar a cada una de las personas que hicieron posible que hoy yo esté aquí, lograr esto ha sido la suma de muchas personas. Gracias por ayudarme a construir a la persona que soy el día de hoy, los quiero mucho a todos y los llevo siempre en el corazón.

Jorge Luis Copado Romero

RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por prestar sus instalaciones para la realización de este trabajo de investigación, el cual se llevó a cabo en el laboratorio F-225 del Departamento de Biología de la Facultad de Química.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la subvención otorgada a través del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (ahora F003) (No. de proyecto 284155) así como por la beca para la realización de mis estudios de maestría (CVU 1230039).

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la asignación de recursos a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (IN-228716).

A la Facultad de Química (FQ) por su contribución a través del Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP) (5000-9109).

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo económico otorgado para la presentación de los resultados de este proyecto en el IX Congreso de la Rama de Transducción de Señales (Acapulco 2023).

A la Dra. María Elena Ibarra Rubio por la conceptualización y dirección de este trabajo de investigación.

Al M. en C. José Dolores Solano Becerra por su asesoría técnica en la elaboración del proyecto.

A los miembros de mi comité tutor, Dra. Leticia Rocha Zavaleta y Dra. Aliesha Araceli González Arenas por sus grandes aportaciones a la realización de este trabajo.

A los miembros de mi jurado de grado por las valiosas observaciones que ayudaron a mejorar el presente trabajo:

Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Presidente
Dr. Juan Carlos Gómora Martínez	Secretario
Dra. Martha Patricia Coello Coutiño	Vocal
Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes	Vocal
Dra. Ana María Salazar Martínez	Vocal

Índice

Índice de tablas.....	10
Índice de figuras	11
Lista de abreviaturas.....	12
1. Resumen	15
2. Introducción	17
2.1. Cáncer.....	17
2.2. Carcinoma de Células Renales (CCR).....	17
2.2.1. Carcinoma de células renales cromóforas (CCRc).....	18
2.2.2. Carcinoma de células renales papilar (CCRp).....	20
2.2.3. Carcinoma de células renales de células claras (CCRcc)	20
2.3. Modelo <i>in vivo</i> de carcinogénesis renal inducida por DEN-FENTA	22
2.4. Factor inducible por hipoxia (HIF)	24
2.5. Homólogo de seven in absentia (SIAH) y la regulación de HIF- α	28
3. Justificación	31
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivos.....	31
5.1. Objetivo general	31
5.2. Objetivos particulares.....	31
6. Metodología.....	32
6.1. Cultivos celulares	32
6.2. Preparación de extractos celulares completos.....	32
6.3. Cuantificación de proteínas totales (Método de Lowry).....	33
6.4. Electroforesis SDS PAGE	33
6.5. Western blot	33
6.6. Normalización y análisis densitométrico del western blot.....	34

7. Resultados y discusión	36
7.1. Cultivo de líneas celulares	36
7.2. Estado de pVHL y niveles de las isoformas 1 y 2 de HIF- α	36
7.3. Niveles de SIAH1 y SIAH2	42
8. Conclusiones	48
9. Anexos.....	49
9.1. Preparación de soluciones	49
9.1.1. Medio de cultivo DMEM alto en glucosa.....	49
9.1.2. Amortiguador de lisis RIPA.....	49
9.1.3. Amortiguador salino de fosfatos pH 7.4 (PBS)	49
9.1.4. Amortiguador PBS-EDTA	49
9.1.5. Amortiguador PBST (10X)	50
9.1.6. Amortiguador de electroforesis	50
9.1.7. Amortiguador de transferencia.....	50
9.1.8. Amortiguador tris pH 8.8 (1.5 M).....	50
9.1.9. Amortiguador tris pH 6.8 (1 M).....	50
9.1.10. Persulfato de amonio (30%)	50
9.1.11. SDS (10%).....	50
9.1.12. Amortiguador de carga	50
9.1.13. Mezcla de acrilamida (30%).....	51
9.1.14. Reactivo de Biuret	51
9.1.15. Reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1).....	51
9.1.16. Ponceau S (0.01%).....	51
9.2. Geles de poliacrilamida para electroforesis (PAGE)	51
9.3. Curva de calibración método Lowry	53
9.4. Imágenes de western blot para determinación de peso molecular.....	53

9.5. Cálculos para normalización de western blot	54
10. Referencias.....	55

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación 2022 de la OMS para los subtipos de tumores de células renales	19
Tabla 2. Papel de SIAH en diferentes tipos de cáncer.	30
Tabla 3. Condiciones de electroforesis y western blot para la identificación de las proteínas de interés.....	35
Tabla 4. Soluciones para preparación de geles de resolución y concentrador.	52
Tabla 5. Curva de calibración método de Lowry	53

Índice de figuras

Figura 1. Apariencia macroscópica y microscópica de los carcinomas de células renales más comunes.....	21
Figura 2. Comparación histológica del modelo DEN-FeNTA y el CCRcc humano	23
Figura 3. Dominios funcionales de las isoformas de HIF.....	25
Figura 4. Vía de señalización HIF/VHL en condiciones de normoxia e hipoxia.	26
Figura 5. Estado del gen <i>VHL</i> en CCRcc.....	28
Figura 6. Dominios funcionales de las proteínas de la familia SIAH.....	29
Figura 7. Líneas celulares bajo microscopio óptico de campo claro.....	37
Figura 8. Expresión de la proteína pVHL en líneas celulares de CCR.	38
Figura 9. Niveles de HIF-1 α en líneas celulares de CCR.	39
Figura 10. Niveles de HIF-2 α en líneas celulares de CCR.	40
Figura 11. Niveles de SIAH1 en líneas celulares de CCR.	44
Figura 12. Niveles de SIAH2 en líneas celulares de CCR.	45
Figura 13. Estabilización de HIF- α mediada por SIAH2.....	47
Figura 14. Western blots con marcadores de peso molecular.	54

Lista de abreviaturas

•O₂: Radical Superóxido

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Akt: Proteína cinasa B

ALK: Gen de la cinasa del linfoma anaplásico

ARE: Elemento de respuesta antioxidante

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNT: Proteína translocadora del receptor nuclear de hidrocarburo de arilo.

BAP1: Gen de la proteína 1 asociada a BRCA1

bHLH: Dominio hélice-bucle-hélice básica

BRCA1: Gen del supresor de tumores cáncer de mama 1

CBP: Proteína de unión a CREB

CCR: Carcinoma de Células Renales

CCRc: Carcinoma renal de células cromóforas

CCRcc: Carcinoma Renal de Células Claras

CCRp: Carcinoma de células renales papilar

CDKN2A: Gen del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2A

c-MET: Gen del factor de transición Epitelio Mesenquimal

CREB: Proteína de unión a Elemento de Respuesta al AMP cíclico

CTAD: Dominio de transactivación del carboxilo terminal de la subunidad α

DEN: N-dietilnitrosamina

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco

ELOC: Elonguina C

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

FeNTA: Nitrilotriacetato férrico

FIH: Factor Inhibidor de HIF

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

HIF-1a: Factor inducible por hipoxia 1a

HIF-2α: Factor Inducido por Hipoxia 2α

HO•: Radical Hidroxilo

KDM5C: Gen de la desmetilasa 5C específica de lisina

Keap1: Proteína 1 Asociada A ECH Tipo Kelch

LZIP: Cremallera de Leucina

MAPK: Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos

MTOR: Gen de la diana de la rapamicina en mamíferos

MYC: Gen del homólogo de la mielocitomatosis aviaria

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NFκB: Factor Nuclear Potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las Células B Activadas

Nrf1: Factor respiratorio nuclear 1

NTAD: Dominio de transactivación N-terminal

ODDD: Dominio de degradación dependiente de oxígeno.

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAS: Dominio estructural de proteínas de señalización Per-ARNT-Sim

PBRM1: Gen de la proteína polibromo 1

PER: Proteína del periodo circadiano.

PHD: Prolil hidroxilasas

PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa

PIK3CA: Gen de la subunidad catalítica α de la fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinasa

PTEEN: Gen de la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

pVHL: Proteína Supresora de Tumores del Síndrome de Von Hippel-Lindau

SETD2: Gen de la proteína 2 que contiene el dominio SET

SIAH: Proteínas homologas de Seven in absentia

SIM: Proteína single-minded que regula el desarrollo del sistema nervioso central de Drosophila.

SMARCB1: Miembro-1 de la Subfamilia B Regulador de la Cromatina Dependiente de Actina Asociado a la Matriz y Relacionado con Swi-Snf

TEM: Transición Epitelio Mesenquimal

TFE3: Factor de Transcripción E3

TFEB: Factor de Transcripción EB

TP53: Gen de la proteína supresora tumoral p53

TSC1: Gen 1 de la esclerosis tuberosa

VHL: Gen de la proteína Supresora de Tumores del Síndrome de Von Hippel-Lindau

wt-VHL: VHL tipo silvestre

1. Resumen

El carcinoma de células renales (CCR) es la neoplasia renal más frecuente en adultos, sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares relacionados con su desarrollo y progresión. El aumento de los niveles de la subunidad alfa del factor inducible por hipoxia (HIF- α) es una de las alteraciones más comunes en el CCR de células claras (CCRcc), el subtipo histológico más común. Este incremento se ha explicado principalmente por la inactivación del gen *VHL* (Von Hippel Lindau), presente en más del 70% de los casos, ya que pVHL ubiquitina a HIF- α para su degradación proteasomal. No obstante, la elevación de HIF- α se ha observado incluso en casos con pVHL aparentemente funcional.

Uno de los mecanismos que se han identificado para explicar la acumulación de HIF- α en diferentes tipos celulares sin alteraciones reportadas en pVHL, es a través de la actividad de las proteínas homólogas de seven in absentia (SIAH). Las proteínas SIAH son un grupo de ligasas de ubiquitina E3 que tienen entre sus sustratos a las prolil hidroxiladas (PHD) y al factor inhibidor de HIF (FIH), las cuales son hidroxilasas que se relacionan de forma negativa con la estabilidad y actividad de HIF- α respectivamente. Las isoformas 1 y 2 de SIAH resultan de particular interés ya que se ha demostrado su participación en diferentes tipos de cáncer, no obstante, su comportamiento en el CCR se desconoce, por lo cual se propuso analizar el comportamiento de HIF-1 α y HIF-2 α , y su posible asociación con los niveles de SIAH1 y SIAH2 en una línea celular de CCR inducido químicamente en rata.

Con base en lo anterior en el presente trabajo se analizaron mediante western blot los niveles de HIF-1 α y HIF-2 α , así como la presencia o ausencia de pVHL en la línea celular RC5E de CCR inducido químicamente en rata y en la línea NRK-52E de epitelio no tumoral de túbulo renal de rata como referente. Del mismo modo, se realizaron las determinaciones en las líneas de CCR humano ACHN (*VHL*^{+/+}) y 786-O (*VHL*^{-/-}) como referentes en diferentes estados de pVHL. Posteriormente se determinaron los niveles de SIAH1 y SIAH2 en esas mismas cuatro líneas celulares.

Nuestros resultados mostraron la presencia de pVHL en todas las líneas analizadas excepto 786-O como se esperaba. Además, se observó un aumento en los niveles de HIF-1 α y 2 α en la línea RC5E con respecto a la línea control, a pesar de que se confirmó la expresión de pVHL.

Este incremento se observó también en la línea 786-O donde los niveles de ambas isoformas de HIF- α fueron mayores que en las células ACHN.

En cuanto a los niveles de SIAH1, no se encontró diferencia significativa entre la línea de CCR y la línea control de rata, mientras que las células 786-O presentaron niveles menores de esta proteína en comparación con ACHN. Sin embargo, sí se observaron diferencias importantes en SIAH2, hallando niveles mayores en RC5E y 786-O, con respecto a NRK-52E y ACHN, respectivamente.

Los resultados obtenidos evidencian la existencia de mecanismos de regulación de HIF- α independientes al estado de pVHL en el CCR. Se identificó una asociación entre los niveles elevados de HIF- α y el aumento de SIAH2, lo que sugiere que esta molécula puede estar relacionada con la estabilización de HIF- α en el CCR tal como se ha observado en otros tipos de cáncer, sin embargo, se requiere mayor evidencia experimental para confirmar esto.

2. Introducción

2.1. Cáncer

Cáncer es un término genérico que se da a un grupo amplio de enfermedades que involucran la división descontrolada de distintas clases de células en un organismo, como resultado de la evasión de los mecanismos de control celular normales, dando lugar a la formación de masas celulares denominadas tumores (National Institutes of Health, EUA & Biological Sciences Curriculum Study., 2007). A nivel celular, el desarrollo de tumores malignos es un proceso que evoluciona en una serie de pasos, en los cuales las células van incrementando, a través de diversas mutaciones, su capacidad de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis (Cooper, 2019).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo responsable de aproximadamente 1 de cada 6 muertes, en el año 2020 (World Health Organization, 2022); mientras que en México el 8% de las defunciones en ese mismo año se debieron a tumores malignos, colocándolo como la cuarta causa de muerte en nuestro país (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2022).

Los tumores se clasifican de acuerdo con el tipo de célula que les dio origen; los sarcomas, un tipo de tumor raro en humanos, son masas sólidas derivadas de tejido conectivo; los linfomas y leucemias, son derivados de células del sistema inmune y componentes sanguíneos respectivamente; y los carcinomas, los cuales representan cerca del 90% de los cánceres en humanos, tienen su origen en células epiteliales. Adicionalmente, estos se nombran de acuerdo con el tipo de tejido y células que dieron origen al tumor (Cooper, 2019).

2.2. Carcinoma de Células Renales (CCR)

El carcinoma de células renales (CCR) es un tipo de neoplasia que comprende un grupo heterogéneo de cánceres que tienen su origen en las células epiteliales del túbulo renal (Nabi et al., 2018). En 2020 se presentaron más de 430 mil nuevos casos de cáncer de riñón a nivel mundial, con una incidencia en México de aproximadamente 6 mil casos (Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) & International Agency for Research on Cancer, 2020), de los cuales se estima que entre el 85-90% corresponden a CCR (American Cancer Society, 2020; Cruz-Gregorio et al., 2021; Nabi et al., 2018).

Actualmente la etiología de este padecimiento no está bien definida, no obstante, entre sus principales factores con los que se ha encontrado una asociación positiva son la edad, el tabaquismo, la obesidad, la hipertensión; además se ha establecido que los hombres presentan una mayor incidencia de la enfermedad que las mujeres, en una proporción de entre 1.5 y 2.5 veces (Capitanio & Montorsi, 2016; Padala et al., 2020; Rossi et al., 2018; Thaib & Rahaju, 2022).

Como en la mayoría de los cánceres, el estadio al momento de la detección del CCR es uno de los factores más importantes en su pronóstico. Pacientes en un estadio temprano de la enfermedad presentan una tasa de supervivencia a 5 años del 92.6% (Jones et al., 2020). No obstante, debido a que entre el 40-60% de los casos de CCR son asintomáticos generalmente este es diagnosticado de forma casual a través de estudios imagenológicos realizados con motivo de otras patologías preexistentes (Rossi et al., 2018; Vasudev et al., 2020). Por lo anterior, cerca de un tercio de los pacientes presentan metástasis al momento del diagnóstico y entre el 20% y 50% progresan a un estado metastásico a pesar de haberles practicado una resección quirúrgica del tumor (Padala et al., 2020), lo cual reduce la tasa de supervivencia a 5 años al 12% aproximadamente (He & Tian, 2021).

De acuerdo con la más reciente clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se reconocen 24 subtipos de tumores de células renales (Tabla 1) los cuales tradicionalmente se han nombrado con base en sus características citoplásmicas, arquitectura, ubicación anatómica, correlación con una enfermedad renal específica, alteraciones moleculares o bien sus síndromes asociados; sin embargo, la lista actual contempla un tipo de tumores denominados carcinomas renales molecularmente definidos (Moch et al., 2022).

A pesar del amplio número de subtipos que existen de este cáncer, los más comunes son los CCR de células claras (70-90%), de tipo papilar (10-15%) y de células cromóforas (3-5%), representando, en conjunto, alrededor del 95% de los casos (Warren & Harrison, 2018).

2.2.1. Carcinoma de células renales cromóforas (CCRc)

En la década de 1980, las propuestas de clasificación para el CCR humano se basaron en rasgos celulares característicos de cada subtipo; las células de este carcinoma renal tienen un citoplasma finamente reticular y ligeramente opaco cuando se tiñen con hematoxilina y eosina al ser observadas bajo un microscopio óptico, es por ello por lo que se denominaron como cromóforas (Moch & Ohashi, 2021).

Tabla 1. Clasificación 2022 de la OMS para los subtipos de tumores de células renales (Moch et al., 2022).

Tumores renales de células claras
Carcinoma de células renales de células claras
Neoplasia renal quística multilocular de bajo potencial maligno
Tumores papilares renales
Adenoma papilar
Carcinoma de células renales papilar
Tumores renales oncocíticos y cromóforos
Oncocitoma
Carcinoma de células renales cromóforas
Otros tumores oncocíticos del riñón
Tumores de los conductos colectores
Carcinoma de túbulos colectores
Otros tumores renales
Tumor de células renales de células claras papilar
Carcinoma mucinoso tubular y de células fusiformes
Carcinoma de células renales túbulo-quísticas
Carcinoma de células renales asociado a enfermedad quística adquirida
Carcinoma eosinofílico de células renales sólidas y quísticas
Carcinoma de células renales no especificado
Carcinomas renales molecularmente definidos
Carcinomas de células renales con reordenamiento de TFE3
Carcinomas de células renales con TFEB alterado
Carcinomas de células renales con mutación en ELOC (Antes TCEB1)
Carcinoma de células renales con deficiencia de fumarato hidratasa
Carcinoma de células renales asociado a leiomiomatosis hereditaria y síndrome de carcinoma de células renales
Carcinoma de células renales con rearrreglo de ALK
Carcinoma medular no especificado
Carcinoma de células renales tipo medular deficiente de SMARCB1
Carcinoma de células renales no diferenciado deficiente de SMARCB1 no especificado
Carcinoma de células renales desdiferenciado deficiente de SMARCB1 de otros subtipos específicos

TFE3: Factor de Transcripción E3; **TFEB:** Factor de Transcripción EB; **ELOC:** Elonguina C; **ALK:** Gen de la cinasa del linfoma anaplásico; **SMARCB1:** Miembro-1 de la Subfamilia B Regulador de la Cromatina Dependiente de Actina Asociado a la Matriz y Relacionado con Swi-Snf

Los CCRc son tumores generalmente grandes (>7 cm) de coloraciones que van de parda ligera a café oscuro, cuya intensidad de color correlaciona con la concentración de células eosinofílicas. Se caracterizan por tener células con membranas celulares prominentes y núcleos arrugados con halos perinucleares (Figura 1) (Moch et al., 2016).

