



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
FACULTAD DE MEDICINA DE ALBACETE
Departamento de Ciencias Médicas

COMPLEJO HOSPITALARIO
UNIVERSITARIO DE
ALBACETE

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

***Estudio de la Vía de Señalización mediada por VHL y MAPKs
en el Carcinoma Renal de Células Claras Esporádico.
Implicaciones Clínicas y Pronósticas***

Trabajo presentado por
Leticia Serrano Oviedo
para optar al Grado de Doctor

Directores de Tesis

Dr. Antonio Santiago Salinas Sánchez
Dr. José Miguel Giménez Bachs
Dr. Ricardo Sánchez Prieto



El **Dr. Antonio S. Salinas Sánchez**, Doctor en Medicina, Jefe de Sección de Urología del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete y Profesor Asociado de Ciencias de la Salud del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Castilla La Mancha.

El **Dr. José M. Giménez Bachs**, Doctor en Medicina y Facultativo Especialista de Urología del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.

El **Dr. Ricardo Sánchez Prieto**, investigador del programa INCRECYT y director del laboratorio de Oncología Molecular del Centro Regional de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Castilla-La Mancha.

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral titulada “*Estudio de la Vía de Señalización mediada por VHL y MAPKs en el Carcinoma Renal de Células Claras Esporádico. Implicaciones Clínicas y Pronósticas*” ha sido realizada bajo nuestra dirección por Doña Leticia Serrano Oviedo, en el laboratorio de Oncología Molecular del Centro Regional de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Castilla-La Mancha y Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.

Que consideramos que esta memoria reúne la calidad y el rigor científico necesarios para ser defendida en la Universidad de Castilla-La Mancha como requisito para que **Leticia Serrano Oviedo** aspire al grado de Doctor.

Para que conste donde proceda, firmamos la siguiente autorización, en Albacete a 16 de Mayo de 2015

Antonio S. Salinas Sánchez

José M. Giménez Bachs

Ricardo Sánchez Prieto

A mis padres Justino e Inés

Y a mis hermanas Nerea y Paula.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo a todas aquellas personas que me han apoyado incondicionalmente a lo largo de este proyecto ya que sin ellos no habría sido posible llevarlo a cabo. Tengo tantas personas a las que dar las gracias que seguramente me olvidaré de nombrar a alguna. Así pues, desde aquí y de manera general, os quiero agradecer de todo corazón vuestra ayuda y dedicaros este trabajo porque creo que también es vuestro.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis, los doctores Antonio S. Salinas Sánchez, José Miguel Giménez Bachs y Ricardo Sánchez Prieto, por formarme como científica con el mejor ejemplo a seguir, por ser mis guías, por vuestros consejos y porque realmente estoy feliz por haber tenido la suerte de trabajar con vosotros. Antonio, gracias por apostar y confiar en mí desde el primer momento, por estar siempre ahí pendiente de que no me faltase nada y hacer posible todo esto; José Miguel, gracias por estar siempre a mi lado, por tu dedicación y paciencia, instrucciones y consejos; Ricardo, gracias por acogerme en tu laboratorio, porque es un privilegio aprender de ti y porque nunca me ha faltado tu ayuda. A los tres, más que jefes, os considero amigos; no sólo me habéis dado la oportunidad de conoceros como profesionales sino también como personas en el día a día. Es todo un orgullo para mí poder decir que he estado al lado de los mejores.

A la Fundación Leticia Castillejo, y en concreto a Adolfo y Rosa, porque realizan una labor admirable y porque sin su apoyo económico esta tesis no habría podido llegar a su fin.

A todos mis compañeros que han pasado por el laboratorio de Oncología Molecular, desde el primero hasta el último: Antonio e Inma, por vuestra ayuda en mis comienzos; a Juanlu, Eva, Elena, Clara, Ali, Miguel, Llanos, Pedro, Laura, Marta, Raquel, por vuestra alegría, risas, por estar ahí en el día a día aguantándome, con mención especial a Jesús y a Fran con los que he convivido más tiempo (porque más que trabajar ha sido convivir) y he llegado hasta el final de este proyecto; a todos gracias por estar siempre ahí, me llevo lo mejor de cada uno de vosotros y os voy a recordar siempre.

A mis compañeros de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, comenzando por la directora María Dolores García Olmo, Charo, por quien llegué aquí, María, Gelu, Pedro, María Jesús, Jose, mi Juanma, etc. A todos mil gracias por recibirme siempre con una sonrisa.

A la doctora Teresa Nam Cha del servicio de Anatomía Patológica por su ayuda indispensable con el desarrollo de las técnicas de inmunohistoquímica.

A Javier Vacas, quien me inició en la Biología. A todos mis amigos y compañeros de la facultad de medicina y CRIB: Chiqui, Joel, Carlos, Dani, Lolín, Viki, Nica, Elenita, Ana, Pedro, Miguel, Silvia, Bea, etc., con los que he aprendido, he pasado muy buenos momentos y hacen de la facultad un sitio mejor. No quiero olvidar a Francisco Navarro por su ayuda con el diseño de la portada.

Quiero dar las gracias también a aquellas personas que sin ser del gremio científico han sido un pilar fundamental para el desarrollo de esta tesis y que son las personas que en el día a día están siempre ahí animándome y haciéndome crecer como persona.

A mi cuñado Josema, a mis primos y familia.

A José Antonio Barraión Gascón a quien, más que amigo, considero mi hermano. Marquesito, gracias por estar siempre ahí.

A Mateo, Mariajo, Gema, Vivi, Paloma, Patri, Bego, Raquel (Ramo), Lucía, Laura, Dani, Lourdes, Caterina, Conchita, Fani, Juanga, Inés, Marc, Conchi Ruescas, Juande, Pepito, Pedrulas, Luis, Loren, Arantxa, Isma, Roci; a mis amigos de los cuatro puntos cardinales, os quiero amigos gracias por hacerme quien soy. A todos los chicos de “la sede”: Sonia, Ana, River, Mari, Ángela, David, Patri, Joana, Tino, Kike, etc, porque habéis sido una sorpresa y alegría en el tramo final de esta tesis.