Diversos estudios han confirmado un genotipo muy singular y característico, con pérdidas de los cromosomas 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21 y del cromosoma sexual. Sin embargo, se ha demostrado una baja tasa de mutaciones somáticas específicas en el CCRc, identificando a *TP53* y *PTEN* como los genes mutados con mayor frecuencia (Moch & Ohashi, 2021).

2.2.2. Carcinoma de células renales papilar (CCRp)

El carcinoma de células renales papilar posee una arquitectura papilar o túbulo-papilar con márgenes bien delimitados y en ocasiones presencia de una pseudocápsula. Su color varía dependiendo del grado de hemorragia intratumoral y su consistencia es friable; microscópicamente son a menudo carcinomas circunscritos con una pseudocápsula prominente, compuesta de papilas formadas por un núcleo fibrovascular central (Figura 1) (Moch et al., 2016).

Este subtipo se caracteriza por presentar trisomías y tetrasomías del cromosoma 7, trisomías del cromosoma 17, así como una pérdida del cromosoma Y (Moch et al., 2016). También se han observado mutaciones en el oncogen *c-MET*, cuyo producto proteico es un receptor transmembranal con actividad de tirosina cinasa, el cual es activado por el factor de crecimiento hepático (HGF, por sus siglas en inglés), en conjunto regulan vías de señalización implicadas en la angiogénesis, la invasión y la metástasis (Harshman & Choueiri, 2013). No obstante, dichas mutaciones solo se han observado en poco más del 10% de los tumores (Goyal et al., 2013; Moch et al., 2016).

A finales de los años 90's fue propuesto realizar una subtipificación de estos carcinomas, señalando la existencia de tumores papilares tipo 1 y tipo 2. Sin embargo, estudios moleculares recientes sugieren que el CCR papilar tipo 2 podría no constituir una única entidad bien definida, sino más bien subgrupos individuales con antecedentes moleculares diferentes. Por lo cual la clasificación de la OMS del año 2022 contempla algunas de esas entidades como tumores independientes con antecedentes clínicos y moleculares específicos (Moch et al., 2022).

2.2.3. Carcinoma de células renales de células claras (CCRcc)

El carcinoma de células renales de células claras (CCRcc) es un tumor que macroscópicamente se observa como una masa sólida y lobulada, bien delimitada, de color

amarillo dorado debido a su alto contenido de lípidos. Sin embargo, la apariencia macroscópica puede ser variable, con áreas de necrosis y de coloración roja oscura que reflejan hemorragia (Figura 1) (Goyal et al., 2013; Moch et al., 2016).

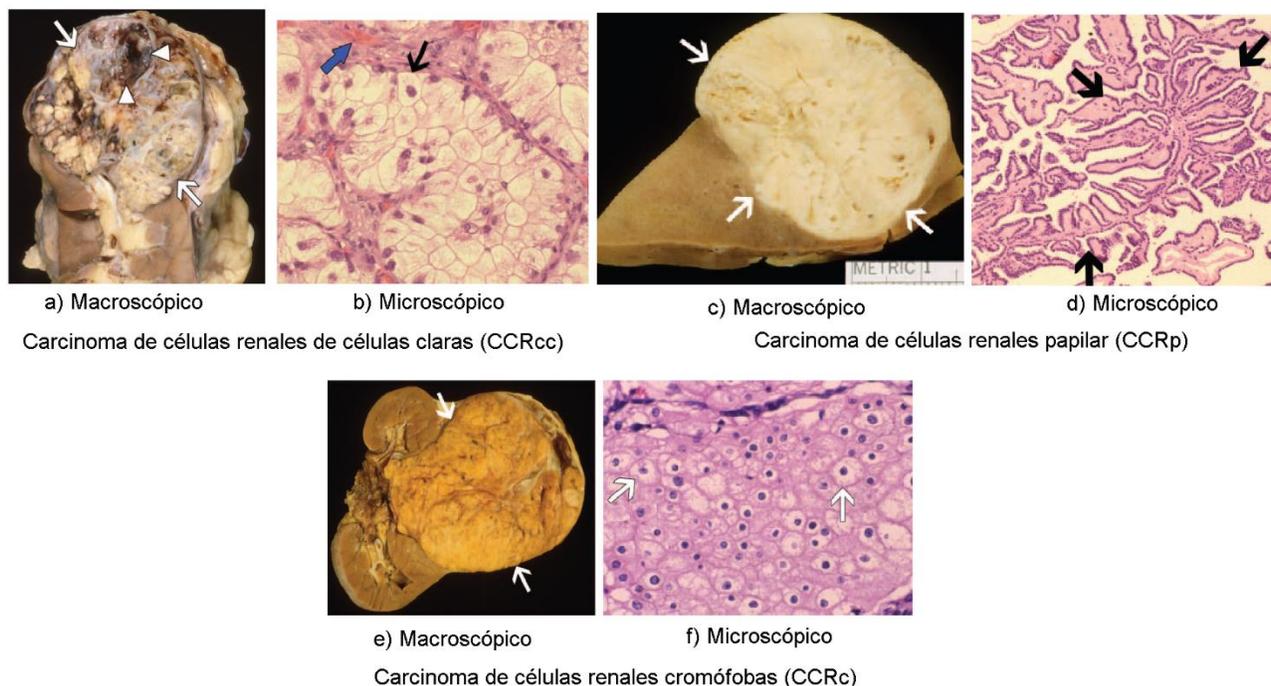


Figura 1. Apariencia macroscópica y microscópica de los carcinomas de células renales más comunes. Las flechas en las imágenes indican las características de los diferentes subtipos de CCR descritos a continuación **a)** CCRcc macroscópico con necrosis (triángulos) y hemorragia (flechas); **b)** CCRcc microscópico con citoplasma claro (flecha negra) y gran vasculatura (flecha azul) **c)** CCRp macroscópico se presenta como una masa blanca **d)** CCRp microscópico con papilas con núcleos fibrovasculares **e)** CCRc macroscópico con una coloración café-amarilla **f)** CCRc microscópico con halos perinucleares característicos (Prasad et al., 2006).

A nivel microscópico se caracteriza por estar compuesto de células con citoplasma claro, de donde toma su nombre, lo cual es resultado del procesamiento para el análisis histológico de rutina (tinción de hematoxilina & eosina) donde los lípidos, glucógeno y colesterol contenidos en el citoplasma se disuelven (Figura 1). En algunos de estos tumores puede haber una mezcla de células claras y células con citoplasma más eosinofílico, lo cual es común en tumores de alto grado que están adyacentes a áreas de necrosis o hemorragia (Moch et al., 2016).

A nivel molecular aproximadamente 90% de los tumores analizados de este subtipo presentan alteraciones en el gen supresor de tumores *VHL* (Warren & Harrison, 2018). En condiciones normales, pVHL, proteína codificada por este gen, regula la señalización celular bajo tensión

normal de oxígeno ubiquitinando al factor α inducible por hipoxia (HIF- α , por sus siglas en inglés) para su posterior degradación proteasomal. Este factor de transcripción regula la expresión río abajo de numerosos genes diana, importantes en la angiogénesis y mantenimiento de la homeostasis celular en condiciones hipóxicas, por lo que la pérdida de la función de pVHL, tiene como resultado la acumulación de HIF- α (Goyal et al., 2013).

2.3. Modelo *in vivo* de carcinogénesis renal inducida por DEN-FeNTA

El modelo de carcinogénesis renal inducida por DEN-FeNTA en ratas ha sido utilizado como una buena alternativa para el estudio de este tipo de cáncer *in vivo*. Se caracteriza por la aplicación de una dosis de N-dietilnitrosamina (DEN) (200 mg/kg pc) como iniciador y posteriores aplicaciones intraperitoneales de nitrilotriacetato férrico (FeNTA) (3-9 mg Fe/kg pc) como promotor durante 4 meses (Vargas-Olvera et al., 2012).

Por un lado, la DEN es un carcinógeno altamente tóxico y se considera un iniciador de cáncer renal en modelos animales. Su metabolismo se lleva a cabo por el Citocromo P450, y estimula la producción de un gran número de radicales libres que provocan daño al ADN, proteínas y lípidos llevando a una disfunción renal (Singh et al., 2021).

Por otro lado, el ácido nitrilotriacético es un ácido carboxílico que, a pH neutro, forma varios quelatos con iones metálicos. Su quelato con Fe^{+3} , el nitrilotriacetato férrico (FeNTA), es un agente nefrotóxico que causa necrosis aguda y subaguda en el túbulo proximal al catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la reacción de Fenton, favoreciendo la producción de radicales hidroxilos que desencadenan la peroxidación lipídica y daño al DNA antes mencionado (Athar & Iqbal, 1998).

Ambas sustancias se usan en conjunto para hacer más eficiente el proceso carcinogénico, y a pesar de que la DEN se identifica principalmente como un compuesto hepatotóxico, la aplicación conjunta de DEN con el FeNTA no produce daños hepáticos, sin embargo, sí estimula la carcinogénesis renal, lo cual sugiere que el hígado tiene mecanismos más robustos contra el estrés oxidante inducido por FeNTA (Okazaki, 2022).

En nuestro grupo de investigación se determinó que la aplicación de una dosis inicial de DEN seguida de 1 y 2 meses de tratamiento con el FeNTA representan etapas tempranas de la carcinogénesis, y que después de 4 meses de tratamiento más 2 meses sin este, se

desarrollan tumores renales con gran similitud histológica y otras características en común con el CCR del subtipo de células claras en humanos (Aguilar-Alonso et al., 2015; Pariente-Pérez et al., 2020; Vargas-Olvera et al., 2012) (Figura 2), que como se mencionó, es el subtipo con mayor incidencia.

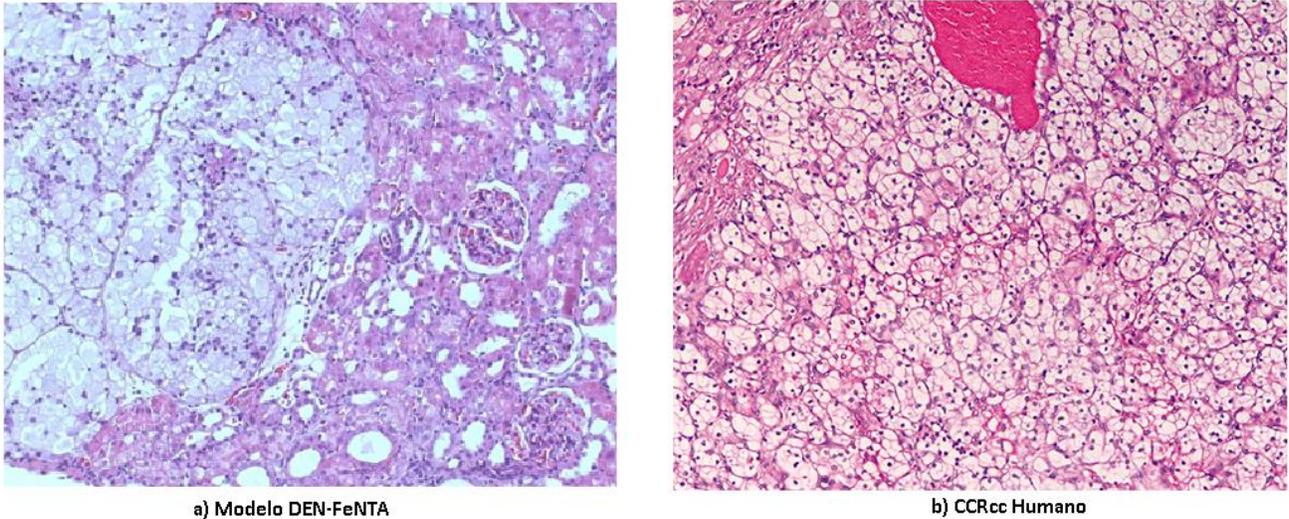


Figura 2. Comparación histológica del modelo DEN-FeNTA y el CCRcc humano Tinción de hematoxilina y eosina. 400x a) Tumor obtenido en el modelo DEN-FeNTA (Vargas-Olvera et al., 2012). b) Tumor primario de CCRcc humano (Mancini et al., 2008).

Adicionalmente, en estudios previos de nuestro grupo de investigación (datos aún no publicados) se encontró en este modelo que tanto en los tejidos de ratas en etapas tempranas de CCR, así como en los tumores, se presenta un aumento de la expresión de HIF- α y una disminución en la expresión de FIH, sin embargo, no observaron alteraciones en la expresión de pVHL. Toyokuni et al., (1998) encontraron en este mismo modelo experimental, que el gen de VHL no está mutado, lo cual refuerza la premisa de que la regulación de HIF- α podría ocurrir mediante mecanismos independientes de VHL.

Mientras que los modelos *in vivo* capturan la complejidad de los procesos cancerosos en un ser vivo, el análisis de eventos específicos es desafiante, y obtener información acerca de los mecanismos moleculares involucrados es usualmente complicado. En contraste, los modelos *in vitro* poseen una relevancia fisiológica más reducida, ya que capturan solo aspectos limitados al microambiente tumoral, sin embargo, permiten controlar de mejor manera las variables experimentales, lo que da lugar a un mejor análisis cuantitativo y una mejor comprensión de los mecanismos alterados (Katt et al., 2016). Además, las líneas celulares

proporcionan una herramienta de investigación de menor costo ya que poseen la ventaja de proveer un gran número de células para su análisis, en comparación con los estudios en animales de laboratorio, donde el número de muestras es más limitado (Brodaczewska et al., 2016; Shapiro et al., 2022).

Por otro lado, el tiempo requerido para llevar a cabo estudios *in vivo* en general es mucho mayor que aquellos *in vitro*. Debido a esto, nuestro grupo de investigación desarrolló una línea celular llamada RC5E a partir de los tejidos tumorales obtenidos del modelo *in vivo* antes mencionado, la cual se encuentra en proceso de caracterización.

2.4. Factor inducible por hipoxia (HIF)

Como se mencionó anteriormente, una de las alteraciones más comunes en el CCRcc se encuentra en el aumento de los niveles de HIF- α . Las proteínas HIF forman un grupo perteneciente a la familia PAS (Per-ARNT-Sim) de factores de transcripción evolutivamente conservados. Los miembros de este grupo funcionan como heterodímeros formados por una subunidad α sensible al oxígeno y una subunidad β constitutiva (ARNT). Se conocen 3 homólogos de la subunidad α (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α) y 2 de la subunidad β (HIF-1 β y HIF-1 β 2). Por un lado, HIF-1 α se expresa de forma ubicua, mientras que las subunidades HIF-2 α y HIF-3 α son específicas de algunos tejidos y líneas celulares. Por otro lado, de la misma manera que ocurre con los homólogos 2 y 3 de la subunidad α , la expresión de HIF-1 β 2 está restringida a algunos tejidos (Liao & Zhang, 2020; Mandl & Depping, 2014).

Bajo condiciones de oxigenación fisiológica normales (normoxia), la subunidad α es hidroxilada en los residuos Pro402 y Pro564 en HIF-1 α ; y Pro405 y Pro531 en HIF-2 α , ubicados en sus dominios de degradación dependiente de oxígeno (ODDD, por sus siglas en inglés) (Figura 3). Esta hidroxilación es llevada a cabo por prolil hidroxilasas que contienen el dominio prolil-4-hidroxilasa (PHD, por sus siglas en inglés); enzimas pertenecientes a la familia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, las cuales requieren de oxígeno molecular, Fe⁺² y ascorbato, para llevar a cabo la reacción, convirtiendo a la subunidad α en un elemento de señalización de los niveles de oxígeno (Haase, 2009). La hidroxilación de las prolinas sirve como marcaje para la unión de la proteína supresora de tumores VHL (pVHL) y su complejo que actúa como una ligasa de ubiquitina E3 para permitir la poliubiquitinación de HIF- α y su consecuente degradación proteasomal (Figura 4) (Liao & Zhang, 2020).

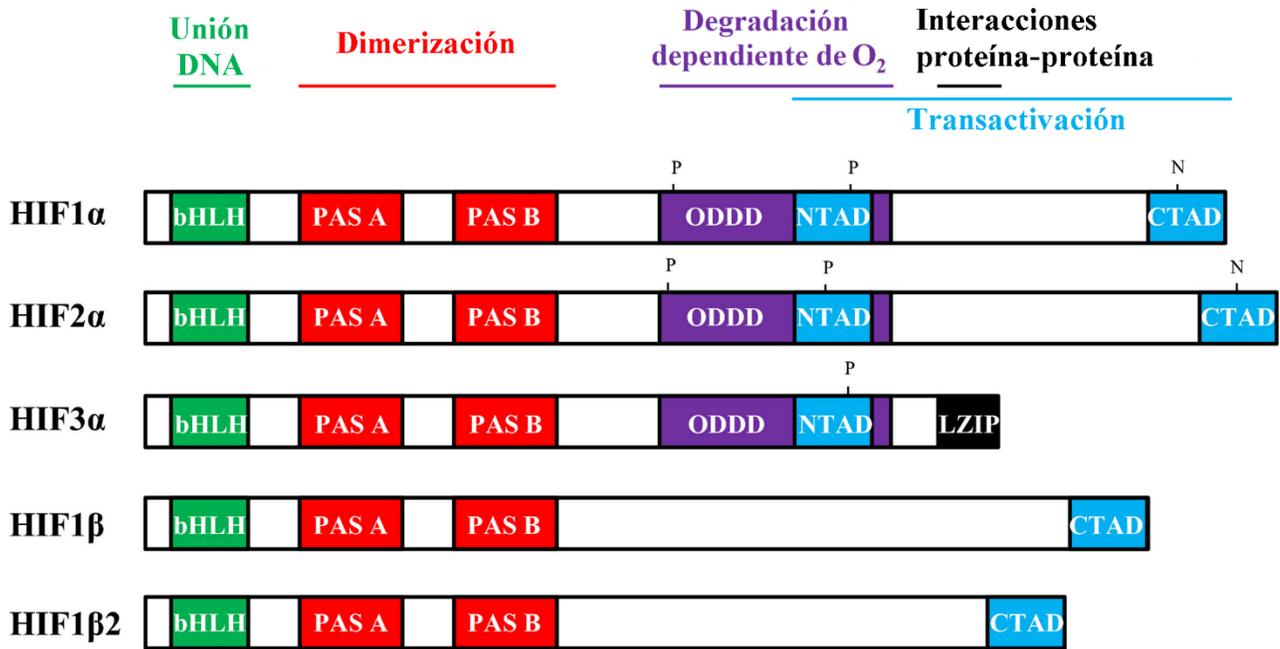


Figura 3. Dominios funcionales de las isoformas de HIF. bHLH: Dominio hélice-bucle-hélice básica; PAS: PER-ARNT-SIM; ODDD: Dominio de degradación dependiente de oxígeno; NTAD: Dominio de transactivación N-terminal; CTAD: Dominio de transactivación C-terminal; LZIP: Cremallera de Leucina (Adaptado de Ravenna et al., 2015).

Otro mecanismo que se activa bajo condiciones de normoxia se ejecuta en el dominio de transactivación del carboxilo terminal de la subunidad α (CTAD, por sus siglas en inglés) (Figura 3), donde ocurre otra hidroxilación dependiente de oxígeno llevada a cabo por una asparagil hidroxilasa llamada factor inhibidor de HIF (FIH) (Haase, 2009). FIH hidroxila a HIF-1 α y HIF-2 α en sus residuos Asn803 y Asn851 respectivamente; dicha hidroxilación inhibe la actividad transcripcional de HIF a través de la disrupción de la interacción del CTAD con los coactivadores p300 y la proteína de unión a CREB (CBP) (Figura 4) (Baldewijns et al., 2010).

En condiciones de concentraciones bajas de oxígeno (hipoxia), la hidroxilación de HIF- α llevada a cabo por las PHD y FIH no ocurre, impidiendo así la unión de HIF- α con pVHL, y por ende su subsecuente marcaje y degradación, lo que produce la acumulación del HIF- α . Al no degradarse, HIF-1 α y HIF-2 α se translocan al núcleo, donde se forman los heterodímeros con HIF- β , los cuales se unen con los elementos de respuesta a hipoxia (HRE, por sus siglas en inglés) en el ADN nuclear, y se reclutan los coactivadores p300/CBP al CTAD de HIF- α , promoviendo la transcripción de los genes blanco de HIF, los cuales están involucrados en distintas vías celulares relacionadas con crecimiento celular, angiogénesis, metabolismo de la glucosa, eritropoyesis, remodelación tisular, reparación de heridas, regulación de pH y

supervivencia/apoptosis celular (Figura 4) (Baldewijns et al., 2010; Liao & Zhang, 2020). Estos mecanismos de adaptación transcripcional permiten que las células o tejidos normales sobrevivan en un entorno deficiente de oxígeno. Sin embargo, por otro lado, pueden impulsar la progresión tumoral y muchos otros trastornos cuando se activan a pesar de que los niveles de oxígeno sean normales, denominado condiciones de pseudohipoxia, e induciendo expresión descontrolada de sus genes blanco (Hayashi et al., 2019).

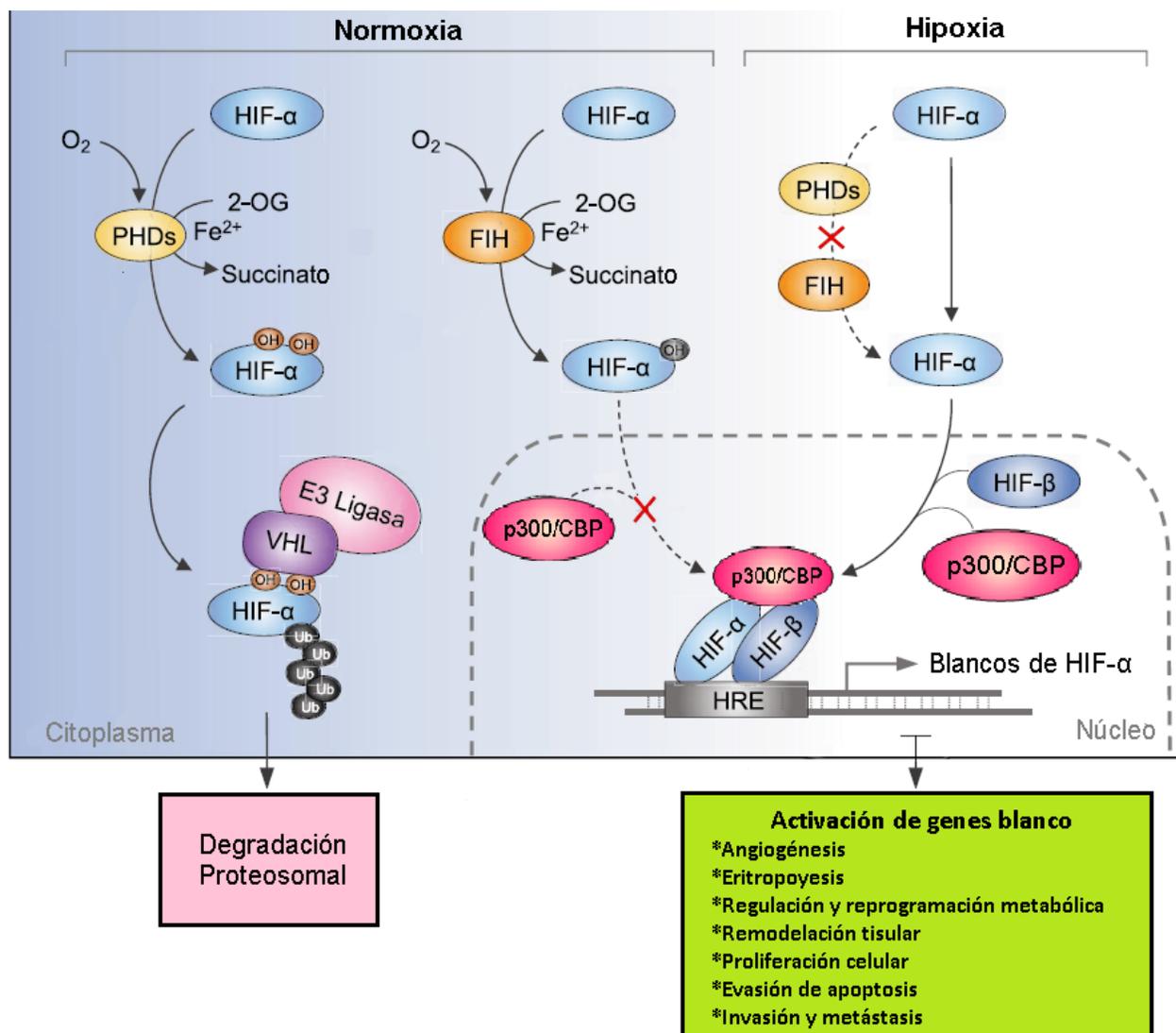


Figura 4. Vía de señalización HIF/VHL en condiciones de normoxia e hipoxia. HIF: Factor inducible por hipoxia; FIH: Factor Inhibidor de HIF; PHD: Prolil hidroxilasa; VHL: Proteína del gen Von Hippel-Lindau; CBP: Proteína de unión a CREB; HRE: Elemento de respuesta a hipoxia; 2-OG: 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato) (Adaptado de Liao & Zhang, 2020).

Debido a lo anterior, HIF juega un papel fundamental en promover varios procesos oncogénicos incluidos la proliferación celular, la reprogramación metabólica, la evasión de la

apoptosis, la transición epitelio-mesénquima, la invasión y la metástasis (Liao & Zhang, 2020). Por lo tanto, la estabilización anormal de HIF- α y la regulación positiva de sus genes diana se han descrito en un amplio espectro de tumores sólidos a medida que avanzan hacia la malignidad (Iommarini et al., 2017).

De acuerdo con lo antes mencionado, las alteraciones de *VHL* son un evento genético troncal que surge en la mayoría de los casos de CCRcc lo que demuestra que la pérdida de una o más de las funciones supresoras de pVHL, entre las que destaca la ubiquitinación de HIF- α como marcaje para su degradación, son fundamentales en el inicio de la formación, en estos casos, de los tumores renales. Mutaciones posteriores o alteraciones del número de copias cromosómicas en genes reguladores epigenéticos (incluidos *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2* y *KDM5C*), genes reguladores del ciclo celular (incluidos *TP53*, *CDKN2A* y *MYC*) o genes de la vía PI3K (incluidos *PIK3CA*, *PTEN*, *MTOR* y *TSC1*) surgen de forma recurrente en el CCRcc y se cree que cooperan con la inactivación de *VHL* para promover el desarrollo y la evolución de los tumores, ya que la inactivación únicamente de *VHL* no es suficiente para que se desarrolle este carcinoma (Baldewijns et al., 2010; Hoefflin et al., 2020).

Entre los eventos que conducen a la inactivación de *VHL*, ya sea mono-alélica (~20%) o bi-alélica (~70%), se encuentran las mutaciones, la pérdida del brazo corto del cromosoma 3 (3p) o alteraciones epigenéticas como la hipermetilación de sus promotores (Batavia et al., 2019). No obstante, alrededor del 10% de los casos de CCRcc no presentan alteraciones en *VHL*, es decir, presentan un genotipo de *VHL* silvestre (*wt-VHL*, por sus siglas en inglés) (Figura 5) (Batavia et al., 2019).

La presencia de *wt-VHL* se ha relacionado con un fenotipo más agresivo de la enfermedad y en consecuencia peores tasas de supervivencia, aunque la información disponible al respecto aún es escasa (Dagher et al., 2016). Asimismo, se ha observado que los niveles de HIF- α se encuentran alterados en CCRcc incluso en casos con *wt-VHL* (Shinojima et al., 2007), lo cual sugiere la presencia de mecanismos de regulación de HIF- α independientes de *VHL*.

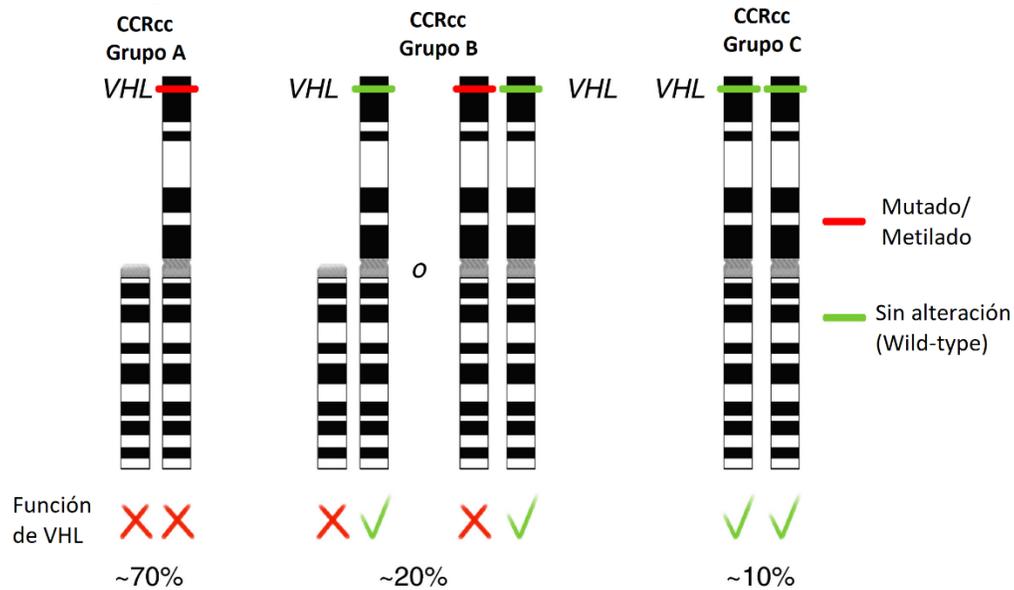


Figura 5. Estado del gen *VHL* en CCRcc. El grupo A presenta una inactivación bialélica de *VHL* correspondiente a aproximadamente 70% de los casos, el grupo B presenta una inactivación monoalélica correspondiente a aproximadamente 20% de los casos, mientras que el grupo C presenta un estado silvestre (wild-type) en ambos alelos del gen *VHL* correspondiente al 10% de los casos (Adaptado de Batavia et al., 2019).

2.5. Homólogo de seven in absentia (SIAH) y la regulación de HIF- α

Uno de los mecanismos que se han identificado para explicar la acumulación de HIF- α en diferentes tipos celulares sin alteraciones reportadas en pVHL, es a través de la actividad de las proteínas homólogas de seven in absentia (SIAH) (Nakayama et al., 2004).

El gen *seven in absentia (sina)* fue inicialmente descrito en *Drosophila melanogaster*, donde se identificó su participación en el desarrollo del fotorreceptor R7, y un par de años más tarde se encontró un homólogo de este gen en ratones al cual se denominó *SIAH* (Della et al., 1993). A través de análisis filogenéticos se ha determinado que la proteína SINA presente en invertebrados es un ortólogo de la familia de proteínas SIAH de vertebrados (Pepper et al., 2017).

Las proteínas SIAH pertenecen a una familia de ligasas de ubiquitina E3 que en humanos está compuesta por las proteínas SIAH1, SIAH2 y SIAH3. Estas proteínas poseen regiones amino terminales divergentes con longitudes que van de los 40 a los 80 aminoácidos, no obstante, el resto de la cadena está altamente conservada entre los miembros de la familia (Siswanto et al., 2018).

De manera general, las proteínas SIAH tienen 4 dominios funcionales bien conservados: un dominio Really Interesting New Gen (RING, por sus siglas en inglés), responsable de su actividad catalítica como ligasa de ubiquitina E3; un dominio dedos de zinc tipo SIAH (SZF, por sus siglas en inglés), relacionado con interacciones proteína-proteína y unión al ADN, el cual está compuesto de dos motivos dedos de zinc; y un dominio seven in absentia (Sina, por sus siglas en inglés), el cual consiste en un dominio de unión del sustrato (SBD, por sus siglas en inglés) y un dominio de dimerización (DIMER), el cual permite la formación de homodímeros y heterodímeros entre las proteínas SIAH (Figura 6) (Pepper et al., 2017; Siswanto et al., 2018). Sin embargo, a diferencia de SIAH1 y SIAH2, el ortólogo SIAH3 carece del dominio catalítico funcional RING, en cambio, posee solo un motivo dedo de zinc y un motivo rico en histidina, por lo cual, se considera una variante enzimáticamente inactiva (Li et al., 2022; Schmitz et al., 2022).



Figura 6. Dominios funcionales de las proteínas de la familia SIAH. RING: Really Interesting New Gen; SINA: Seven in absentia (Adaptado de Siswanto et al., 2018)

Se han identificado más de 30 sustratos de SIAH1 y SIAH2, muchos de ellos relacionados con diferentes vías de señalización que se encuentran desreguladas en diversos tipos de cáncer, entre los que destacan PHD y FIH, los cuales, como se mencionó anteriormente, están involucrados en la regulación de la función de HIF- α (Qi et al., 2013).

Debido a la gran similitud entre sus secuencias, SIAH1 y SIAH2 comparten algunos de sus sustratos, no obstante, diferencias en algunos residuos de aminoácidos en su dominio SBD les confieren distintas afinidades por los sustratos comunes, e incluso les permite tener sustratos específicos de cada proteína (Gopalsamy et al., 2014; Li et al., 2022). Estas diferencias entre la especificidad y la afinidad por distintos sustratos se han sugerido como

explicación de los roles opuestos en la progresión del cáncer que se han observado en ambas isoformas (Gopalsamy et al., 2014) .

En la Tabla 2 se refieren algunos estudios en los que se ha establecido la relación de SIAH con diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, de mama, próstata, colorrectal, pulmón y páncreas, e incluso en algunos de ellos se propone a SIAH como un blanco terapéutico (Li et al., 2022); sin embargo, se desconoce, hasta donde sabemos, su comportamiento en el CCR.

Tabla 2. Papel de SIAH en diferentes tipos de cáncer.

Tipo de cáncer	SIAH1	SIAH2
Mama	Tanto SIAH1 como SIAH2 tienen un papel promotor de tumores con un fenotipo agresivo de cáncer de mama (Adam et al., 2015).	
	La sobreexpresión de SIAH1 induce la apoptosis por la regulación del nivel de BIM a través de la activación de la vía de JNK; mientras que su supresión incrementa la invasión a través de la activación de la vía de ERK en células (Wen et al., 2010).	La ausencia de SIAH2 disminuye la angiogénesis mediada por HIF1- α en un modelo de ratón de cáncer de mama (Wong et al., 2012).
Colorrectal	La sobreexpresión de SIAH1 inhibe la proliferación e invasión <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ; mientras que su baja expresión se ha asociado con un fenotipo más agresivo (Xiao et al., 2020).	SIAH2 promueve la proliferación celular, migración e invasión (Hu et al., 2022).
Próstata	Tanto SIAH1 como SIAH2 son requeridas para el desarrollo de tumores neuroendocrinos de próstata. Sin embargo, la falta de SIAH2 retrasa el desarrollo en etapas tempranas (Qi et al., 2010).	
Pulmón	El silenciamiento de SIAH1 inhibe el crecimiento de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Liu et al., 2022).	La deficiencia de SIAH-2 reduce la señalización de MAPK e inhibe la proliferación celular (Ahmed et al., 2008).
Páncreas	SIAH1 inhibe la expresión de WISP1, la cual se ha asociado a una peor prognosis (Wu et al., 2018).	La inhibición de SIAH2 detiene el crecimiento de tumores pancreáticos (Zheleva et al., 2014).
Carcinoma de Células Renales	N.D.	N.D.

ND: No determinado

3. Justificación

A pesar de que se ha reportado que en los tumores renales obtenidos de ratas tratadas con FeNTA se presenta la forma silvestre de pVHL, uno de los principales reguladores negativos de HIF- α , estudios previos han mostrado un aumento en los niveles de este factor en dichos tumores. Esto sugiere que mecanismos independientes de pVHL parecen estar involucrados en su regulación.