Y para terminar quiero destacar a las personas más importantes en mi vida, mis padres y mis hermanas. Sé que esta tesis a quien más ilusiona es a ellos, porque siempre me apoyan en todo lo que hago y mis triunfos son los suyos. Os quiero y esta tesis os pertenece. Por todo... ¡Gracias!.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DETALLADO	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xiii
1.-INTRODUCCIÓN	1
2.- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
3.-MATERIAL Y METODO	37
4.-RESULTADOS	54
5.- DISCUSION	97
6.- CONCLUSIONES	127
7.- RESUMEN	131
8.- BIBLIOGRAFÍA	137
9.- ANEXOS	155

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- ASPECTOS CLÍNICOS	3
1.1.1.- EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA	3
1.1.2.- DIAGNÓSTICO	5
1.1.3.- DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO	6
1.1.3.A.- SUBTIPOS HISTOLÓGICOS	8
1.1.3.B.- GRADO NUCLEAR	9
1.1.3.C.- OTROS FACTORES HISTOLÓGICOS	9
1.1.3.D.- ESTADIO TUMORAL	9
1.1.4.- TRATAMIENTO	11
1.2.- ASPECTOS MOLECULARES	12
1.2.1.- BIOLOGÍA MOLECULAR Y CCR	12
1.2.2.- EL GEN VHL	13
1.2.2.A.- MAPEO, IDENTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL GEN VHL	13
1.2.2.B.- ESTRUCTURA DEL GEN VHL	14
1.2.2.C.- ALTERACIONES EN EL GEN VHL	15
1.2.3.- LA PROTEÍNA VHL	16
1.2.3.A.- LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	16
1.2.3.B.- ESTRUCTURA Y TAMAÑO	16
1.2.3.C.-PROTEÍNAS DE UNIÓN A VHL	17
1.2.3.C.1-ELONGINAS	18
1.2.3.C.2.- CUL2	18
1.2.3.C.3.- HIF1- α (Factor Inducible por Hipoxia)	18
1.2.3.C.3.a.-ESTRUCTURA	18
1.2.3.C.3.b.- MECANISMOS MOLECULARES	20
1.2.3.C.3.c.- FUNCIÓN	21
1.2.3.D.- PROTEÍNAS DIANA DE VHL	22
1.2.3.D.1.- CAIX	22
1.2.3.D.2.- VEGF	23
1.2.4.- SEÑALIZACIÓN CELULAR	25
1.2.4.A.- RUTA DE LAS MAPK	25
1.2.4.B.- ERK (Extracelular regulatedKinase)	27
1.2.4.B.1.- ERK1/2	27
1.2.4.B.2. - ERK5	29

2.- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
2.1.- JUSTIFICACIÓN	33
2.2.- HIPÓTESIS	35
2.3.- OBJETIVOS	36
3.- MATERIAL Y MÉTODO	37
3.1.- DISEÑO Y SUJETOS DEL ESTUDIO	39
3.2.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS	39
3.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN	40
3.4.- VARIABLES DEL ESTUDIO	40
3.4.1.- VARIABLES DEPENDIENTES	40
3.4.1.A.- MUTACIÓN DEL GEN VHL	40
3.4.1.B.- METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN VHL	41
3.4.1.C.- EXPRESIÓN DE VHL POR INMUNOHISTOQUÍMICA	41
3.4.1.D.- EXPRESIÓN DE CAIX DE LA PROTEÍNA VHL POR WESTERN BLOT	42
3.4.1.E.- EXPRESIÓN DE CA-IX POR INMUNOHISTOQUÍMICA	42
3.4.1.F.- EXPRESIÓN DE HIF-1 α POR INMUNOHISTOQUÍMICA	42
3.4.1.G.- EXPRESIÓN DE VEGF POR INMUNOHISTOQUÍMICA	43
3.4.1.H.- EXPRESIÓN DE ERK5 POR WESTERN BLOT	43
3.4.1.I.- EXPRESIÓN DE ERK2 POR WESTERN BLOT	43
3.4.2.- VARIABLES INDEPENDIENTES	44
3.4.2.A.- VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS	44
3.4.2.B.- VARIABLES RELACIONADAS CON EL TUMOR ACTUAL	44
3.5.- METODOLOGÍA	45
3.5.1.- LÍNEAS Y CULTIVOS CELULARES	45
3.5.2.- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	46
3.5.3.- PCR. AMPLIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	47
3.5.4.- ESTUDIO DEL ESTATUS GENÉTICO DE VHL	48
3.5.5.- ESTUDIO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE VHL	49
3.5.6.- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA	50
3.5.7.- WESTERN BLOT	51
3.5.8.- ANÁLISIS POR INMUNOHISTOQUÍMICA	52

3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
3.6.1.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO	53
3.6.2.- ANÁLISIS BIVARIANTE	53
3.6.3.- ANÁLISIS DE CONCORDANCIA	54
3.6.4.- ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE REGRESIÓN LOGÍSTICA	54
4. RESULTADOS	57
4.1.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA, VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS	59
4.1.1.- RECOGIDA DE LAS MUESTRAS	59
4.1.2.- EDAD	59
4.1.3.- SEXO	60
4.1.4.- LATERALIDAD, LOCALIZACIÓN Y CLÍNICA	60
4.1.5.- HISTOLOGÍA	61
4.1.6.- GRADO DE FUHRMAN	62
4.1.7.- CLASIFICACIÓN TNM	62
4.1.7.A.- TUMOR PRIMARIO (pT)	62
4.1.7.B.- GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (pN)	63
3.1.7.C.- METÁSTASIS A DISTANCIA (pM)	63
3.1.7.D.- AGRUPACIÓN POR ESTADIOS	64
4.2.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA CAIX	64
4.3.- ANÁLISIS GENÉTICO DE VHL	69
4.3.1- MUTACIONES DEL GEN VHL	69
4.3.1.A.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES SEGÚN SU LOCALIZACIÓN GENÓMICA	71
4.3.1.B.- TIPO DE MUTACIÓN	72
4.3.2.- METILACIÓN <i>VHL</i>	78
4.3.3.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE VHL MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA	81
4.4.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HIF-1α	84
4.5.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA VEGF	87
4.6.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA ERK5	91
4.7.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA ERK1/2	95
4.8.- ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE REGRESIÓN LOGÍSTICA	96