Con base en lo anterior, se consideró importante determinar el comportamiento de HIF- α en la línea celular RC5E, aislada de los tumores inducidos con FeNTA, y analizar moléculas río arriba de pVHL que pudieran estar involucradas en su regulación. Se seleccionaron las isoformas 1 y 2 de SIAH, ligasas de ubiquitina que tienen como sustratos a PHD y a FIH, las cuales son hidroxilasas que se relacionan de forma negativa con la estabilidad y actividad de HIF- α respectivamente. De hecho, estas isoformas de SIAH resultan de particular interés ya que se ha demostrado su participación en diferentes tipos de cáncer, no obstante, su comportamiento en el CCR se desconoce.

4. Hipótesis

El incremento de los niveles de HIF-1 α y HIF-2 α estará relacionado con un aumento en los niveles de SIAH1 y SIAH2, independientemente del estado de pVHL.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Analizar el comportamiento de HIF-1 α y HIF-2 α , y su posible asociación con los niveles de SIAH1 y SIAH2 en una línea celular de CCR inducido químicamente en rata.

5.2. Objetivos particulares

1. Establecer el cultivo de las líneas celulares de CCR humano ACHN y 786-O en nuestro laboratorio (Las líneas celulares de rata NRK-52E y RC5E ya están establecidas).
2. Determinar los niveles de HIF-1 α y HIF-2 α en las cuatro líneas celulares.
3. Analizar los niveles de SIAH1 y SIAH2 en RC5E, NRK-52E, ACHN y 786-O.

6. Metodología

6.1. Cultivos celulares

Se emplearon las líneas celulares de rata, NRK-52E (ATCC, No. Cat. CRL-1571) derivada de un epitelio renal no tumoral, la cual se utilizó como referencia de expresión en rata y la línea celular RC5E (obtenida por nuestro grupo de investigación) derivada de un tumor de CCRcc de rata tratada con FeNTA. Adicionalmente, se utilizaron las líneas celulares de origen humano, ACHN (ATCC, No. Cat. CRL-1611) derivada de una efusión pleural metastásica de un adenocarcinoma renal con *VHL*^(+/+) y 786-O (ATCC, No. Cat. CRL-1571) derivada de un tumor de CCRcc con *VHL*^(-/-) como referencia de los niveles de las proteínas de interés en humano bajo distintos contextos del gen *VHL*.

Las células fueron cultivadas a 37°C y CO₂ al 5% en medio DMEM alto en glucosa suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 9%, aminoácidos no esenciales (0.1 mM) y antibiótico antimicótico (1%). Las marcas y preparación del medio de cultivo se detallan en el Anexo 9.1.1.

6.2. Preparación de extractos celulares completos

Las células se llevaron a una confluencia aproximada del 90%. Se descartó el medio de cultivo y se realizó un enjuague con amortiguador salino de fosfatos pH 7.4 (PBS, por sus siglas en inglés) a temperatura ambiente, asegurando la eliminación total del PBS con ayuda de una micropipeta. Inmediatamente, se colocó la caja de cultivo sobre una cama de hielo, donde se llevó a cabo el resto del proceso de extracción, y se añadieron 300 µL de amortiguador de lisis para ensayos de radio inmunoprecipitación (RIPA, por sus siglas en inglés) adicionado con inhibidores de proteasas, procurando su distribución homogénea sobre la caja, y se dejó actuar por 15 minutos realizando de forma ocasional movimientos gentiles. Con ayuda de un raspador de células se colectó el contenido de la caja y se transfirió a un microtubo donde se dejó reposar por 30 minutos en hielo. Finalmente, se centrifugó el lisado a 10,000 x g durante 10 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta su uso. Para el caso de las líneas RC5E y 786-O se combinó el contenido de dos cajas de cultivo de 10 cm de diámetro para obtener una concentración adecuada de proteínas totales para su uso.

6.3. Cuantificación de proteínas totales (Método de Lowry)

La determinación de proteínas totales se realizó empleando el método de Lowry adaptado a microplaca de 96 pocillos. La concentración se determinó usando como referencia una curva de calibración preparada con albúmina sérica bovina libre de IgG (ASB) cuya preparación se detalla en el Anexo 9.3. Se colocaron 100 μ L de muestra previamente diluida en agua desionizada (FD=50) a la cual se añadieron 200 μ L de reactivo de Biuret, se homogeneizó con ayuda de una micropipeta y se dejó reposar por 10 minutos. Posteriormente se añadieron 20 μ L de reactivo de Folin (1:1) y se homogeneizó nuevamente. Luego de 30 minutos se leyó la absorbancia a 750 nm con ayuda de un lector de microplacas (Epoch, BioTek). Los resultados se expresan en microgramos equivalentes de ASB por microlitro (μ g ASB/ μ L).

6.4. Electroforesis SDS PAGE

La preparación y composición de los geles se detalla en el Anexo 9.2. A grandes rasgos, un día previo a la realización de la técnica se prepararon geles de poliacrilamida para electroforesis (PAGE, por sus siglas en inglés) de 1 mm de espesor, los cuales se componen de un gel de resolución (parte inferior) elaborado a una concentración de poliacrilamida entre el 8 y 13%, dependiendo de la proteína de interés (Tabla 3) y un gel concentrador (parte superior) a una concentración de poliacrilamida del 5%. Los geles se colocaron en la cámara de electroforesis donde se sumergieron en amortiguador para electroforesis hasta cubrirlos por completo y se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

Para la desnaturalización de las muestras en condiciones reductoras se mezcló un volumen de extracto proteico correspondiente a la cantidad de proteína deseada (Tabla 3) con 5 μ L de amortiguador de carga adicionado con 2-mercaptoetanol y se colocó por 15 minutos en un baño de agua hirviendo. Posteriormente, las muestras se colocaron en los geles previamente preparados, y se separaron a través de la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico entre 70 - 80 V hasta la salida del frente de corrimiento (azul de bromofenol) o hasta conseguir la separación deseada de acuerdo con el reactivo Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad, No. Cat. 161-0374) empleado como marcador de peso molecular.

6.5. Western blot

Se realizó la inmunodetección de las proteínas de interés a través de quimioluminiscencia, empleando anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés).

Se utilizó un sistema de transferencia semi-seca (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell 1703940, Bio-Rad) al cual se aplicó una corriente de 200 mA por aproximadamente 2 h para transferir las proteínas separadas previamente por electroforesis a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 8.3 cm x 5.7 cm, la cual fue previamente activada sumergiéndola en metanol (5 min), hidratada con agua desionizada (2 min) y equilibrada con amortiguador de transferencia (15 min).

Una vez completada la transferencia, con ayuda de unas pinzas, se llevó la membrana a un recipiente con tapa y se bloqueó la membrana, para evitar interacciones inespecíficas, con 10 mL de una solución de leche descremada o ASB en PBS-Tween 20 (PBST) a la concentración requerida dependiendo de la proteína de interés (Tabla 3), manteniéndola en agitación por 1 h y después se realizaron 3 enjuagues secuenciales de 15 minutos con 5 mL de PBST. Finalmente, la membrana se incubó con los anticuerpos primario y secundario de acuerdo con lo indicado en la Tabla 3 realizando lavados con PBST, antes y después de la incubación con el anticuerpo secundario, según lo descrito previamente. La detección se realizó en un fotodocumentador (c-Digit 3600, Li-Cor) utilizando como reactivo revelador una mezcla de sustrato Immobilon quimioluminiscente de HRP para "Western" (Merck Millipore, No. Cat. WBKLS0500).

6.6. Normalización y análisis densitométrico del western blot

Se procesaron las imágenes y se determinó la intensidad de las bandas obtenidas mediante western blot con ayuda del software Image Studio Digits 5.2 (Li-Cor).

Posteriormente, los datos se normalizaron utilizando como control la proteína total, a través de una tinción con Ponceau S. En un recipiente con tapa se incubó la membrana con 10 mL de una solución de Ponceau S (0.01%) por 2 minutos en agitación constante, una vez finalizado el tiempo se descartó la solución y se retiró el excedente mediante un enjuague con 2 mL de PBST, sin rebasar los 15 s de contacto para evitar el desteñido de la membrana. Ésta se colocó un acetato y se obtuvo la imagen a través de un escáner de cama plana (LaserJet Pro MFP M127fn, HP). Una vez obtenida la imagen, se destiñó la membrana a través de 3 enjuagues consecutivos de 5 min con PBST. Los cálculos de la intensidad relativa normalizada se detallan en el Anexo 9.4. Para la comparación de la intensidad relativa se realizó una prueba t-student de dos colas ($\alpha=0.05$) y se graficó con ayuda del software GraphPad Prism 9.5.1.

Tabla 3. Condiciones de electroforesis y western blot para la identificación de las proteínas de interés

Proteína	VHL	HIF-1 α	HIF-2 α	SIAH1	SIAH2 (Rata)	SIAH2 (Humano)
Cantidad de proteína (μ g)	85	80	80	50	70	80
% Acrilamida en gel	13	8	8	10	8	9
Voltaje electroforesis (V)	80					100
Bloqueo	Albúmina sérica bovina 3%	Leche descremada 1%	Leche descremada 1%	Leche descremada 7%	Albúmina sérica bovina 1%	Leche descremada 8%
Tiempo de bloqueo	1 h					
Anticuerpo primario	Anti-VHL (SCBT, No. Cat. SC-135657)	Anti-HIF-1 α (SCBT, No. Cat. SC-13515)	Anti-HIF-2 α /EPAS1 (SCBT, No. Cat. SC-13596)	Anti-SIAH1 (Abcam, No. Cat. ab-2237)	Anti-SIAH2 (SCBT, No. Cat. SC-81787)	Anti-SIAH2 (SCBT, No. Cat. SC-81787)
Dilución	1:750	1:200	1:200	1:2500	1:150	1:140
Incubación	40-48 h (4 °C)	40-48 h (4 °C)	40-48 h (4 °C)	20 h (4°C)	20 h (T.A.)	20 h (4°C)
Anticuerpo secundario	Anti-ratón-HRP (SCBT, No. Cat. SC-2005)			Anti-cabra-HRP (SCBT, No. Cat. SC-2354)	Anti-ratón-HRP (SCBT, No. Cat. SC-2005)	
Dilución	1:50,000	1:30,000	1:30,000	1:15,000	1:60,000	1:70,000
Incubación	1 h (T.A)					

SCBT. Santa Cruz Biotechnology; T.A. Temperatura ambiente

7. Resultados y discusión

7.1. Cultivo de líneas celulares

En la Figura 7 se muestran las imágenes en microscopía de campo claro de los cultivos celulares empleados para el estudio a una confluencia mayor al 75%, los cuales se adaptaron para su desarrollo en medio de cultivo DMEM alto en glucosa y bajo condiciones de normoxia. En la figura se aprecia que existen ciertas similitudes en la morfología de las líneas ACHN y NRK-52E, entre las que destaca una apariencia de distribución tipo epitelial, con células pequeñas, ordenadas y con abundantes puntos de contacto; mientras que las líneas RC5E, y 786-O presentan, bajo estas condiciones de cultivo, una distribución más desordenada con un número menor de puntos de contacto entre las células con una apariencia que se asemeja más a la de tipo fibroblástica.

7.2. Estado de pVHL y niveles de las isoformas 1 y 2 de HIF- α

Debido a que, como se mencionó anteriormente, pVHL es reconocido como uno de los principales reguladores de los niveles de HIF- α , se realizó la inmunodetección de esta proteína con el fin de confirmar su expresión en las diferentes líneas de rata y humano analizadas. En la Figura 8 se muestran imágenes representativas de los western blots realizados.

En NRK-52E y RC5E se observó una banda con un peso molecular aproximado de 19.3 kDa, mientras que para ACHN la banda obtenida fue de un peso molecular aproximado de 23.5 kDa. A pesar de que la información experimental disponible acerca de pVHL en rata es escasa, se ha determinado a partir de la secuencia predicha por el gen que la codifica, que esta tiene una longitud de 185 aa (21 kDa), en comparación con su homólogo humano que tiene 213 aa (24 kDa), esta disparidad se debe principalmente a una región cercana al extremo N-terminal de la proteína humana, donde existe un motivo ácido repetido 8 veces, mientras que este motivo en la proteína de rata solo se encuentra en 1 ocasión (Duan et al., 1995), lo cual explica la observación de bandas de diferente peso molecular entre las líneas de origen humano y de rata.

Los resultados obtenidos en células de rata son similares a lo reportado por Shiao et al., (2002) quienes identificaron una banda de 20 kDa en la línea celular NRK y en muestras de riñón de rata. Asimismo, la confirmación de la expresión de pVHL en RC5E (Figura 8A) fue acorde a lo previamente encontrado por nuestro grupo de investigación, donde se identificó la presencia

de pVHL en muestras de tumores derivados del modelo de inducción de CCR por DEN-FeNTA (datos aún no publicados). De igual forma, esto corresponde con lo previamente descrito por Toyokuni et al., (1998), quienes no encontraron mutaciones en el gen *VHL* en riñón derivadas del tratamiento con FeNTA.

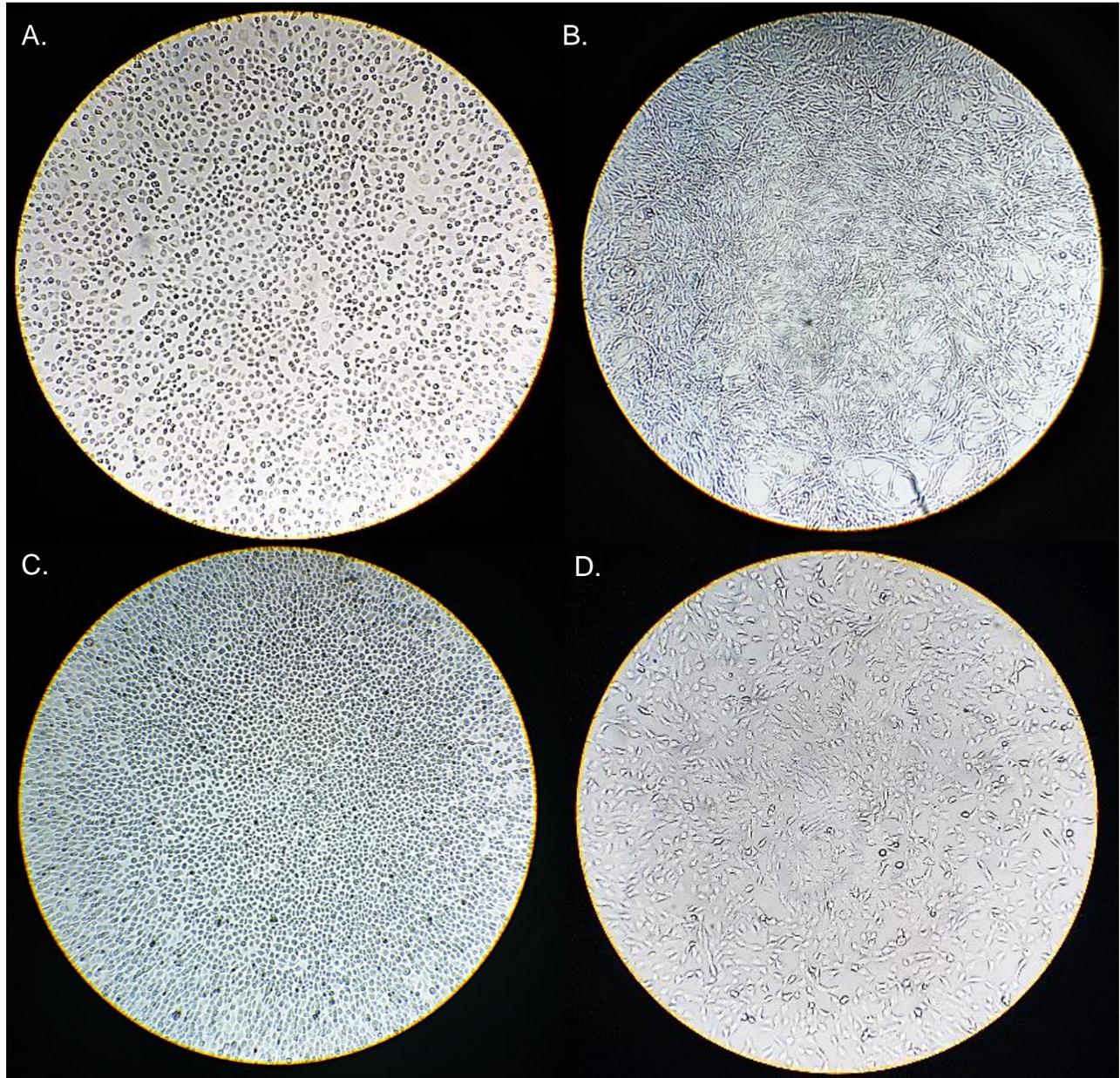


Figura 7. Líneas celulares bajo microscopio óptico de campo claro. Imágenes obtenidas por microscopía de campo claro a una amplificación de 100X de los cultivos celulares con una confluencia mayor al 75%, desarrollados bajo condiciones de normoxia. **A)** NRK-52E (Epitelio no tumoral de rata); **B)** RC5E (CCR inducido químicamente en rata); **C)** ACHN (CCR humano *VHL*^{+/+}); **D)** 786-O (CCR humano *VHL*^{-/-}).

Por otro lado, en las líneas celulares humanas, conforme a lo esperado, se encontró a pVHL expresada en ACHN, mas no se observó en 786-O (Figura 8B). Este resultado coincide con reportes previos donde se indica que ACHN expresa la forma silvestre de pVHL, mientras que 786-O tiene un genotipo *VHL*^(-/-) y, por lo tanto, no expresa la proteína (Ding et al., 2018).