5.- DISCUSIÓN	97
5.1 COMENTARIOS AL MÉTODO	99
5.1.1 TIPO DE ESTUDIO	99
5.1.2.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES DE LA MUESTRA	101
5.1.2.1.- MOTIVO DE CONSULTA DE LOS PACIENTES	101
5.1.2.2.- LOCALIZACIÓN TUMORAL Y TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES	102
5.1.2.3.- ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	103
5.1.2.4.- GRADO NUCLEAR	103
5.1.2.5.- ESTADIO TUMORAL SEGÚN LA CLASIFICACIÓN TNM	104
5.1.3.- ESTUDIO GENÉTICO DE LAS MUESTRAS	105
5.1.3.1.-OBTENCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN	105
5.1.3.2.-ANÁLISIS POR SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>VHL</i>	106
5.1.3.3.-ANÁLISIS POR METILACIÓN DEL PROMOTOR DE <i>VHL</i>	107
5.1.3.4.-ANÁLISIS POR INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS <i>VHL</i> , <i>CAIX</i> , <i>HIF1- ALPHA</i> Y <i>VEGF</i>	108
5.1.3.5.-ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LAS PROTEÍNAS <i>CAIX</i> , <i>ERK5</i> , <i>ERK2</i>	109
5.2.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA <i>CAIX</i>	110
5.3. ESTUDIO DEL GEN Y LA PROTEÍNA <i>VHL</i>	112
5.3.1. ESTUDIO MUTACIONAL DE <i>VHL</i>	113
5.3.2. ESTUDIO EPIGENÉTICO DEL GEN <i>VHL</i>	117
5.3.3. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA <i>VHL</i> MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA	119
5.4. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA <i>HIF-1 ALPHA</i>	120
5.5. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA <i>VEGF</i>	121
5.6. ESTUDIO DE LAS MAPK (<i>ERK 5</i> Y <i>ERK 2</i>)	123
6.- CONCLUSIONES	127
7.- RESUMEN	131
8.- BIBLIOGRAFÍA	137
9.- ANEXOS	155

ÍNDICE DE TABLAS

- TABLA 1.-** Clasificación de los tumores epiteliales malignos (CCR). Pág. 7.
- TABLA 2.-** Clasificación de Fuhrman. Pág. 9.
- TABLA 3.-** Clasificación TNM/Agrupación por estadios. Pág. 10.
- TABLA 4.-** Secuencias de los cebadores utilizados para la PCR de los fragmentos a amplificar. Pág. 48.
- TABLA 5.-** Secuencias de los cebadores de los amplicones VHL .Pág. 50.
- TABLA 6.-** Anticuerpos primarios utilizados para la técnica de western blot y condiciones de incubación .Pág. 51.
- TABLA 7.-** Anticuerpos utilizados para la técnica de inmunohistoquímica. Pág. 52.
- TABLA 8.-** Lateralidad, localización y clínica. Pág. 61.
- TABLA 9.-** Frecuencia y porcentaje de estadios pT, pN, pM y TNM. Pág. 63.
- TABLA 10.-** Relación entre las técnicas de western blot e inmunohistoquímica. Pág. 65.
- TABLA 11.-** Comparativa entre western blot e inmunohistoquímica. Pág. 67.
- TABLA 12.-** Estudio de concordancia mediante índice kappa y los acuerdos específicos. Pág. 67.
- TABLA 13.-** Relación de la expresión de CA-IX con la clínica. Pág. 68.
- TABLA 14.-** Relación de la expresión de CA-IX con los parámetros patológicos. Pag.68.
- TABLA 15.-** Relación entre la presencia de mutación y los datos clínicos. Pág. 70.
- TABLA 16.-.** Relación entre la presencia de mutación y los parámetros patológicos. Pág. 71.

- TABLA 17.-** Localización de las mutaciones. Pág. 72.
- TABLA 18.-** Tipos de mutaciones encontradas, cambio que originan en el codón en el que se encuentran y su localización. Pág. 73.
- TABLA 19.-** Diferentes deleciones encontradas, localización y efecto de cambio sobre el codón. Pág. 74.
- TABLA 20.-** Diferentes inserciones encontradas, localización y efecto de cambio sobre el codón. Pág. 75.
- TABLA 21.-** Resumen del estudio mutacional de VHL. Pág. 77.
- TABLA 22.-** Relación entre el estado de metilación y los datos clínicos. Pág. 79.
- TABLA 23.-** Relación entre el estado de metilación de VHL y los parámetros patológicos. Pág. 80.
- TABLA 24.-** Relación entre las alteraciones de VHL (mutado, hipermetilado o ambas) y diferentes parámetros patológicos. Pág. 81.
- TABLA 25.-** Inmunohistoquímica de VHL y número de casos encontrados según el lugar de expresión. Pág. 82.
- TABLA 26.-** Relación entre la presencia de mutación y la expresión de VHL por inmunohistoquímica. Pág. 82.
- TABLA 27.-** Relación entre el grado de Fuhrman y la expresión de VHL por inmunohistoquímica. Pág. 83.
- TABLA 28.-** Relación entre la expresión de HIF-1 α y los parámetros clínicos. Pág. 85.
- TABLA 29.-** Relación entre los parámetros patológicos y la expresión de HIF-1 α mediante inmunohistoquímica. Pág. 86.
- TABLA 30.-** Relación entre las alteraciones de VHL (mutado, hipermetilado o ambas) y la expresión de HIF-1 α . Pág. 86.
- TABLA 31.-** Relación entre la expresión de VEGF y los parámetros clínicos. Pág. 88.
- TABLA 32.-** Relación entre la expresión de VEGF y los diferentes parámetros patológicos. Pág. 89.
- TABLA 33.-** Relación entre las alteraciones de VHL (mutado, hipermetilado o ambas) y la expresión de VEGF. Pág. 90.

- TABLA 34.-** Relación entre la expresión de ERK5 por western blot con datos clínicos. Pág. 92.
- TABLA 35.-** Relación entre la expresión de ERK5 por western blot parámetros patológicos. Pág. 93.
- TABLA 36.-** Relación entre la expresión de ERK5 por western blot con la expresión de VHL por inmunohistoquímica. Pág. 94.
- TABLA 37.-** Relación entre las alteraciones de *VHL* (mutado, hipermetilado o ambas) y la expresión de ERK5. Pág. 94.
- TABLA 38.-** Relación entre la expresión de ERK5 por western blot con la expresión de VEGF por inmunohistoquímica. Pág. 95.
- TABLA 39.-** Frecuencia y porcentaje de expresión de ERK1/2 por western blot. Pág. 95.
- TABLA 40.-** Variables asociadas en los modelos de regresión logística con la existencia de metástasis. Pág. 96.