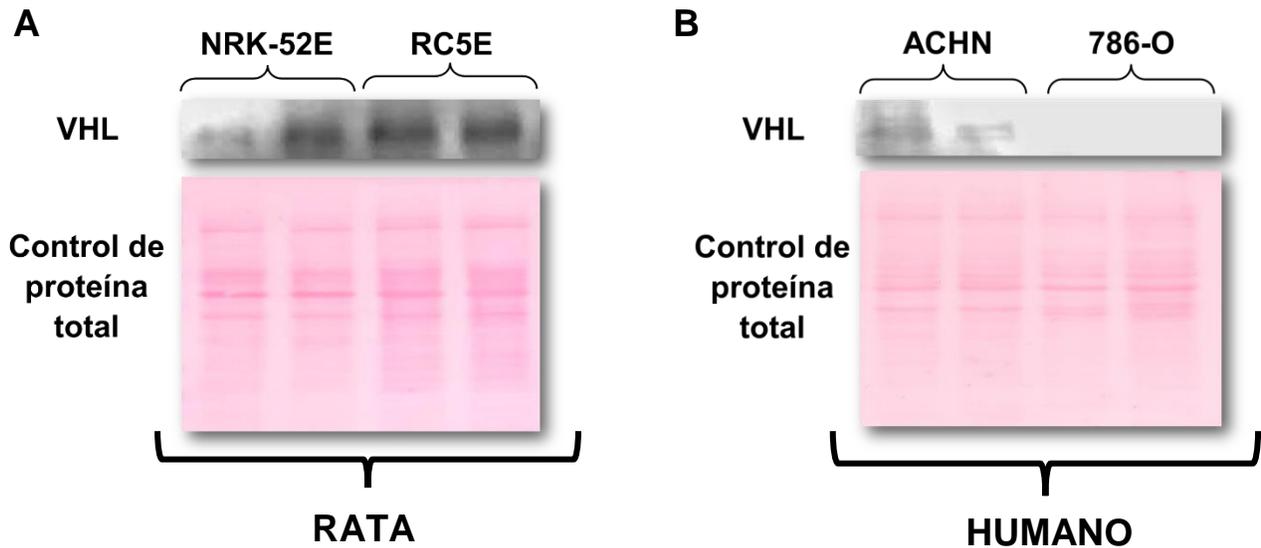


Figura 8. Expresión de la proteína pVHL en líneas celulares de CCR. Imágenes representativas de un análisis de western blot de pVHL en las líneas celulares de rata NRK-52E y RC5E (19.3 kDa) (A); y en las líneas celulares de humano ACHN (*VHL*^{+/+}) y 786-O (*VHL*^{-/-}) (23.5 kDa) (B) Todas las líneas fueron cultivadas bajo condiciones de normoxia.

Una vez confirmado el estado de pVHL de las muestras se procedió a determinar mediante western blot los niveles de las isoformas 1 y 2 de HIF- α . Se identificó en las líneas RC5E y 786-O una banda de un peso molecular aproximado de 105 kDa en el caso de HIF-1 α (Figura 9) y de 106 kDa para HIF-2 α (Figura 10); mientras que para NRK-52E y ACHN no se observó dicha banda en ninguna de las dos isoformas.

De acuerdo con la base de datos UniProt las proteínas HIF-1 α y HIF-2 α tienen un peso molecular calculado de 93 kDa y 97 kDa, respectivamente, para ambas especies (Bateman et al., 2023), sin embargo, se ha reportado que las dos isoformas son susceptibles de diversas modificaciones postraduccionales, algunas de las cuales solo ocurren bajo condiciones de normoxia, entre las que destacan diversas hidroxilaciones, fosforilaciones y acetilaciones (Albanese et al., 2021); es por ello que el peso molecular al que son reportadas en la literatura es comúnmente mayor al descrito para la proteína sin modificaciones en las bases de datos.

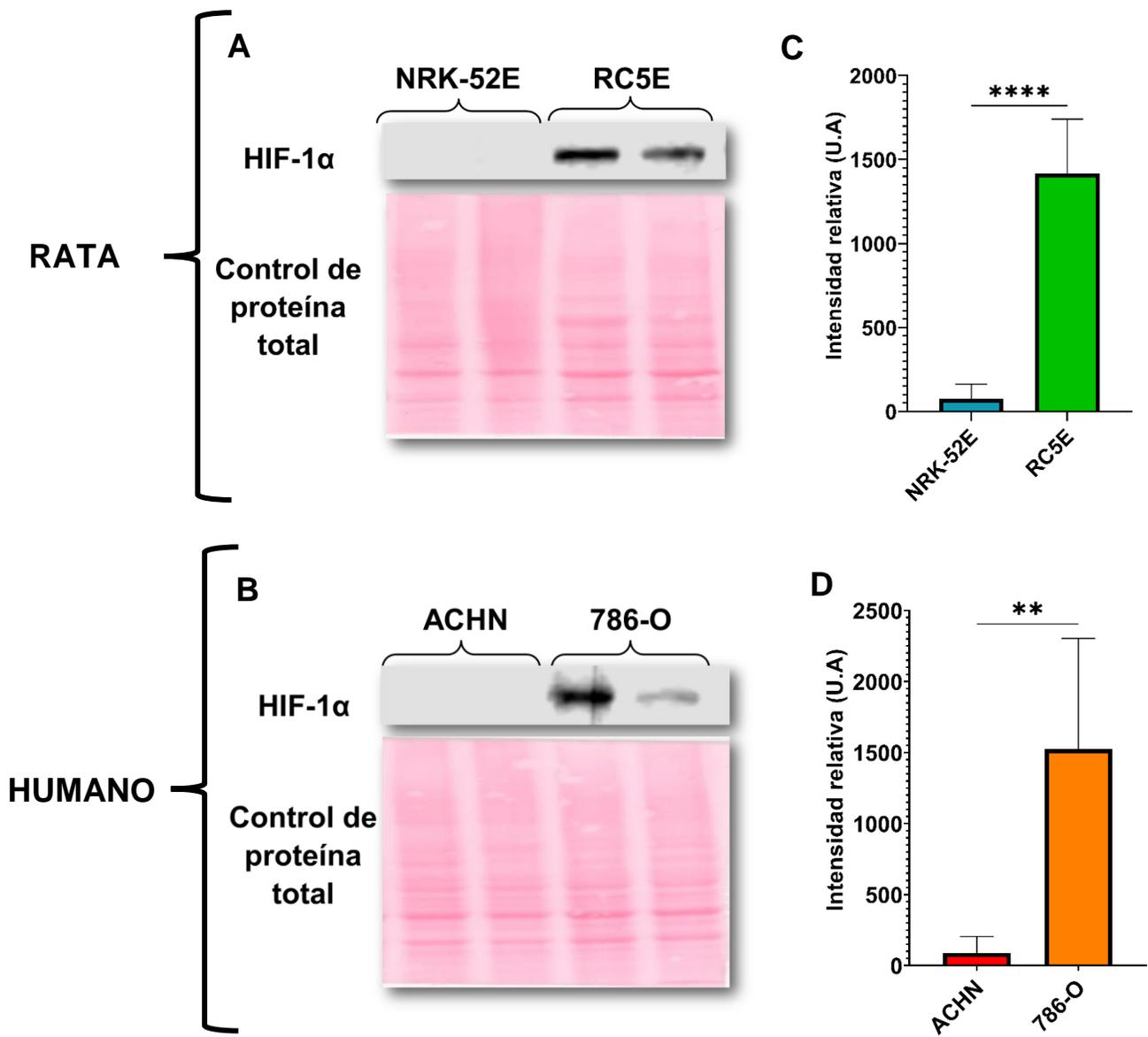


Figura 9. Niveles de HIF-1 α en líneas celulares de CCR. Imagen representativa del análisis por western blot de HIF-1 α (105 kDa) en líneas celulares de rata, NRK-52E (n=5), como control de expresión no tumoral y RC5E (n=6) (**A**); y en líneas de CCR humano, ACHN (*VHL*^{+/+}) (n=5) y 786-O (*VHL*^{-/-}) (n=4) (**B**) cultivadas bajo condiciones de normoxia. Las membranas fueron teñidas con Ponceau-S P como control del análisis densitométrico. Los gráficos muestran el análisis densitométrico de HIF-1 α expresado como $\bar{x} \pm$ D.E. en unidades arbitrarias de intensidad relativa para las líneas celulares de rata (**C**) y humano (**D**). El análisis estadístico se realizó a través de una t de student de dos colas; los asteriscos entre barras representan una diferencia significativa (p<0.05).

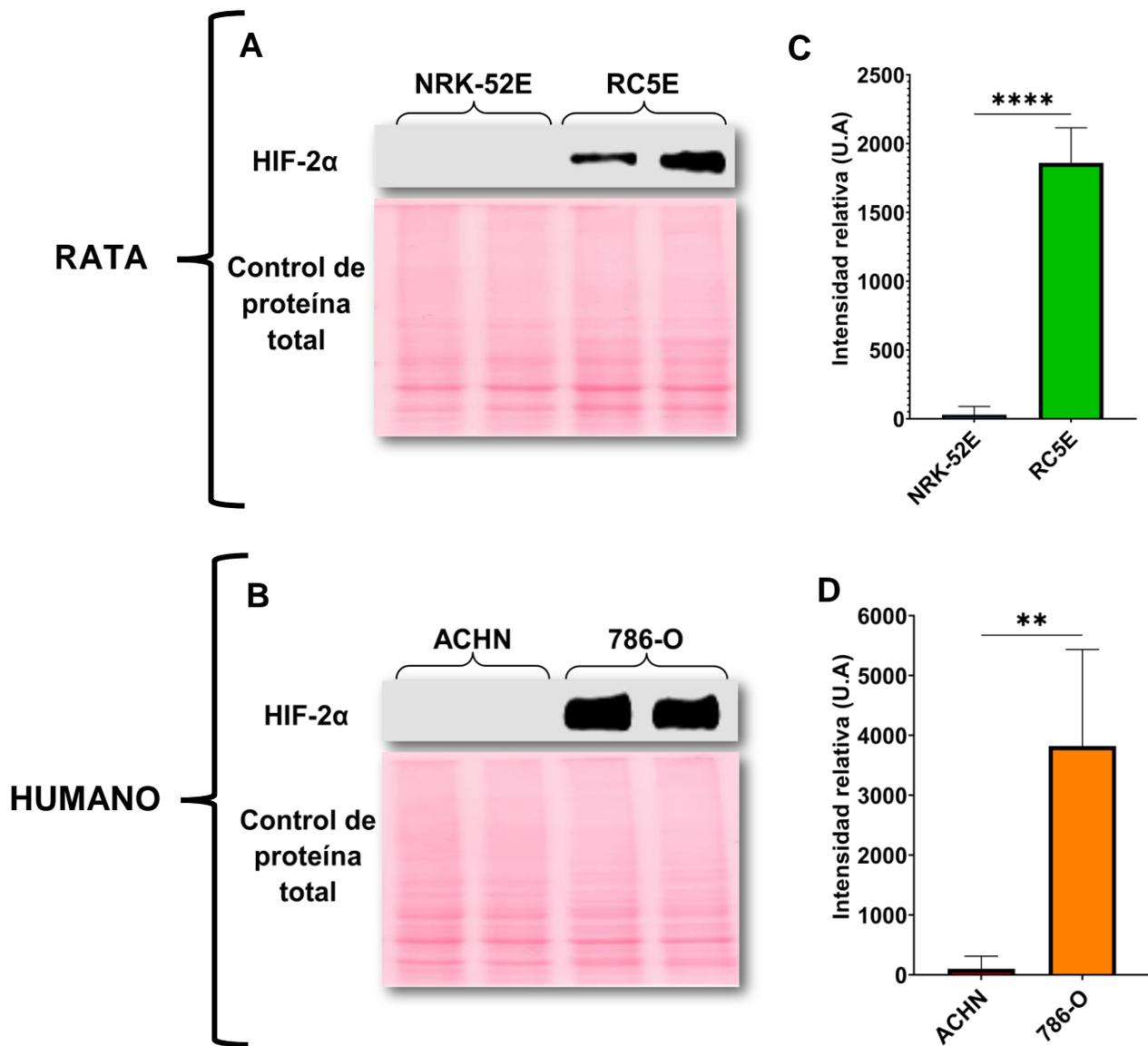


Figura 10. Niveles de HIF-2α en líneas celulares de CCR. Imágenes representativas del análisis por western blot de HIF-2α (106 kDa) en líneas celulares de rata, NRK-52E (n=5), como control de expresión no tumoral, y RC5E (n=6) (**A**); y en líneas de CCR humano, ACHN (*VHL*^{+/+}) (n=5) y 786-O (*VHL*^{-/-}) (n=4) (**B**) cultivadas bajo condiciones de normoxia. Las membranas fueron teñidas con Ponceau-S P como control del análisis densitométrico. Los gráficos muestran el análisis densitométrico de HIF-2α expresado como $\bar{x} \pm D.E.$ en unidades arbitrarias de intensidad relativa para las líneas celulares de rata (**C**) y humano (**D**). El análisis estadístico se realizó a través de una t de student de dos colas; los asteriscos entre barras representan una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Debido a que las muestras utilizadas pertenecen a dos especies distintas, estas presentan diferencias intrínsecas importantes en los niveles de proteínas de expresión constitutiva tales como α -tubulina y GAPDH (datos no mostrados), por lo que no se consideraron un adecuado control de carga para el western blot. Por lo anterior, se utilizó como control de carga la tinción

con Ponceau S de las proteínas totales en las membranas, la cual, se utilizó también para la normalización de los datos y posterior cuantificación (la descripción del proceso de normalización se encuentra en la sección 6.6 y el anexo 9.4). Este método de normalización ha mostrado mejorar la exactitud en la cuantificación con respecto al uso de proteínas de expresión constitutiva, en especial en muestras heterogéneas, ya que esta estrategia combina la intensidad de múltiples bandas electroforéticas normalizando la variación biológica (Bettencourt et al., 2020; Sander et al., 2019).

Para la cuantificación de las imágenes de western blot se realizó un análisis densitométrico, se graficó la intensidad relativa normalizada de las bandas como se describe en la metodología y se compararon los niveles de las proteínas entre las líneas celulares de la misma especie. Los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo en los niveles de HIF-1 α (Figura 9C) y HIF-2 α (Figura 10C) en RC5E, con respecto de su control de epitelio renal no tumoral de rata NRK52E. De la misma forma ocurrió con las líneas celulares de origen humano, donde se observó una diferencia significativa entre los niveles de ACHN y 786-O (Figura 9D y Figura 10D).

La ausencia de HIF- α en los extractos de NRK-52E y ACHN se puede explicar a través del mecanismo canónico de regulación de la estabilidad de HIF- α (Figura 4), en la cual, bajo condiciones de tensión normal de oxígeno, es marcado por pVHL para su degradación proteasomal (Baldewijns et al., 2010). Estos datos son similares a lo reportado previamente por otros autores quienes, encontraron una expresión muy baja, o la ausencia de bandas en condiciones de normoxia en estas líneas celulares para ambas isoformas de HIF- α (Han et al., 2020; Natarajan et al., 2021; Tanaka et al., 2014; Zhan et al., 2021; Zhu et al., 2021).

En la Figura 9 se puede apreciar la presencia de HIF-1 α en la línea 786-O. Sin embargo, la expresión de HIF-1 α en la línea 786-O ha sido tema de debate científico, ya que algunos autores señalan expresa de forma estable a HIF-2 α , pero no a HIF-1 α (Khan et al., 2011; Shinojima et al., 2007); pero otros autores sí han identificado la expresión de HIF-1 α además de la de HIF-2 α (Song et al., 2011; Zhan et al., 2021), al igual que lo observado en el presente trabajo. Ahora bien, al comparar las figuras 9B y 10B se puede apreciar que, a pesar de que ambas isoformas están presentes en esta línea, la banda es más intensa para HIF-2 α . Interesantemente Swiatek et al., (2020) confirmaron una baja expresión de HIF-1 α en condiciones de normoxia en la línea 786-O pero identificaron también la presencia de una

forma trunca de esta proteína producto de alteraciones en el gen, por lo cual los autores sugieren que no se debe considerar a 786-O como una línea que no expresa a HIF-1 α . Más aún, aunque ambas isoformas de HIF- α poseen gran similitud estructural, se ha demostrado que regulan diferentes genes y por lo tanto poseen papeles diferentes en la expresión génica. No obstante, Menrad et al., (2010) observaron que el silenciamiento o disminución en alguna de las isoformas de HIF- α producía el aumento de los niveles de la otra en busca de la supervivencia celular, lo cual podría explicar la observación de una banda más intensa de HIF-2 α en las muestras analizadas.

Asimismo, es importante mencionar que estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación mostraron que tanto HIF-1 α como HIF-2 α se expresaban en tumores de CCR inducidos por exposición a DEN-FeNTA (Curiel-Muñiz, datos por publicar), sin embargo, debido a que el tejido tumoral está conformado por una mezcla heterogénea de tipos celulares y otros componentes (Gay et al., 2016) era necesario comprobar que este comportamiento se mantenía en la línea RC5E. Los resultados obtenidos para HIF-1 α y 2 α en nuestra línea RC5E confirmaron lo previamente observado en el tejido tumoral. Esta similitud entre el comportamiento de HIF- α en la línea celular y en los tumores resulta de suma relevancia ya que pone de manifiesto la posibilidad de utilizar este modelo *in vitro* como un primer acercamiento para la exploración de mecanismos asociados al CCR, con el fin de comprobarlos posteriormente en modelos más complejos.

Por último, es necesario destacar que a pesar de que tanto RC5E como 786-O expresan en normoxia las dos isoformas de HIF- α , ambas líneas presentan diferente estado de pVHL, su principal regulador. En cambio, aunque la línea ACHN también tiene presente a pVHL, esta no expresa ninguna de las isoformas de HIF- α . Lo anterior sugiere que, en RC5E, la regulación de los niveles de HIF- α pudiera estarse llevando a cabo por mecanismos independientes del estado de pVHL.

7.3. Niveles de SIAH1 y SIAH2

Como se mencionó previamente, las proteínas homólogas de seven in absentia (SIAH) han sido señaladas como un elemento importante en la regulación de los niveles de HIF- α (Nakayama et al., 2004), por lo que se decidió analizar el comportamiento en las líneas de CCR de la misma forma que para las proteínas HIF- α descrita en la metodología.

La banda identificada para la proteína SIAH1 se observó en las 4 líneas celulares con un corrimiento correspondiente a 37 kDa aproximadamente. No se encontró diferencia entre los niveles de la línea RC5E y la línea control NRK-52E (Figura 11A y C). Esto no concuerda con lo previamente encontrado en los tumores inducidos con DEN-FeNTA, en los cuales se identificó una expresión elevada de esta proteína con respecto al control (Curiel-Muñiz, datos por publicar). Esta discordancia pudiera explicarse por la heterogeneidad en la composición tumoral como lo describen Gerlinger et al., (2014) en el CCRcc, lo cual lleva a la existencia de un panorama genético distinto en subclonas espacialmente distanciadas de un mismo tumor, las cuales presentan una evolución distinta y ramificada. Entonces en el proceso de desarrollo de la línea RC5E podría haberse seleccionado una célula con un comportamiento normal de SIAH1 aunque la mayoría de las células en este tumor hayan tenido un aumento en la expresión de esta proteína. Por otro lado, en las líneas de origen humano la banda de SIAH1 fue menos intensa para 786-O que para ACHN (Figura 11B), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Figura 11D).