IV ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.-** Representación esquemática en la nefrona de los diferentes subtipos de CCR de acuerdo a la clasificación de Heidelberg en relación con sus posiciones en la nefrona y en los tubos colectores. Se indican las alteraciones genéticas características de los subtipos de CCR. Pág. 7.
- FIGURA 2.-** Esquema del gen VHL. Pág. 15.
- FIGURA 3.-** Esquema con las funciones de VHL y su interacción con otras proteínas. Pág. 17.
- FIGURA 4.-** Estructura molecular de HIF-1 α . Pág. 19.
- FIGURA 5.-** Esquema del mecanismo molecular de la ruta de VHL. Pág. 20.
- FIGURA 6.-** Esquema de las distintas isoformas de VEGF y sus receptores. Pág. 24.
- FIGURA 7.-** Cascada de señalización de las MAPKs. Se representan las diferentes rutas de señalización indicando los estímulos principales de cada ruta y las respuestas que desencadenan. Pág. 26.
- FIGURA 8.-** Ruta de ERK. Pág. 28.
- FIGURA 9.-** Edad de los pacientes. Pág. 60.
- FIGURA 10.-** Frecuencia de diagnóstico de los diferentes subtipos de CCR. Pág. 62.
- FIGURA 11.-** Inmunohistoquímica de CA-IX en el tejido tumoral y western blot de CAIX en tejido tumoral y parénquima renal sano en diferentes subtipos histológicos de CCR: a) Carcinoma renal de célula clara; b) Cromóforo; c) Papilar; d) Inclasificado con componente de célula clara. Pág. 66.

- FIGURA 12.-** Mutación puntual. Secuencias de muestras de ADN control (parte superior) y mutado (parte inferior) de pacientes diagnosticados de CCRCC. En la secuencia mutada podemos observar un cambio de base (G por T) en la región central de la misma. También se muestra el cambio que dicha mutación genera. Pág. 73.
- FIGURA 13.-** Delección. Secuencias de muestras de ADN control (parte superior) y mutado (parte inferior) de pacientes diagnosticados de CCRCC. En la secuencia mutada podemos observar una delección de una Adenina. También se muestra el cambio que dicha mutación genera. Pág. 75.
- FIGURA 14.-** Inserción. Secuencias de muestras de ADN control (parte superior) y mutado (parte inferior) de pacientes diagnosticados de CCRCC. En la secuencia mutada podemos observar una inserción de una Timina. También se muestra el cambio que dicha mutación genera. Pág. 76.
- FIGURA 15.-** Patrón de metilación de los tumores analizados y de las dos líneas celulares tomadas como control (eje x) en 26 sitios CpGs (eje y). Pág. 78.
- FIGURA 16.-** Expresión de VHL por inmunohistoquímica. A: Positivo en membrana; B: Positivo en citoplasma; C: Membrana y citoplasma; D: Negativo. Pág. 83.
- FIGURA 17.-** Expresión de HIF-1 α por inmunohistoquímica. A: Intenso (+3); B: Moderado (+2); C: Leve (+1); D: Negativo. Pág. 84.
- FIGURA 18.-** Expresión de VEGF por inmunohistoquímica. A: Intenso (+3); B: Moderado (+2); C: Leve (+1); D: Negativo. Pág. 87.
- FIGURA 19.-** Imagen representativa de la expresión de la proteína ERK5 mediante la técnica de western blot en una serie de tumores de CCRcc. N: Muestra tumoral, R: parénquima renal sano. Pág. 91.
- FIGURA 20.-** Imagen representativa de la expresión de la proteína ERK1/2 mediante la técnica de western blot en una serie de tumores de CCRCC. N: Muestra tumoral, R: Parénquima renal sano. Pág. 96.

V ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BMK1: “*Big MAPK 1*”

BSA: Albúmina Sérica Bovina

CA: Anhidrasa carbónica

CA-IX: Anhidrasa Carbónica IX

CCR: Carcinoma de células renales

CCRCC: Carcinoma renal de células claras

CCRNCC: Carcinoma renal no de células claras

CUL2: Cullina 2

DMEN: “*Dulbecco's Modified Eagle Medium*”

DMSO: Dimetil sulfóxido

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EPO: Eritropoyetina

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

HIF1- α : Factor inducible por hipoxia

IGF: Factor de crecimiento ligado a insulina

IHQ: Inmunohistoquímica

MAPK: proteínasquinasas activadas por mitógeno

MMP-1: Metaloproteinasa de matriz-1

ODD: Dominio de la degradación oxígeno-dependiente

JNK: “*c-Jun NH₂-terminal Kinase*”

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PLGF: Factor de crecimiento placentario

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

Rbx1: RING-box protein 1

TGF- α : Factor α de crecimiento transformante

TTBS: “*Tween Tris Buffer Saline*”

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VHL: vonHippel-Lindau

WB: Western blot

INTRODUCCIÓN **1**

1 INTRODUCCIÓN

1.1.- ASPECTOS CLÍNICOS

1.1.1.- EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA

Los tumores renales malignos representan entre el 2-3% de las neoplasias del adulto, suponiendo el carcinoma de células renales (CCR) aproximadamente el 90% de las patologías renales malignas.⁽¹⁾ Constituye el tercer tumor en frecuencia del aparato genitourinario, precedido por los tumores de próstata y vejiga.

El CCR se diagnostica generalmente en un rango de edad que va de los 55 a los 64 años. Por debajo de esta edad su incidencia es poco común, de manera que menos del 6% de los tumores renales aparecen por debajo de los 35 años.⁽²⁾ En los niños supone el 2% de las neoplasias infantiles. Es de 1,6 a 2 veces más frecuente en el sexo masculino.⁽¹⁾

En los últimos 20 años la incidencia del CCR ha ido aumentando alrededor de un 2% anualmente, lo que ha hecho que en Europa sea el décimo cáncer más común. En 2014 se estimaron 63.920 casos nuevos y se produjeron 13.860 muertes por cáncer renal.⁽²⁾

Al igual que se ha producido un incremento de la incidencia del cáncer renal, también lo ha hecho su mortalidad. Los factores de riesgo y el cambio o la exposición a ellos podrían estar implicados en que la mortalidad haya aumentado pese a que la

1 INTRODUCCIÓN

proporción de diagnóstico de tumores en estado avanzado ha decrecido. Es el diagnóstico incidental la causa fundamental de este incremento en la incidencia en estadios más precoces, en parte justificado por el mayor uso de técnicas de imagen y el avance de éstas. En cualquier caso la supervivencia en el CCR depende del estadio en el momento del diagnóstico, de manera que supera el 80% a los 5 años en los tumores en estadio I y II, disminuyendo considerablemente en el estadio III (aproximadamente el 50%) y de manera drástica en los estadios IV (por debajo del 20%).⁽¹⁾