Con respecto al análisis de SIAH2, este arrojó una banda correspondiente a la proteína con un peso molecular aproximado de 40 kDa en todas las líneas celulares analizadas. En la Figura 12A se muestra claramente un aumento en los niveles de SIAH2 en la línea RC5E, el cual fue significativo con respecto a NRK-52E (Figura 12.C). Por su parte, los valores de intensidad relativa de SIAH2 en las líneas de CCR humano fueron mucho menores a lo observado en las muestras de rata. A pesar del ruido de fondo, se logra distinguir una banda bien definida en ambas líneas celulares (Figura 12.B), apreciándose una expresión mayor en 786-O que en ACHN (Figura 12.D).

Debido a la falta de un control de expresión no tumoral humano no fue posible determinar con certeza si los niveles de SIAH en las células humanas eran diferentes a los esperados en células no cancerosas, sin embargo, se puede decir que el comportamiento de SIAH no fue igual en las dos líneas de CCR humano analizadas. Si bien tanto ACHN como 786-O son líneas celulares de CCR humano, la primera fue aislada de una efusión pleural maligna metastásica, que se ha sugerido es de tipo papilar; mientras que la segunda fue aislada de un tumor primario de CCRcc (Brodaczewska et al., 2016; Wolf et al., 2020). Estas diferencias intrínsecas y su trasfondo genético permiten dar una explicación plausible a las diferencias encontradas en la expresión de ambas proteínas entre estas dos líneas. De forma interesante en un estudio llevado a cabo por Zhang et al., (2022) se analizaron genes relacionados con el sistema

ubiquitina-proteasoma en CCR papilar con el fin de identificar un panel de genes de riesgo para este subtipo. Entre los genes encontrados destaca aquel de SIAH1, el cual se asoció con una estratificación clínica y patológica menos favorable. Lo anterior sugiere que al ser ACHN derivada de un estadio metastásico de CCRp, los niveles de SIAH1 podrían ser mayores que para 786-O por cambios en la expresión del gen que la codifica.

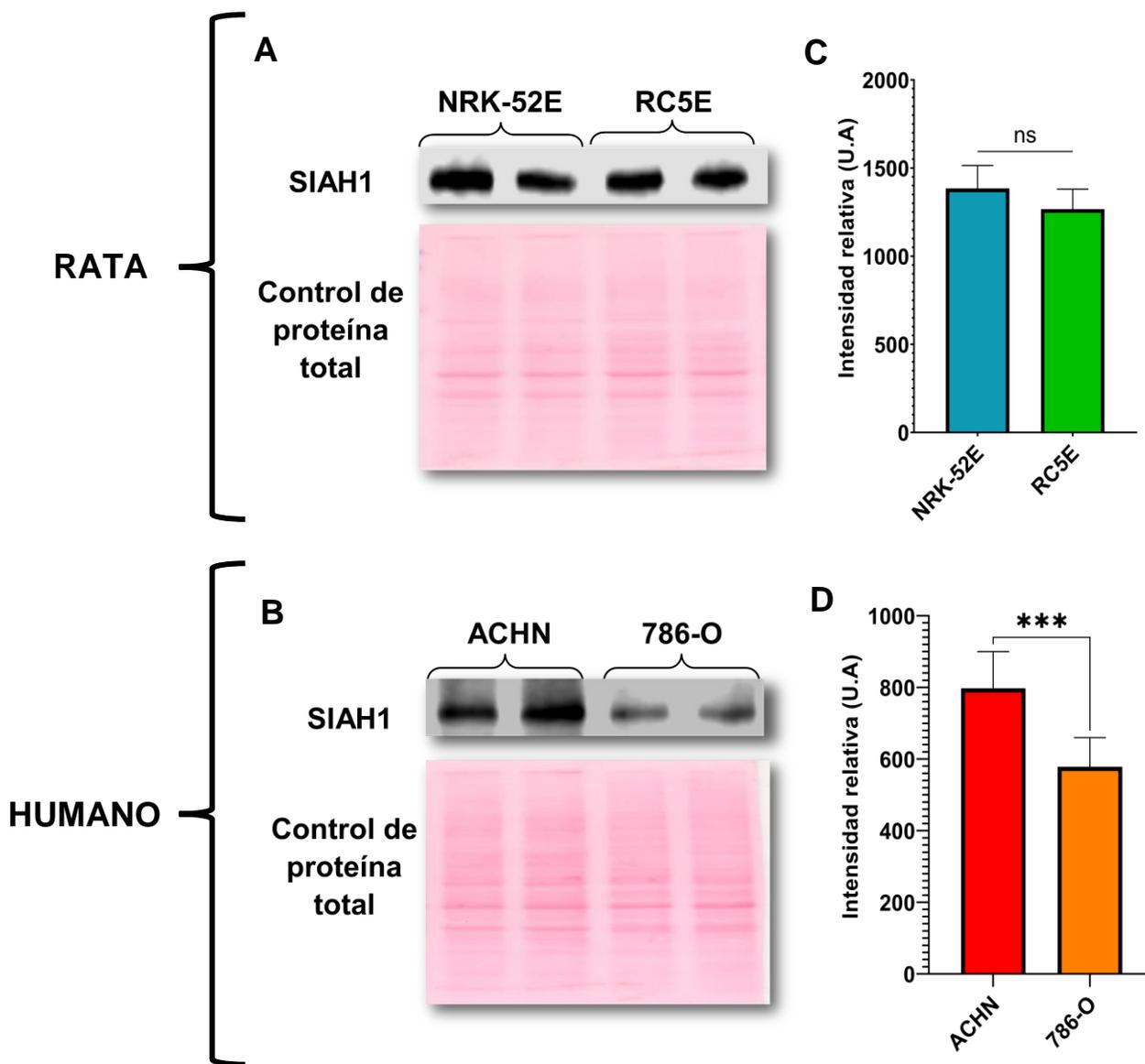


Figura 11. Niveles de SIAH1 en líneas celulares de CCR. Imágenes representativas del análisis por western blot de SIAH1 (37 kDa) en las líneas celulares de rata, NRK-52E, como control de expresión no tumoral, y RC5E (n=6) (A); y en las líneas de CCR humano, ACHN (*VHL*^{+/+}) y 786-O (*VHL*^{-/-}) (n=6) (B) cultivadas bajo condiciones de normoxia. Las membranas fueron teñidas con Ponceau-S P como control del análisis densitométrico. Los gráficos muestran el análisis densitométrico de SIAH1 expresado como $\bar{x} \pm D.E.$ en unidades arbitrarias de intensidad relativa para las líneas celulares de rata (C) y humano (D). El análisis estadístico se realizó a través de una t de student de dos colas; los asteriscos entre barras representan una diferencia significativa ($p < 0.05$).

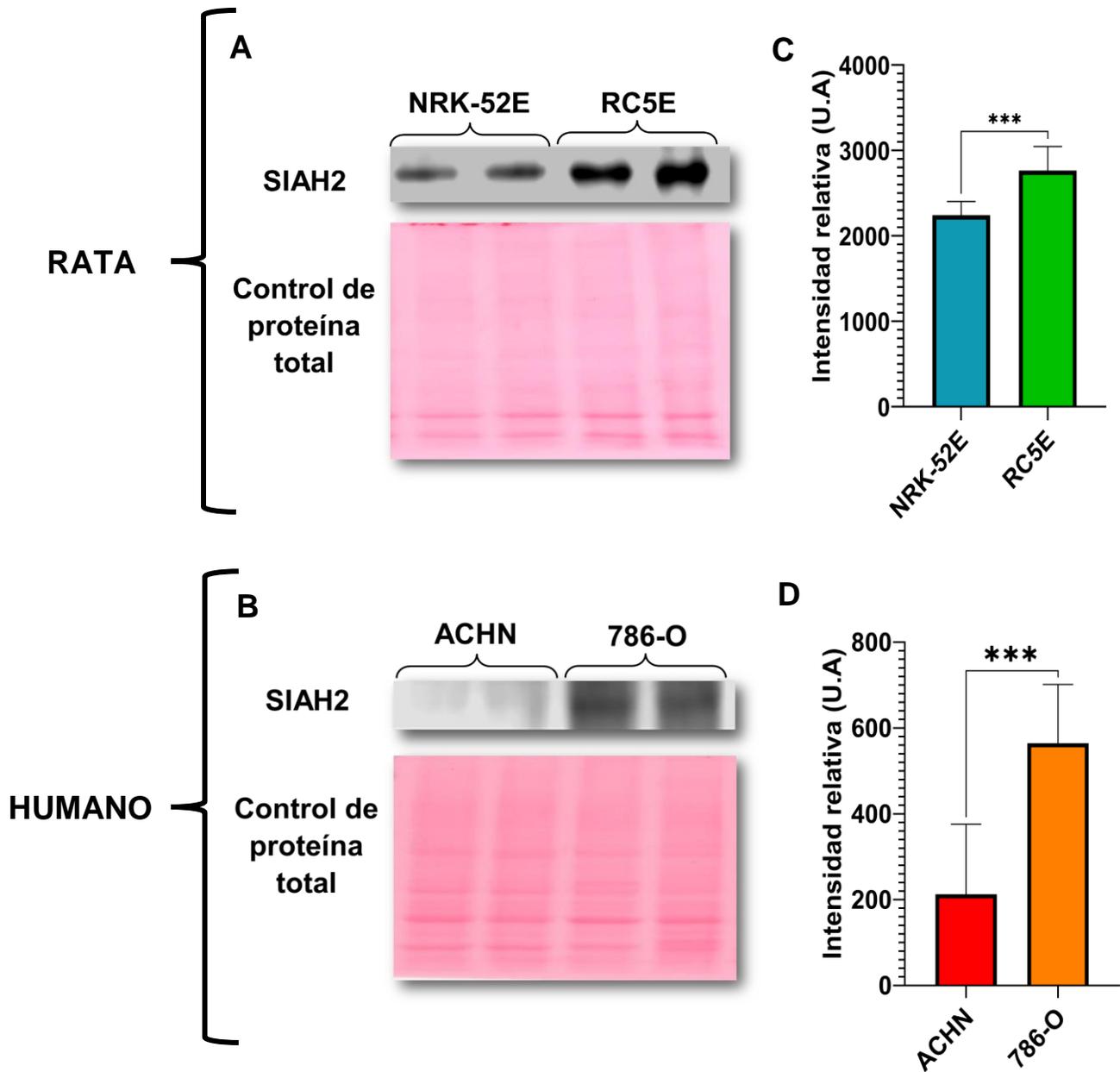


Figura 12. Niveles de SIAH2 en líneas celulares de CCR. Imágenes representativas del análisis por western blot de SIAH2 (40 kDa) en las líneas celulares de rata, NRK-52E, como control de expresión no tumoral, y RC5E (n=8) (**A**); y en las líneas de CCR humano, ACHN (*VHL*^{+/+}) y 786-O (*VHL*^{-/-}) (n=8) (**B**) cultivadas bajo condiciones de normoxia. Las membranas fueron teñidas con Ponceau-S P como control del análisis densitométrico. Los gráficos muestran el análisis densitométrico de SIAH2 expresado como $\bar{x} \pm D.E.$ en unidades arbitrarias de intensidad relativa para las líneas celulares de rata (**C**) y humano (**D**). El análisis estadístico se realizó a través de una t de student de dos colas; los asteriscos entre barras representan una diferencia significativa ($p < 0.05$).

La ausencia de cambios en los niveles de SIAH1 en la línea RC5E nos lleva a pensar que esta molécula no está directamente relacionada con la estabilización de los niveles de HIF- α en condiciones de normoxia, sin embargo, esta alteración se había observado previamente en los tumores inducidos con DEN-FeNTA por lo que habría que analizar su distribución subcelular, ya que su papel como promotor o supresor de tumores puede depender de ello de acuerdo con lo reportado por Zhang et al., (2022) y podría estar participando de otras formas como parte del proceso carcinogénico en el CCR.

Por otro lado, el aumento observado en los niveles de SIAH2 en RC5E y 786-O fue acorde con el incremento registrado en los niveles de HIF-1 α y HIF-2 α en esas líneas, e independiente del hecho de que la primera expresa de forma normal a pVH y la segunda no. Esto nos lleva a proponer la posible participación de SIAH2 como regulador de los niveles de HIF- α en condiciones de normoxia. A pesar de que hasta el momento no se ha descrito un mecanismo específico de participación de SIAH2 en el CCR, reportes previos han señalado su relación con los niveles de HIF- α a través de la ubiquitinación de las PHD, responsables de la hidroxilación que reconoce pVHL para el marcaje de HIF- α (Nakayama et al., 2004) (Figura 13). De la misma forma que ocurre con SIAH1, la gran variedad de sustratos que posee SIAH2 ha provocado incertidumbre respecto al rol que desempeña en la tumorigénesis, no obstante, diversas investigaciones han señalado a SIAH2 predominantemente como una proteína promotora de procesos oncogénicos en distintos tipos de cáncer (Li et al., 2022). Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios más detallados que nos lleven a la elucidación de los mecanismos que alteran los niveles de HIF- α en condiciones de normoxia y confirmen el papel de SIAH2 en el CCR.

A través de este trabajo se reafirmó el potencial uso de RC5E como un primer acercamiento al estudio de mecanismos moleculares en el CCR. No obstante, a pesar de los beneficios que conlleva el trabajo con líneas celulares y la similitud en el comportamiento de HIF- α entre los tumores obtenidos del modelo de inducción química en ratas y la línea RC5E, se observaron discrepancias en el comportamiento de SIAH1 entre ambos modelos. Si bien este hecho no invalida el potencial uso que tiene tanto esta como otras líneas celulares como herramientas de aproximación en la comprensión de los mecanismos moleculares del CCR, es importante la selección de controles adecuados, así como la realización de un análisis minucioso y cauteloso para la interpretación de los datos con el fin de evitar un sesgo o la obtención de conclusiones erróneas.

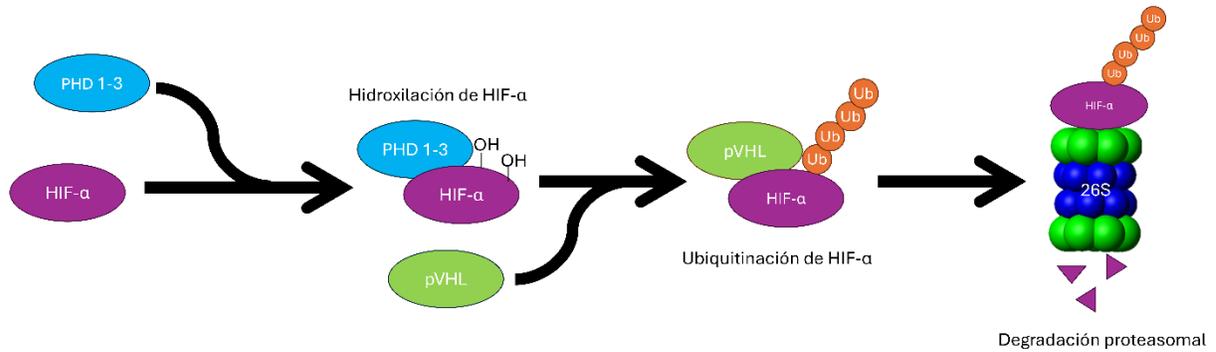
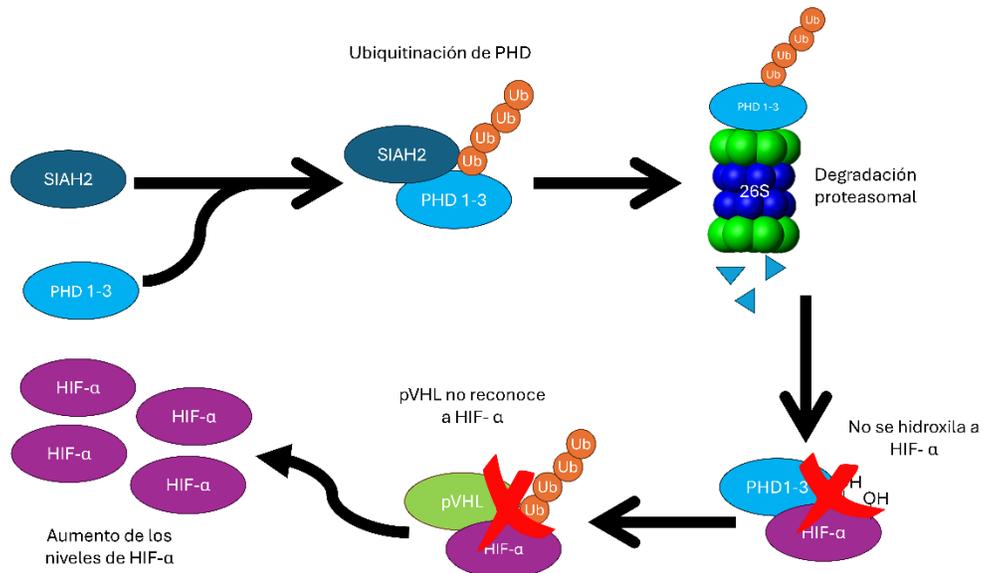
A**B**

Figura 13. Estabilización de HIF- α mediada por SIAH2. (A) Bajo condiciones de normoxia las proliil hidroxilasas (PHD) marcan a HIF- α a través de dos hidroxilaciones que sirven como elementos de reconocimiento de la ligasa de ubiquitina E3, pVHL, que ubiquitina a HIF- α para su degradación proteasomal. (B) SIAH2 es capaz de reconocer a las PHD y ubiquitinarlas para su degradación proteasomal. La degradación de las PHD tiene como consecuencia la disminución en la hidroxilación de HIF- α , lo cual impide su reconocimiento por pVHL y la consecuente degradación en el proteasoma, por lo que aumentan sus niveles.

8. Conclusiones

Los resultados obtenidos confirmaron que a pesar de que pVHL es considerado el principal regulador de los niveles en normoxia de las dos isoformas de HIF- α analizadas existen mecanismos independientes de esta ligasa de ubiquitina capaces de controlar los niveles de dichas proteínas en el CCR.

Se identificó una asociación entre los niveles elevados de HIF- α y el incremento de SIAH2, por lo que se propone que esta isoforma puede estar relacionada con la estabilización de HIF- α en el CCR tal como se ha observado en otros tipos celulares, sin embargo, es necesario enriquecer la evidencia experimental para confirmar esto.

9. Anexos

9.1. Preparación de soluciones

Todos los reactivos empleados a continuación fueron obtenidos de Sigma Aldrich o JT Baker a excepción de que se especifique lo contrario.

9.1.1. Medio de cultivo DMEM alto en glucosa

A 500 mL de medio DMEM alto en glucosa (Sigma Aldrich, No. Cat. D6429) se añadieron 50 mL de suero fetal bovino (SFB) (Biowest, No. Cat. S1810), previamente inactivado por calor (56 °C, 30min), 5 mL de solución de aminoácidos no esenciales MEM 100X (Sigma Aldrich, No. Cat. 11140050) y 5 mL de antibiótico antimicótico 100x (Sigma Aldrich, No. Cat. A5955). La mezcla se esterilizó por filtración (0.22 µm) y se conservó en refrigeración (4°C) hasta su uso.

9.1.2. Amortiguador de lisis RIPA

Inmediatamente previo a su uso a 1 mL de amortiguador de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology, No. Cat. sc-24948A-1) se adicionaron 10 µL de ortovanadato de sodio (Santa Cruz Biotechnology, No. Cat. sc-24948A-4), 10 µL de fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) (Santa Cruz Biotechnology, No. Cat. sc-24948A-2), y 10 µL de un coctel de inhibidores de proteasas (Santa Cruz Biotechnology, No. Cat. sc-24948A-3).

9.1.3. Amortiguador salino de fosfatos pH 7.4 (PBS)

Se disolvieron 1.44 g de fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) [10 mM], 0.24 g de fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) [1.8 mM], 8 g de cloruro de sodio (NaCl) [137 mM] y 0.2 g de cloruro de potasio (KCl) [2.7 mM] en 800 mL de agua desionizada. Se ajustó el pH a 7.4 con ácido clorhídrico (HCl) concentrado y se completó el volumen con agua desionizada a 1 L. Para cultivo celular la solución se esterilizó en autoclave y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

9.1.4. Amortiguador PBS-EDTA

Se disolvieron 1.44 g de Na₂HPO₄ [10 mM], 0.24 g de KH₂PO₄ [1.8 mM], 8 g de NaCl [137 mM] y 0.2 g de (KCl) [2.7 mM] y 0.372 g de sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) [1 mM] en agua desionizada y se aforó a 1L. Para cultivo celular la solución se esterilizó en autoclave y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

9.1.5. Amortiguador PBST (10X)

Se disolvieron 14.4 g de Na_2HPO_4 , 2.4 g de KH_2PO_4 , 80 g de NaCl , 2 g de KCl y 10 mL de Tween-20 en agua desionizada y se aforó a 1L.

Para su uso se realizó una dilución 1:9, para la cual se tomaron 100 mL de PBST (10X) y se aforó a 1 L con agua desionizada.

9.1.6. Amortiguador de electroforesis

Se disolvieron 3.02 g de tris-base, 18.8 g de glicina y 1 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) en agua desionizada y se aforó a 1 L. La solución se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

9.1.7. Amortiguador de transferencia

Se disolvieron 5.8 g de tris-base, 2.9 g de glicina y 0.37 g de SDS en 500 mL de agua desionizada, se añadieron 200 mL de metanol y se aforó a 1 L con agua desionizada. La solución se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

9.1.8. Amortiguador tris pH 8.8 (1.5 M)

Se disolvieron 18.17 g de tris-base en 80 mL de agua desionizada. Se ajustó el pH a 8.8 con HCl y se aforó a 100 mL con agua desionizada.

9.1.9. Amortiguador tris pH 6.8 (1 M)

Se disolvieron 12.11 g de tris-base en 80 mL de agua desionizada. Se ajustó el pH a 6.8 con HCl y se aforó a 100 mL con agua desionizada.

9.1.10. Persulfato de amonio (30%)

Se disolvieron 0.3 g de persulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) en 1 mL de agua desionizada. La solución se almacenó en congelación (-20°C) cubierta de la luz hasta su uso.

9.1.11. SDS (10%)

Se disolvieron 5 g de SDS en agua desionizada y se aforó a 50 mL.

9.1.12. Amortiguador de carga

Se mezclaron 500 μL de amortiguador tris pH 6.8 [1 M], 2 mL de SDS 10% y 1 mL de glicerol; se disolvió en la mezcla 0.005 g de azul de bromofenol, se completó el volumen a 10 mL y se separó en alícuotas de 1 mL. Se añadieron 50 μL de 2-mercaptoetanol al microtubo previo a su uso. La solución se almacenó en refrigeración.

9.1.13. Mezcla de acrilamida (30%)

Se disolvieron 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de N,N'-metilen-bis-acrilamida en agua desionizada y se aforó a 100 mL. La solución se filtró y se almacenó en condiciones de refrigeración cubierta de la luz hasta su uso.

9.1.14. Reactivo de Biuret

- Solución A

Se disolvieron 10 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3), 2 g de hidróxido de sodio (NaOH) y 0.1 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) en agua desionizada y se aforó a 500 mL.

- Solución B

Se disolvieron 0.25 g de sulfato cúprico (CuSO_4) en agua desionizada y se aforó a 50 mL.

Previo a su uso se mezclaron 10 mL de solución A y 200 μL de solución B, a esta mezcla se le denomina reactivo de Biuret.

9.1.15. Reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1)

Para la disolución se mezclaron volúmenes iguales de agua desionizada y reactivo de Folin-Ciocalteu inmediatamente previo a su uso.

9.1.16. Ponceau S (0.01%)

Se disolvieron 0.005 g de Ponceau S en 50 mL de una solución de ácido acético glacial (1%), la cual fue previamente preparada añadiendo 500 μL de ácido acético glacial a 50 mL de agua desionizada.

9.2. Geles de poliacrilamida para electroforesis (PAGE)

Para la preparación de los geles se utilizó un sistema Mini-PROTEAN (Bio-Rad, No. Cat. 165-8000 – 165-8007). Se armaron los moldes utilizando placas de cristal para geles de 1 mm de espesor, las cuales se apretaron firmemente con ayuda de las pinzas del molde y se ajustaron de forma vertical para el vertido de las soluciones, asegurando su colocación sobre almohadillas para evitar el escurrimiento del gel por la parte inferior de los cristales. Una vez armado el molde se introdujo el peine de 10 pocillos y se marcó el cristal a una distancia de 7 mm del fondo de los pocillos para establecer la marca de llenado para el gel de resolución y se retiró nuevamente el peine.

En un tubo para centrífuga de 50 mL se mezclaron las soluciones correspondientes al gel de resolución de acuerdo con la concentración de acrilamida deseada (Tabla 4), asegurando su correcta homogeneización, y se vertió la mezcla dentro del molde, procurando su deslizamiento a través de las paredes, hasta el nivel señalado previamente. Inmediatamente se añadieron 500 μ L de isopropanol en la superficie de la solución y se dejó reposar hasta su gelificación (aproximadamente 15 min).

Una vez solidificado el gel de resolución se procedió al enjuague del isopropanol con agua destilada y se secó el espacio entre los vidrios con ayuda de un papel filtro. Posteriormente, se procedió a mezclar los componentes indicados para el gel concentrador (Tabla 4), se llenó el espacio sobrante del molde hasta el borde superior y se colocó el peine de 10 pocillos. La mezcla se dejó reposar hasta su gelificación (aproximadamente 15 min).

Tabla 4. Soluciones para preparación de geles de resolución y concentrador.

Acrilamida	Resolución				Concentrador
	8 %	10%	12%	13%	5%
Componentes	Volumen (mL)				
1. Agua	6.9	5.9	4.9	4.4	4.1
2. Mezcla de acrilamida 30%	4.0	5.0	6.0	6.5	1.0
3. Amortiguador tris pH 8.8 (1.5 M)	3.8	3.8	3.8	3.8	-
4. Amortiguador tris pH 6.8 (1 M)	-	-	-	-	0.75
5. SDS 10%	0.15	0.15	0.15	0.15	0.06
6. Persulfato de amonio 30%	0.15	0.15	0.15	0.15	0.06
7. TEMED	0.009	0.006	0.006	0.006	0.006

SDS: Dodecilsulfato de sodio; TEMED: Tetrametilendiamina

Una vez gelificados se retiraron las pinzas del molde y se trasladaron los geles a la cámara de electroforesis donde se acomodaron firmemente. Se llenó la cámara con amortiguador de electroforesis asegurando que los geles quedaran completamente cubiertos. La cámara se tapó y se almacenó en refrigeración hasta su uso.

9.3. Curva de calibración método Lowry

Para la cuantificación de la concentración de proteínas totales por este medio se utilizó una solución stock de albúmina sérica bovina libre de IgG (ASB) (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con la cual se preparó una curva de calibración como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Curva de calibración método de Lowry

Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	H ₂ O (μL)	RIPA (μL)	ASB (μL)
Blanco	98	2	-
0	98	2	-
0.05	93	2	5
0.1	88	2	10
0.15	83	2	15
0.20	78	2	20

El procedimiento para efectuar la reacción y su posterior lectura a 750 nm se llevó a cabo de la misma forma descrita anteriormente para las muestras.

9.4. Imágenes de western blot para determinación de peso molecular

A continuación, se presentan imágenes representativas de las membranas de western blot que incluyen los marcadores de peso molecular utilizados para el cálculo del peso molecular aproximado de las proteínas detectadas (Figura 14). Los pesos moleculares se determinaron a través de la medición de la movilidad relativa de las bandas de los marcadores de peso molecular, la cual se midió en cm. Los valores fueron graficados de forma logarítmica y se realizó una regresión lineal. El peso molecular de las bandas de interés se calculó por interpolación del valor de movilidad relativa en la ecuación obtenida previamente.



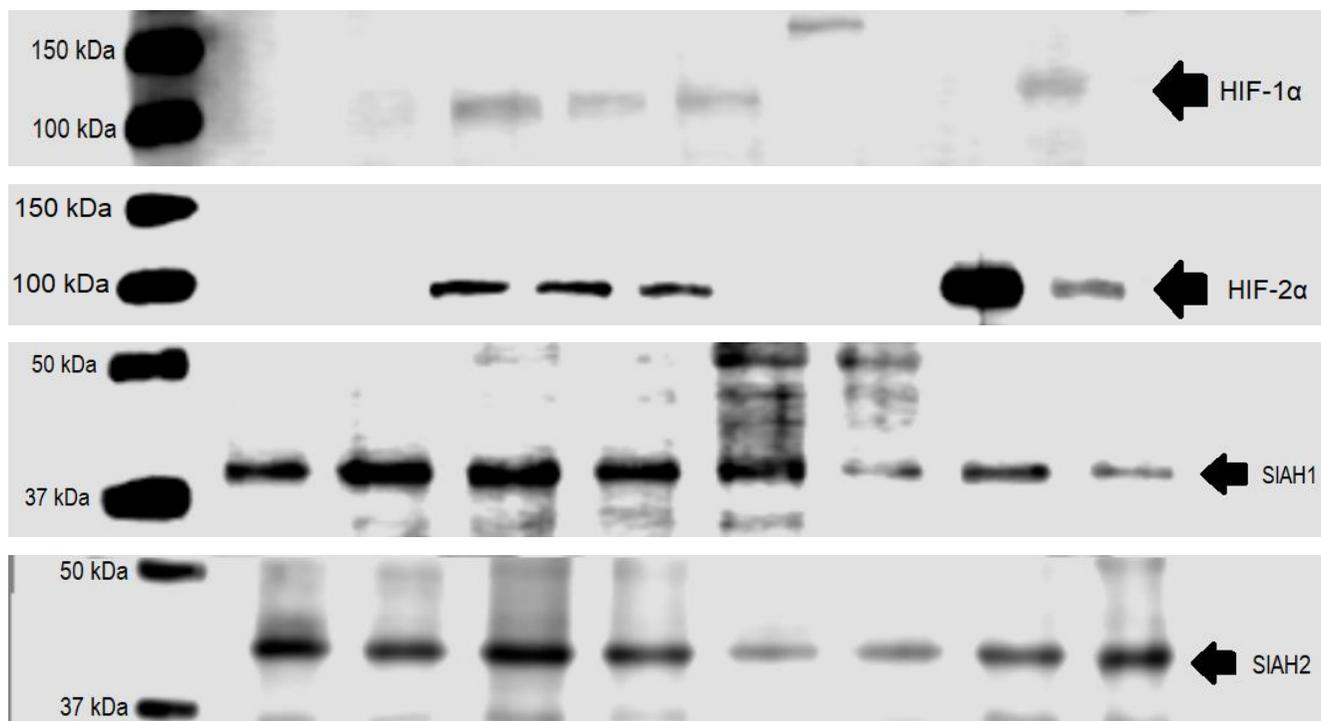


Figura 14. Western blots con marcadores de peso molecular. Imágenes representativas de las proteínas determinadas mediante western blot incluyendo los marcadores de peso molecular utilizados como referencia para la determinación del peso molecular aproximado de las proteínas.

9.5. Cálculos para normalización de western blot

Con ayuda del software Image Studio Digit 5.2 (Li-Cor) se determinó la intensidad correspondiente al total de proteína en cada carril asegurando que el área de cuantificación fuera igual para todos los carriles y se determinó el factor de normalización para cada uno de ellos utilizando como referencia la muestra cuya intensidad es más cercana al promedio de todas las muestras a través de la siguiente ecuación:

$$FN = \frac{PT_m}{PT_R}$$

Donde:

FN: Factor de normalización

PT_m: Intensidad relativa de la proteína total en carril de muestra

PT_R: Intensidad relativa de la proteína total en carril de referencia

Una vez obtenido el factor de normalización se determinó el valor normalizado a través de la siguiente ecuación:

$$I_N = \frac{I_P}{FN}$$

Donde:

I_N : Intensidad relativa normalizada de la proteína de interés

I_P : Intensidad relativa de la proteína de interés

FN: Factor de normalización

10. Referencias

Adam, M. G., Matt, S., Christian, S., Hess-Stumpp, H., Haegebarth, A., Hofmann, T. G., & Algire, C. (2015). SIAH ubiquitin ligases regulate breast cancer cell migration and invasion independent of the oxygen status. *Cell Cycle*, 14(23), 3734–3747. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1104441>

Aguilar-Alonso, F. A., Solano, J. D., Vargas-Olvera, C. Y., Pacheco-Bernal, I., Pariente-Pérez, T. O., & Ibarra-Rubio, M. E. (2015). MAPKs' status at early stages of renal carcinogenesis and tumors induced by ferric nitrilotriacetate. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 404(1–2), 161–170. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2375-5>

Ahmed, A. U., Schmidt, R. L., Park, C. H., Reed, N. R., Hesse, S. E., Thomas, C. F., Molina, J. R., Deschamps, C., Yang, P., Aubry, M. C., & Tang, A. H. (2008). Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(22), 1606–1629. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn365>

Albanese, A., Daly, L. A., Mennerich, D., Kietzmann, T., & Sée, V. (2021). The role of hypoxia-inducible factor post-translational modifications in regulating its localisation, stability, and activity. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Número 1, pp. 1–18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22010268>

American Cancer Society. (2020). *What Is Kidney Cancer?* ACS. <https://www.cancer.org/cancer/types/kidney-cancer/about/what-is-kidney-cancer.html>

Athar, M., & Iqbal, M. (1998). Ferric nitrilotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis*, 19(6), 1133–1139. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.6.1133>

- Baldewijns, M. M., van Vlodrop, I. J., Vermeulen, P. B., Soetekouw, P. M., van Engeland, M., & de Bruïne, A. P. (2010). VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. *The Journal of Pathology*, *221*(2), 125–138. <https://doi.org/10.1002/path.2689>
- Batavia, A. A., Schraml, P., & Moch, H. (2019). Clear cell renal cell carcinoma with wild-type von Hippel-Lindau gene: a non-existent or new tumour entity? *Histopathology*, *74*(1), 60–67. <https://doi.org/10.1111/his.13749>
- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Cukura, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T. G., Fan, J., Garmiri, P., da Costa Gonzales, L. J., Hatton-Ellis, E., Hussein, A., Ignatchenko, A., ... Zhang, J. (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Bettencourt, J. W., McLaury, A. R., Limberg, A. K., Vargas-Hernandez, J. S., Bayram, B., Owen, A. R., Berry, D. J., Sanchez-Sotelo, J., Morrey, M. E., van Wijnen, A. J., & Abdel, M. P. (2020). Total protein staining is superior to classical or tissue-specific protein staining for standardization of protein biomarkers in heterogeneous tissue samples. *Gene Reports*, *19*. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100641>
- Brodaczewska, K. K., Szczylik, C., Fiedorowicz, M., Porta, C., & Czarnecka, A. M. (2016). Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Molecular Cancer*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0565-8>
- Capitanio, U., & Montorsi, F. (2016). Renal cancer. *The Lancet*, *387*(10021), 894–906. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)00046-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)00046-x)
- Cooper, P. (2019). Cáncer. En *The Cell: A Molecular Approach* (8a ed.). Oxford University Press.
- Cruz-Gregorio, A., Aranda-Rivera, A. K., Pedraza-Chaverri, J., Solano, J. D., & Ibarra-Rubio, M. E. (2021). Redox-sensitive signaling pathways in renal cell carcinoma. *BioFactors*, *48*(2), 342–358. <https://doi.org/10.1002/biof.1784>
- Dagher, J., Kammerer-Jacquet, S. F., Brunot, A., Pladys, A., Patard, J. J., Bensalah, K., Perrin, C., Verhoest, G., Mosser, J., Lespagnol, A., Vigneau, C., Dugay, F., Belaud-Rotureau, M. A., & Rioux-Leclercq, N. (2016). Wild-type VHL Clear Cell Renal Cell Carcinomas Are a

Distinct Clinical and Histologic Entity: A 10-Year Follow-up. *European Urology Focus*, 1(3), 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2015.06.001>