Se han implicado numerosos agentes como posibles factores etiológicos en el desarrollo del carcinoma renal pero ninguno de ellos, salvo el tabaco, está hasta el momento claramente definido como agente causal. Entre los factores de riesgo implicados en esta patología podemos mencionar:

- *Tabaco*. La asociación entre el consumo de tabaco y CCR es un factor de riesgo confirmado. El riesgo de padecer cáncer renal disminuye con el cese del consumo.
- *Obesidad*. El sobrepeso, así como los cambios metabólicos, variaciones de peso y el del balance energético, han sido asociados con un elevado riesgo de padecer cáncer de células renales en ambos sexos, pero de manera más marcada en mujeres.^(3,4)
- *Dieta*. Hay estudios que relacionan ciertos nutrientes ricos en proteínas animales con la aparición de tumores renales, así como la ingesta de carnes muy hechas y fritas. Otros lo asocian más con un elevado aporte calórico que con dichos nutrientes. La dieta rica en vegetales y frutas parece tener acción protectora a padecer este tipo de tumor quizás, entre otros componentes, por los betacarotenos y la vitamina C.⁽⁵⁾
- *Herencia*. El CCR es un tumor que puede presentarse en el contexto de una enfermedad familiar hereditaria o de manera esporádica. El síndrome familiar más asociado a CCR es la enfermedad de von

Hippel-Lindau, aunque existen otros síndromes como la esclerosis tuberosa, el CCR de células claras familiar y el CCR papilar familiar. Una historia familiar de CCR en un caso en primer grado de consanguinidad incrementa el riesgo de padecerlo. No obstante, esta asociación es más débil que en otros tumores con factor hereditario.⁽⁶⁾

Otros factores de riesgo lo constituyen la exposición a diferentes carcinógenos (trabajadores expuestos al asbesto, cadmio, plomo inorgánico, derivados del petróleo) y la toma de determinados medicamentos (fenacetinas, paracetamol, tiazidas, betabloqueantes y anfetaminas).⁽¹⁾

1.1.2.- DIAGNÓSTICO

El CCR puede presentarse clínicamente de diversas formas, aunque más de la mitad de los casos se diagnostican de manera fortuita durante un estudio de imagen por cualquier otra causa. La tríada sintomatológica típica (dolor, masa en flanco y hematuria) es bastante infrecuente, presentándose en menos del 10% de los casos.⁽⁷⁾ Las distintas formas de presentación del carcinoma renal hacen difícil el diagnóstico de sospecha ya que, en aproximadamente un 20% de las ocasiones, su clínica es la derivada de las manifestaciones sistémicas que provoca la liberación de distintas sustancias por las células tumorales, constituyendo los síndromes paraneoplásicos. Pese a ello, hoy día, la forma de diagnóstico más habitual es la incidental y, en caso de que exista clínica, la hematuria es el síntoma más frecuente.⁽⁷⁾

La capacidad metastásica de estos tumores es independiente del tamaño tumoral, son neoplasias que tienen tendencia a la multifocalidad o presencia de nódulos satélites y la capacidad de progresión y de recurrencia es imprevisible ya que se han descrito recidivas tardías e incluso regresiones espontáneas de lesiones metastásicas. En resumen, la presencia de metástasis es frecuente, llegando hasta un 30% al diagnóstico, pudiendo aparecer éstas en sitios inusuales.⁽⁸⁾

1 INTRODUCCIÓN

Para el diagnóstico, la tomografía axial computarizada (TAC) se considera la prueba de imagen de elección. Se pueden encontrar aumento de la VSG, de la fosfatasa alcalina, anemia, poliglobulia, etc., pero no existen alteraciones analíticas específicas para el diagnóstico. La ecografía es el método con el que se detectan con más frecuencia las masas renales de manera incidental, en un alto porcentaje asintomáticas. Cuando por medio de ecografía se encuentra una masa renal sólida (o quística compleja), es obligatorio realizar una TAC. Esta prueba permite un estadiaje local y regional adecuado, además de la valoración de los vasos y de la posible presencia de metástasis a distancia. Si hay sospecha de metástasis óseas la prueba de elección será la gammagrafía ósea. La RMN se reserva para los casos de dudas diagnósticas o para la mejor caracterización de la afectación venosa o, en su caso, determinar el nivel de infiltración o invasión de la vena cava.⁽⁷⁾

1.1.3.- DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

El CCR se cree que se compone de un grupo heterogéneo de tumores derivados de las células epiteliales del túbulo contorneado proximal. Aunque existen estudios que sugieren que algunos subtipos derivan de componentes más distales de la nefrona.⁽⁹⁾

Actualmente, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se reconocen tres subtipos principales de CCR: CCR de células claras (CCRCC, que supone más del 80% de todos), CCR papilar (10-15%) y el CCR cromóforo (aproximadamente un 5%).⁽¹⁰⁾

El CCR se ha ido modificando en los últimos años gracias al apoyo que la citogenética y los estudios moleculares han proporcionado a la histopatología. Así pues, los hallazgos histológicos tienen una estrecha relación con los genéticos, por lo que la actual clasificación (Tabla 1) se basa en patrones histológicos definidos, apoyados por estudios genéticos tal y como se muestra en la figura 1.⁽¹⁰⁾

- CARCINOMAS DE CÉLULA RENAL**
- Carcinoma renal de célula clara
 - Carcinoma renal de célula clara variante multilocular
 - Carcinoma papilar
 - Carcinoma cromóforo
 - Carcinoma de ductos colectores de Bellini
 - Carcinoma renal medular
 - Carcinomas de translocación Xp11
 - Carcinoma asociado con neuroblastoma
 - Carcinoma renal mucinoso tubular y de células fusiformes
 - Carcinoma de célula renal inclasificado
 - Adenoma papilar
 - Oncocitoma

Tabla 1.- Clasificación de los tumores epiteliales malignos (CCR).⁽¹¹⁾

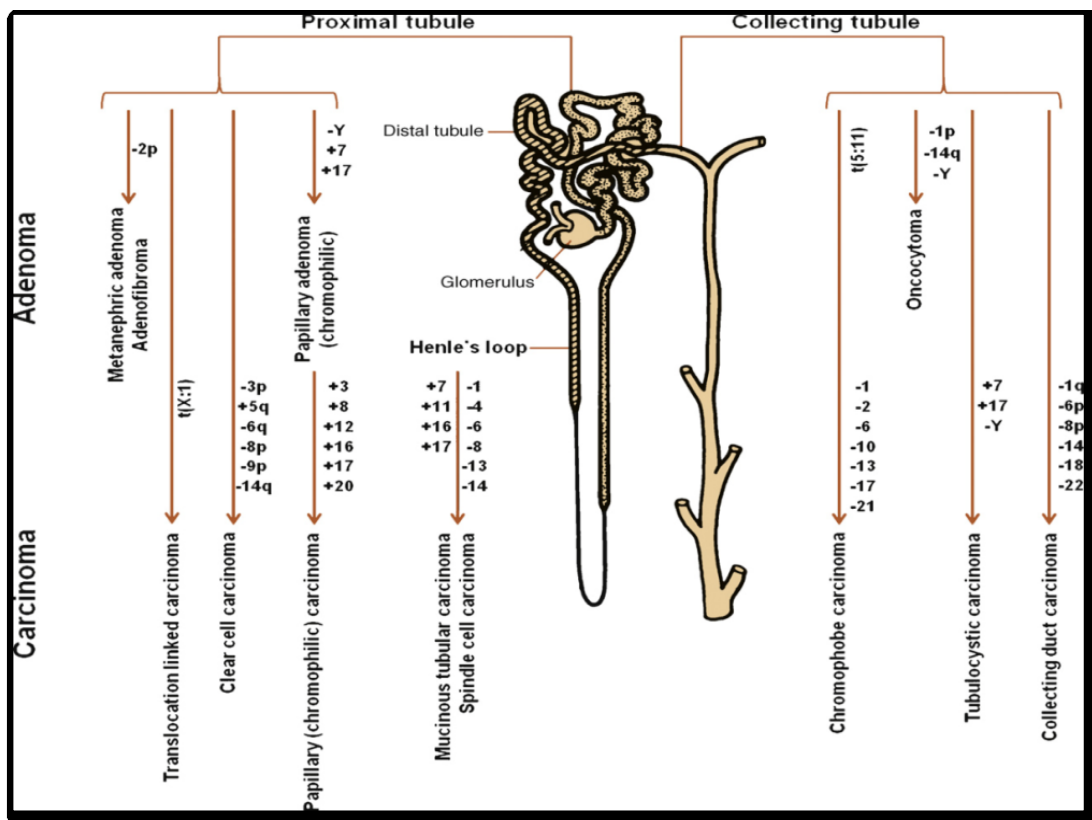


Figura1.- Representación esquemática en la nefrona de los diferentes subtipos de CCR de acuerdo a la clasificación de Heidelberg (ref.) en relación con sus posiciones en la nefrona y en los tubos colectores. Se indican las alteraciones genéticas características de los subtipos de CCR.⁽¹⁰⁾

1 INTRODUCCIÓN

1.1.3.A.- SUBTIPOS HISTOLÓGICOS

El CCR de células claras es el subtipo más frecuente dentro de los CCR llegando a suponer más de 80% de los mismos. Está compuesto por células cuboideas o poligonales con citoplasma amplio y claro, en ocasiones eosinófilo. Es característica la presencia de una red vascular de capilares sinusoidales muy prominente. Son positivos para citoqueratina y en ocasiones también para vimentina y antígeno epitelial de membrana (EMA) por inmunohistoquímica.⁽¹²⁾

En el estudio genético se caracterizan por presentar alteraciones en el gen de la enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL) en aproximadamente el 80% de los casos, ya sea por pérdida de material genético en el brazo corto del cromosoma 3 (3p), por la presencia de mutaciones o por inactivación de dicho gen por hipermetilación⁽¹³⁾. Otras localizaciones en las que se han encontrado alteraciones genéticas son en el brazo largo del cromosoma 5 (5q) (duplicación de fragmentos) y otros cromosomas como 6q, 8p, 9, 14q y 17p (deleciones en secuencias de ADN, implicando estas últimas peor pronóstico por una progresión tumoral más agresiva).^(13,14)

El CCRCC es seguido en frecuencia por el papilar (10%-15%) y el cromóforo (5%).⁽⁹⁾ El carcinoma de los ductos colectores, también llamado carcinoma de los ductos de Bellini, constituye menos del 1% de los CCR. La categoría de CCR inclasificado queda para los tumores que no se pueden catalogar en ninguna de las categorías descritas anteriormente, bien por su diferenciación sarcomatoide o bien porque su patrón arquitectural no responde a las características de los otros subtipos. Cada uno de estos subtipos tienen particularidades genéticas propias que los diferencian a nivel molecular.^(13,15,16)

La diferenciación sarcomatoide no es un subtipo de CCR propiamente dicho, sino que esta denominación se reserva para aquellos tumores que presumiblemente tienen un origen determinado y que han sufrido una transformación maligna, pobremente diferenciada, pero no son primitivamente sarcomatosos. Esta diferenciación sarcomatoide ocurre en el 4% de los CCR.⁽¹⁶⁾

Otros tipos menos frecuentes (translocación Xp11, asociado a neuroblastoma, mucinoso, tubular y de células fusiformes, etc.) son menos conocidos por su escasa incidencia y han entrado a formar parte de esta clasificación en los últimos años.

1.1.3.B.- GRADO NUCLEAR

Es un parámetro que cataloga las distintas características de los núcleos celulares y que se ha intentado poner en relación con el pronóstico de los pacientes con CCR. Han sido propuestas numerosas clasificaciones para el grado nuclear, aunque el sistema propuesto por Fuhrman⁽¹⁷⁾ (Tabla 2) es el más utilizado. Este sistema también está sujeto a controversia debido a ciertas limitaciones.⁽¹⁸⁾

GRADO	TAMAÑO NUCLEAR	CONTORNO NUCLEAR	NUCLEOLO
1	10µm	Redondeado y uniforme	Ausente o no prominente
2	15µm	Irregular	Pequeño
3	20µm	Irregular	Prominente
4	≥20µm	Multilobulado, bizarro	Prominente con grumos de cromatina gruesos

Tabla 2. Clasificación de Fuhrman.⁽¹⁷⁾

1.1.3.C.- OTROS FACTORES HISTOLÓGICOS

La invasión microvascular, la necrosis tumoral o la invasión del sistema colector son otros factores que podemos encontrar en el análisis histológico y que pueden tener importancia a la hora de valorar el pronóstico de estos tumores.