Della, N. G., Senior, P. V., & Bowtell, D. D. L. (1993). Isolation and characterisation of murine homologues of the *Drosophila seven in absentia* gene (*sina*). *Development*, 117(4), 1333–1343. <https://doi.org/10.1242/dev.117.4.1333>

Ding, X. F., Zhou, J., Chen, G., & Wu, Y. L. (2018). VHL loss predicts response to Aurora kinase A inhibitor in renal cell carcinoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 18(1), 1206–1210. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9038>

Duan, D. R., Humphrey, J. S., Chen, D. Y. T., Weng, Y., Sukegawat, J., Leet, S., Gnarr, J. R., Marston Linehan, W., & Klausner, R. D. (1995). Characterization of the VHL tumor suppressor gene product: Localization, complex formation, and the effect of natural inactivating mutations. En *Biochemistry* (Vol. 92). <https://www.pnas.org>

Gay, L., Baker, A. M., & Graham, T. A. (2016). Tumour Cell Heterogeneity. En *F1000Research* (Vol. 5). Faculty of 1000 Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7210.1>

Gerlinger, M., Horswell, S., Larkin, J., Rowan, A. J., Salm, M. P., Varela, I., Fisher, R., Mcgranahan, N., Matthews, N., Santos, C. R., Martinez, P., Phillimore, B., Begum, S., Rabinowitz, A., Spencer-Dene, B., Gulati, S., Bates, P. A., Stamp, G., Pickering, L., ... Swanton, C. (2014). Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nature Genetics*, 46(3), 225–233. <https://doi.org/10.1038/ng.2891>

Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), & International Agency for Research on Cancer. (2020). *Kidney*. World Health Organization. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/29-Kidney-fact-sheet.pdf>

Gopalsamy, A., Hagen, T., & Swaminathan, K. (2014). Investigating the molecular basis of Siah1 and Siah2 E3 ubiquitin ligase substrate specificity. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106547>

Goyal, R., Gersbach, E., Yang, X. J., & Rohan, S. M. (2013). Differential Diagnosis of Renal Tumors With Clear Cytoplasm: Clinical Relevance of Renal Tumor Subclassification in the

Era of Targeted Therapies and Personalized Medicine. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 137(4), 467–480. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0085-ra>

Haase, V. (2009). The VHL Tumor Suppressor: Master Regulator of HIF. *Current Pharmaceutical Design*, 15(33), 3895–3903. <https://doi.org/10.2174/138161209789649394>

Han, Q., Han, F., Fan, Y., Lian, B., Xiao, J., Sun, W., Han, D., Kou, H., Li, C., & Wu, B. (2020). Notch3 is involved in the proliferation of renal cancer cells via regulation of cell cycle progression and HIF-2 α . *Oncology Letters*, 20(6). <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12242>

Harshman, L. C., & Choueiri, T. K. (2013). Targeting the Hepatocyte Growth Factor/c-Met Signaling Pathway in Renal Cell Carcinoma. *The Cancer Journal*, 19(4), 316–323. <https://doi.org/10.1097/ppo.0b013e31829e3c9a>

Hayashi, Y., Yokota, A., Harada, H., & Huang, G. (2019). Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer. *Cancer Science*, 110(5), 1510–1517. <https://doi.org/10.1111/cas.13990>

He, Y. H., & Tian, G. (2021). Autophagy as a Vital Therapy Target for Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.518225>

Hoefflin, R., Harlander, S., Schäfer, S., Metzger, P., Kuo, F., Schönenberger, D., Adlesic, M., Peighambari, A., Seidel, P., Chen, C., Consenza-Contreras, M., Jud, A., Lahrmann, B., Grabe, N., Heide, D., Uhl, F. M., Chan, T. A., Duyster, J., Zeiser, R., ... Frew, I. J. (2020). HIF-1 α and HIF-2 α differently regulate tumour development and inflammation of clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17873-3>

Hu, Y., He, Y., Liu, W., Yu, S., Wei, Y., Bai, S., Su, Y., & Xiao, B. (2022). SIAH2 regulates colorectal cancer tumorigenesis via PI3K/ATK signaling pathway. *Tissue and Cell*, 78. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101878>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2022). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero) Datos nacionales* (Número Comunicado de prensa núm. 74/22).

https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP_CANCER22.pdf
f

- Iommarini, L., Porcelli, A. M., Gasparre, G., & Kurelac, I. (2017). Non-Canonical Mechanisms Regulating Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00286>
- Jones, T. M., Carew, J. S., & Nawrocki, S. T. (2020). Therapeutic targeting of autophagy for renal cell carcinoma therapy. *Cancers*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/cancers12051185>
- Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., & Searson, P. C. (2016). In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>
- Khan, M. N., Bhattacharyya, T., Andrikopoulos, P., Esteban, M. A., Barod, R., Connor, T., Ashcroft, M., Maxwell, P. H., & Kiriakidis, S. (2011). Factor inhibiting HIF (FIH-1) promotes renal cancer cell survival by protecting cells from HIF-1 α -mediated apoptosis. *British Journal of Cancer*, 104(7), 1151–1159. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.73>
- Li, K., Li, J., Ye, M., & Jin, X. (2022). The role of Siah2 in tumorigenesis and cancer therapy. *Gene*, 809, 146028. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146028>
- Liao, C., & Zhang, Q. (2020). Understanding the Oxygen-Sensing Pathway and Its Therapeutic Implications in Diseases. *The American Journal of Pathology*, 190(8), 1584–1595. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.04.003>
- Liu, Y., Li, Q., Geng, L., Zhou, X., Zhou, X., Dong, Y., & Zhang, Y. (2022). Siah1 promotes the proliferation of NSCLC cells through ubiquitinating and stabilizing Notch1. *Experimental Cell Research*, 419(1). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113305>
- Mancini, V., Battaglia, M., Lucarelli, G., di Lorenzo, V., Ditunno, P., Bettocchi, C., & Selvaggi, F. P. (2008). Unusual solitary metastasis of the ciliary body in renal cell carcinoma. *International Journal of Urology*, 15(4), 363–365. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2008.02004.x>

- Mandl, M., & Depping, R. (2014). Hypoxia-Inducible Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) (HIF-1 β): Is It a Rare Exception? *Molecular Medicine*, 20(1), 215–220. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00032>
- Menrad, H., Werno, C., Schmid, T., Copanaki, E., Deller, T., Dehne, N., & Brüne, B. (2010). Roles of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) versus HIF-2 α in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology*, 51(6), 2183–2192. <https://doi.org/10.1002/hep.23597>
- Moch, H., Amin, M. B., Berney, D. M., Compérat, E. M., Gill, A. J., Hartmann, A., Menon, S., Raspollini, M. R., Rubin, M. A., Srigley, J. R., Tan, P. H., Tickoo, S. K., Tsuzuki, T., Turajlic, S., Cree, I., & Netto, G. J. (2022). The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology*, 82(5), 458–468. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2022.06.016>
- Moch, H., Humphrey, P. A., Thomas, & Victor E. Reuter. (2016). *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs* (T. M. . U. I bright V. E. R. Holger Moch Peter A. Humphrey, Ed.; 4a ed.). World Health Organization.
- Moch, H., & Ohashi, R. (2021). Chromophobe renal cell carcinoma: current and controversial issues. *Pathology*, 53(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2020.09.015>
- Nabi, S., Kessler, E. R., Bernard, B., Flaig, T. W., & Lam, E. T. (2018). Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *F1000Research*, 7, 307. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13179.1>
- Nakayama, K., Frew, I. J., Hagensen, M., Skals, M., Habelhah, H., Bhoumik, A., Kadoya, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Frappell, P. B., Bowtell, D. D., & Ronai, Z. (2004). Siah2 Regulates Stability of Prolyl-Hydroxylases, Controls HIF-1 α Abundance, and Modulates Physiological Responses to Hypoxia. *Cell*, 117(7), 941–952. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.001>
- Natarajan, B., Arige, V., Khan, A. A., Reddy, S. S., Barthwal, M. K., & Mahapatra, N. R. (2021). Hypoxia-mediated regulation of mitochondrial transcription factors in renal epithelial cells: implications for hypertensive renal physiology. *Hypertension Research*, 44(2), 154–167. <https://doi.org/10.1038/s41440-020-00539-4>

- National Institutes of Health (USA), & Biological Sciences Curriculum Study. (2007). *Understanding Cancer*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
- Okazaki, Y. (2022). The Role of Ferric Nitrosyltriacetate in Renal Carcinogenesis and Cell Death: From Animal Models to Clinical Implications. *Cancers*, 14(6), 1495. <https://doi.org/10.3390/cancers14061495>
- Padala, S. A., Barsouk, A., Thandra, K. C., Saginala, K., Mohammed, A., Vakiti, A., Rawla, P., & Barsouk, A. (2020). Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *World Journal of Oncology*, 11(3), 79–87. <https://doi.org/10.14740/wjon1279>
- Pariente-Pérez, T., Aguilar-Alonso, F., Solano, J. D., Vargas-Olvera, C., Curiel-Muñiz, P., Mendoza-Rodríguez, C. A., Tenorio-Hernández, D., & Ibarra-Rubio, M. E. (2020). Differential behavior of NF- κ B, I κ B α and EGFR during the renal carcinogenic process in an experimental model in vivo. *Oncology Letters*, 19(4), 3153–3164. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11436>
- Pepper, I. J., Van Sciver, R. E., & Tang, A. H. (2017). Phylogenetic analysis of the SINA/SIAH ubiquitin E3 ligase family in Metazoa. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1024-x>
- Prasad, S. R., Humphrey, P. A., Catena, J. R., Narra, V. R., Srigley, J. R., Cortez, A. D., Dalrymple, N. C., & Chintapalli, K. N. (2006). Common and Uncommon Histologic Subtypes of Renal Cell Carcinoma: Imaging Spectrum with Pathologic Correlation. *RadioGraphics*, 26(6), 1795–1806. <https://doi.org/10.1148/rg.266065010>
- Qi, J., Kim, H., Scortegagna, M., & Ronai, Z. A. (2013). Regulators and Effectors of Siah Ubiquitin Ligases. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 67(1), 15–24. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9636-2>
- Qi, J., Nakayama, K., Cardiff, R. D., Borowsky, A. D., Kaul, K., Williams, R., Krajewski, S., Mercola, D., Carpenter, P. M., Bowtell, D., & Ronai, Z. A. (2010). Siah2-Dependent Concerted Activity of HIF and FoxA2 Regulates Formation of Neuroendocrine Phenotype and Neuroendocrine Prostate Tumors. *Cancer Cell*, 18(1), 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.024>

- Ravenna, L., Salvatori, L., & Russo, M. A. (2015). HIF3 α : the little we know. *FEBS Journal*, 283(6), 993–1003. <https://doi.org/10.1111/febs.13572>
- Rossi, S. H., Klatte, T., Usher-Smith, J., & Stewart, G. D. (2018). Epidemiology and screening for renal cancer. *World Journal of Urology*, 36(9), 1341–1353. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2286-7>
- Sander, H., Wallace, S., Plouse, R., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2019). Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization. *Analytical Biochemistry*, 575, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.03.010>
- Schmitz, M. L., Dreute, J., Pfisterer, M., Günther, S., Kracht, M., & Chillappagari, S. (2022). SIAH ubiquitin E3 ligases as modulators of inflammatory gene expression. *Heliyon*, 8(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09029>
- Shapiro, D. D., Virumbrales-Muñoz, M., Beebe, D. J., & Abel, E. J. (2022). Models of Renal Cell Carcinoma Used to Investigate Molecular Mechanisms and Develop New Therapeutics. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.871252>
- Shiao, Y.-H., Ramakrishna, G., Anderson, L. M., Perantoni, A. O., Rice, J. M., & Diwan, B. A. (2002). Down-regulation of von Hippel–Lindau protein in N-nitroso compound-induced rat non-clear cell renal tumors. *Cancer Letters*, 179(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00863-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00863-1)
- Shinojima, T., Oya, M., Takayanagi, A., Mizuno, R., Shimizu, N., & Murai, M. (2007). Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1 α expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2 α . *Carcinogenesis*, 28(3), 529–536. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl143>
- Singh, D., Chaudhary, D., Kumar, V., & Verma, A. (2021). Amelioration of diethylnitrosamine (DEN) induced renal oxidative stress and inflammation by Carissa carandas embedded silver nanoparticles in rodents. *Toxicology Reports*, 8, 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.03.014>
- Siswanto, F. M., Made Jawi, I., & Kartiko, B. H. (2018). The role of E3 ubiquitin ligase seven in absentia homolog in the innate immune system: An overview. *Veterinary World*, 11(11), 1551–1557. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1551-1557>

- Song, T., Zhang, X., Wang, C., Wu, Y., Cai, W., Gao, J., & Hong, B. (2011). MiR-138 Suppresses Expression of Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in Clear Cell Renal Cell Carcinoma 786-O Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12(5), 1307–1311. https://journal.waocp.org/article_25593.html
- Swiatek, M., Jancewicz, I., Kluebsoongnoen, J., Zub, R., Maassen, A., Kubala, S., Udomkit, A., Siedlecki, J. A., Sarnowski, T. J., & Sarnowska, E. (2020). Various forms of HIF-1 α protein characterize the clear cell renal cell carcinoma cell lines. *IUBMB Life*, 72(6), 1220–1232. <https://doi.org/10.1002/iub.2281>
- Tanaka, T., Torigoe, T., Hirohashi, Y., Sato, E., Honma, I., Kitamura, H., Masumori, N., Tsukamoto, T., & Sato, N. (2014). Hypoxia-inducible factor (HIF)-independent expression mechanism and novel function of HIF prolyl hydroxylase-3 in renal cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140(3), 503–513. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1593-7>
- Thaib, P. K. P., & Rahaju, A. S. (2022). Clinicopathological profile of clear cell renal cell carcinoma. *International journal of health & medical sciences*, 5(1), 91–100. <https://doi.org/10.21744/ijhms.v5n1.1846>
- Toyokuni, S., Okada, K., Kondo, S., Nishioka, H., Tanaka, T., Nishiyama, Y., Hino, O., & Hiai, H. (1998). Development of High-grade Renal Cell Carcinomas in Rats Independently of Somatic Mutations in the Tsc2 and VHL Tumor Suppressor Genes. *Japanese Journal of Cancer Research*, 89(8), 814–820. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1998.tb00633.x>
- Vargas-Olvera, C., Sánchez-González, D. J., Solano, J. D., Aguilar-Alonso, F. A., Montalvo-Muñoz, F., Martínez-Martínez, C. M., Medina-Campos, O. N., & Ibarra-Rubio, M. E. (2012). Characterization of N-diethylnitrosamine-initiated and ferric nitrilotriacetate-promoted renal cell carcinoma experimental model and effect of a tamarind seed extract against acute nephrotoxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 369(1–2), 105–117. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1373-0>
- Vasudev, N. S., Wilson, M., Stewart, G. D., Adeyoju, A., Cartledge, J., Kimuli, M., Datta, S., Hanbury, D., Hrouda, D., Oades, G., Patel, P., Soomro, N., Sullivan, M., Webster, J., Selby, P. J., & Banks, R. E. (2020). Challenges of early renal cancer detection: symptom patterns and incidental diagnosis rate in a multicentre prospective UK cohort of patients presenting

with suspected renal cancer. *BMJ Open*, 10(5), e035938. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-035938>

Warren, A. Y., & Harrison, D. (2018). WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World Journal of Urology*, 36(12), 1913–1926. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2447-8>

Wen, Y. Y., Yang, Z. Q., Song, M., Li, B. L., Zhu, J. J., & Wang, E. H. (2010). SIAH1 induced apoptosis by activation of the JNK pathway and inhibited invasion by inactivation of the ERK pathway in breast cancer cells. *Cancer Science*, 101(1), 73–79. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01339.x>

Wolf, M. M., Kimryn Rathmell, W., & Beckermann, K. E. (2020). Modeling clear cell renal cell carcinoma and therapeutic implications. *Oncogene*, 39(17), 3413–3426. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1234-3>

Wong, C. S. F., Sceneay, J., House, C. M., Halse, H. M., Liu, M. C. P., George, J., Potdevin Hunnam, T. C. U., Parker, B. S., Haviv, I., Ronai, Z., Cullinane, C., Bowtell, D. D., & Möller, A. (2012). Vascular normalization by loss of Siah2 results in increased chemotherapeutic efficacy. *Cancer Research*, 72(7), 1694–1704. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3310>

World Health Organization. (2022, febrero). *Cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Wu, W., Liu, X., Wei, L., Li, T., Zang, Y., Qian, Y., Bai, T., Li, J., Xie, M., Zhu, Y., Wang, Q., & Wang, L. (2018). Tp53 mutation inhibits ubiquitination and degradation of WISP1 via down-regulation of Siah1 in pancreatic carcinogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00857>

Xiao, Z., Wei, Z., Deng, D., Zheng, Z., Zhao, Y., Jiang, S., Zhang, D., Zhang, L. J., Fan, M., Chen, S., Wang, S., Ding, Y., Ye, Y., & Jiao, H. (2020). Downregulation of Siah1 promotes colorectal cancer cell proliferation and migration by regulating AKT and YAP ubiquitylation and proteasome degradation. *Cancer Cell International*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-020-1124-3>

- Zhan, B., Dong, X., Yuan, Y., Gong, Z., & Li, B. (2021). hZIP1 Inhibits Progression of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Suppressing NF- κ B/HIF-1 α Pathway. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.759818>
- Zhang, X., Liu, X., Xiong, R., & An, H.-X. (2022). Identification and validation of ubiquitin-proteasome system related genes as a prognostic signature for papillary renal cell carcinoma. *Aging*. <https://doi.org/10.18632/aging.204383>
- Zheleva, V., Bian, M., Gao, X., Odanga, J., Urban, Z., Njogu, M., Knudsen, B., Hoefler, R. A., Perry, R. R., & Tang, A. H. (2014). Inhibition of Established Pancreatic and Triple Negative Breast Tumor Growth by Blocking the Most Downstream Signaling Module, SIAH, in the Oncogenic ERBB/K-RAS Signaling Pathway. *Journal of the American College of Surgeons*, 219(3), S136–S137. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2014.07.327>
- Zhu, F., Li, H., Long, T., Zhou, M., Wan, J., Tian, J., Zhou, Z., Hu, Z., & Nie, J. (2021). Tubular Numb promotes renal interstitial fibrosis via modulating HIF-1 α protein stability. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1867(5). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166081>