1.1.3.D.- ESTADIO TUMORAL

Actualmente el sistema de clasificación tumoral más ampliamente utilizado es el de TNM (Tablas 3 y 4)⁽¹⁹⁾, habiendo quedado obsoleto el clásico propuesto por Robson. Esta clasificación tiene importancia pronóstica y recoge parámetros de tamaño, invasión vascular y afectación de estructuras adyacentes (T), afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y presencia o no de metástasis a distancia (M).⁽¹⁹⁾

CLASIFICACIÓN TNM (UICC, 2009)		
Tumor primario	Tx	No se puede evaluar el tumor primario
	T0	No hay evidencia de tumor primario
	T1	Tumor de 7 cm. o menos en su diámetro mayor, limitado al riñón
	T1a	Tumor de 4 cm. o menos en su diámetro mayor, limitado al riñón
	T1b	Tumor de más de 4 cm. pero no más de 7 cm. en su diámetro mayor, limitado al riñón
	T2	Tumor de más de 7 cm. en su diámetro mayor, limitado al riñón
	T2a	Tumor de más de 7 cm. pero no más de 10 cm. en su diámetro mayor, limitado al riñón
	T2b	Tumor de más de 10 cm. en su diámetro mayor, limitado al riñón
	T3	Tumor que se extiende a la vena renal o tejidos perinéfricos, pero no a la glándula suprarrenal ipsilateral ni más allá de la fascia de Gerota
	T3a	Tumor que se extiende a la vena renal o sus ramas (incluyendo capa muscular), que invade la grasa perirrenal o del seno renal, pero no más allá de la fascia de Gerota
	T3b	Tumor que se extiende a la vena cava por debajo del diafragma
	T3c	Tumor que se extiende a la vena cava por encima del diafragma o invade la pared de la vena cava
	T4	Tumor que se extiende más allá de la fascia de Gerota (incluyendo extensión contigua a la glándula suprarrenal ipsilateral)
Ganglios regionales	Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
	N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
	N1	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales
Metástasis a distancia	M0	No hay metástasis a distancia
	M1	Metástasis a distancia

AGRUPACIÓN POR ESTADIOS	Estadio I	T1N0M0
	Estadio II	T2N0M0
	Estadio III	T1-2N1M0
		T3N0-1M0
	Estadio IV	T4N0-1M0
		T1-4N0-1M1

Tabla 3. Clasificación TNM/Agrupación por estadios.⁽¹⁹⁾

1.1.4.- TRATAMIENTO

La cirugía es considerada el tratamiento de elección en el cáncer renal. El objetivo de la misma es la extirpación de todo el tumor con un margen quirúrgico suficiente. La cirugía radical comprende la exéresis completa del riñón, glándula suprarrenal ipsilateral y linfadenectomía completa. La nefrectomía parcial o cirugía conservadora de nefronas (exéresis tumoral con margen quirúrgico de seguridad) se ha introducido, en los últimos años, como una técnica alternativa a la cirugía radical que, en casos seleccionados y aún con riñón contralateral sano, obtiene resultados similares a los conseguidos con la nefrectomía radical.⁽²⁰⁾

El CCR es uno de los tumores con menos respuesta al tratamiento quimioterápico, lo que le confiere mayor dificultad a la hora del tratamiento. Tampoco las radiaciones o la hormonoterapia han sido efectivas hasta el momento. En los casos de tumores metastásicos se utiliza la inmunoterapia basada en la modulación de la respuesta biológica que se establece entre el tumor y el huésped, en especial con su sistema inmune. Las moléculas que más utilidad han demostrado en este sentido son el interferón alfa (IFN- α) y la interleuquina-2 (IL-2), habiéndose descrito remisión de metástasis.⁽⁷⁾

Recientemente han aparecido una serie de tratamientos sistémicos dirigidos a dianas moleculares implicadas en la génesis del CCR, fundamentalmente los inhibidores de las tirosin quinasas y los inhibidores de mTOR. De los primeros destacan el sunitinib, sorafenib y pazopanib, y de los segundos, el temsirolimus. También existe el bevacizumab, un anticuerpo monoclonal que neutraliza un factor angiogénico, VEGF. Estos tratamientos, solos o en combinación con inmunoterapia han superado en algunos casos la utilidad de la inmunoterapia sola, en términos de supervivencia, aunque todavía no ofrecen buenos resultados a largo plazo.⁽²⁰⁾

1 INTRODUCCIÓN

1.2.- ASPECTOS MOLECULARES

1.2.1.- BIOLOGIA MOLECULAR Y CCR

En los últimos años y con la necesidad de profundizar en el conocimiento de las enfermedades, se ha abierto un vasto campo de investigación con la Biología Molecular.

Centrándonos en las neoplasias, se han hallado evidencias que nos ayudan a comprender la génesis del tumor y la predisposición a padecerlo en los casos hereditarios y quizá a lograr hallar un marcador biológico que pueda orientarnos en la indicación de distintos tratamientos en función de los rasgos moleculares del tumor.

En los primeros estudios realizados sobre genética molecular del cáncer de riñón se halló lo que en la actualidad se considera la alteración genética más frecuente del CCR, la pérdida de material genético en el brazo corto del cromosoma 3 (3p) tanto en carcinomas esporádicos como familiares. En general, las alteraciones genéticas en esta localización llegan a presentar una frecuencia del 90% en el caso de los esporádicos. A partir de ahí y gracias a técnicas como la secuenciación y estudios de metilación del ADN, se ha profundizado en las alteraciones que presenta el cáncer de riñón⁽²¹⁾ y se han podido establecer características propias y exclusivas del CCR.

Aún así, el CCR, como todos los tumores, tiene peculiaridades propias. La variabilidad de comportamiento que presenta el CCR hace que todavía exista mucho camino por recorrer para poder llegar a conclusiones que, desde la genética, permitan el uso de estas técnicas para un método adecuado de diagnóstico, tratamiento o pronóstico.

La inactivación de la proteína VHL, de la cual se hablará en profundidad en este apartado, está asociada con la enfermedad de von Hippel-Lindau, un síndrome tumoral hereditario transmitido genéticamente siguiendo un patrón de herencia

autosómica dominante. La inactivación de dicha proteína también se ha relacionado con CCRCC esporádico (sin relación familiar ni hereditaria) por lo que su estudio resulta de gran interés y constituye el eje central de esta tesis.

1.2.2.- EL GEN *VHL*

1.2.2.A.- MAPEO, IDENTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL GEN *VHL*

La principal alteración que se ha evidenciado en el cariotipo del CCRCC es la pérdida del 3p, donde se encuentra el gen *VHL* en 3p25.⁽²²⁾ Este gen fue identificado en 1993 a través de estudios familiares de la enfermedad de von Hippel Lindau en la cual los afectados de esta enfermedad estaban predispuestos a padecer tumores en el sistema nervioso central, glándula adrenal, riñón y ojo.⁽²³⁾ Las alteraciones que afectan al gen *VHL* aparecen en casi un 100% de los pacientes con un fenotipo clínico de enfermedad de von Hippel-Lindau. Así pues, en los casos familiares, han sido descritas más de 500 mutaciones distintas (germinales y somáticas) en familias afectadas por la enfermedad, siendo en su mayoría puntuales y de las llamadas “sin sentido”, metilación del promotor del gen o pérdida del alelo salvaje en el tumor.⁽²⁴⁾

Posteriormente y durante años, en el estudio del cáncer de células renales de aparición esporádica, numerosos estudios han informado diferentes tipos de mutaciones somáticas del gen *VHL* en distintos porcentajes que oscilan entre el 22%⁽²⁵⁾ y el 50%.⁽²⁶⁾ Las mutaciones en los CCRCC de aparición esporádica, son más variadas; es frecuente encontrar mutaciones puntuales, pero también deleciones e inserciones que dan como resultado una proteína trunca. También se han publicado datos de hipermetilación del promotor del gen de *VHL*, cuyos porcentajes oscilan entre el 10 y el 20%.⁽²⁶⁾ Además se han encontrado otro tipo de alteraciones como la pérdida del brazo corto del cromosoma 3 (3p), y pérdida de heterocigosidad en casos esporádicos de CCRCC.⁽²⁴⁾

1 INTRODUCCIÓN

El producto del gen *VHL* regula la transcripción de diversos genes con importancia en la génesis del tumor a través del factor inducible por hipoxia HIF1- α . El silenciamiento de *VHL* desencadena la sobreexpresión de un numeroso grupo de proteínas relacionadas con respuesta a hipoxia, la regulación del pH intracelular, angiogénesis, etc.⁽²⁴⁾

En los casos esporádicos de CCRCC, numerosos estudios han analizado mutaciones y metilación del gen *VHL* pero pocos han examinado la relevancia clínica de estas alteraciones. Sin embargo esta información puede tener una gran importancia en términos de pronóstico y tratamiento en cuanto a terapias diana específicas.

Diversos estudios no han encontrado diferencias en la frecuencia de mutación con relación al grado del tumor, estadio, tamaño o proliferación celular del tumor, aunque se ha descrito que se ha incrementado el ratio de mutaciones y metilación en tumores pT3. Se ha observado un peor pronóstico y supervivencia en pacientes con mutaciones que generan una pérdida de función, aunque otros encuentran mutaciones y metilación fuertemente asociadas con mejor pronóstico en estadios pT1, 2 y 3, pero no en estadio 4.⁽²⁷⁾

1.2.2.B.- ESTRUCTURA DEL GEN *VHL*

El gen *VHL* consta de tres exones que codifican un ARN mensajero (ARNm) de 4,5 kb. Engloba cerca de 20 Kb de ADN genómico del brazo corto del cromosoma 3, concretamente se sitúa en el locus 3p25-26 del genoma humano. Los 642 nucleótidos que contiene codifican un polipéptido de 213 aminoácidos con un peso molecular de 28-30 kDa (*VHL*).⁽²⁴⁾ En la figura 2 se muestra la estructura básica del gen *VHL* y la disposición y regiones funcionales de la proteína *VHL*.

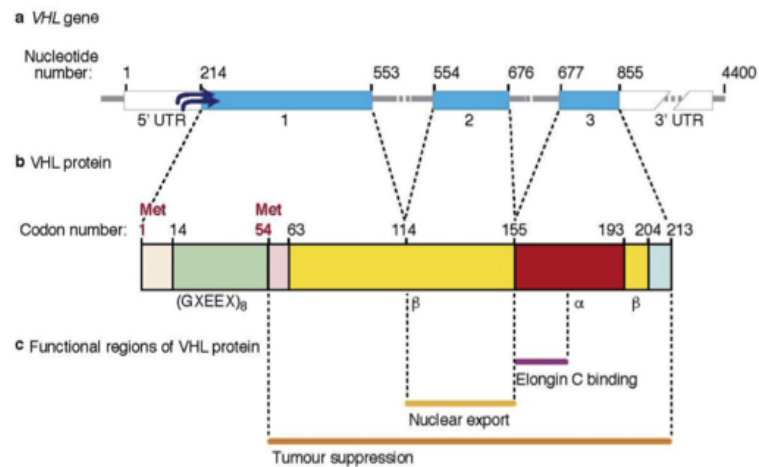


Figura 2. Esquema del gen y proteína VHL.⁽²⁴⁾

1.2.3.C.- ALTERACIONES EN EL GEN VHL

Entre las alteraciones descritas en el gen VHL podemos encontrar:

Mutaciones: Se han descrito multitud de mutaciones tanto germinales como somáticas en el gen de VHL.⁽²⁸⁾

Las mutaciones germinales son aquéllas heredadas y que se encuentran en todas las células del individuo. Han sido identificadas mutaciones germinales del gen VHL en más de 500 familias con enfermedad de von Hippel Lindau alrededor del mundo, mostrando una heterogeneidad considerable tanto en el tipo de mutación como en su localización.⁽²⁴⁾

En contraste con las mutaciones germinales, las mutaciones somáticas están confinadas a las células somáticas del individuo y no se heredan. Las mutaciones somáticas que ocurren en genes supresores tumorales en tejidos relevantes pueden inducir el desarrollo de un tumor. La mayor parte de las mutaciones encontradas en los pacientes con CCR se han encontrado a partir del codón 54.^(24,29)

1 INTRODUCCIÓN

Metilación: El gen *VHL* puede ser inactivado también por hipermetilación de las islas CpG de la región 5'. Este fenómeno se ha visto en un gran número de genes supresores tumorales.⁽³⁰⁾ La hipermetilación del promotor del gen *VHL* ha sido detectada en el 33% de los tumores que no mostraron pérdida de heterocigosidad, incluyendo CCR y hemangioblastoma.⁽³¹⁾

1.2.3.- LA PROTEÍNA VHL

1.2.3.A.- LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

Podemos encontrar diferentes patrones de localización de *VHL*. Esta proteína reside primariamente en el citoplasma de las células, pero se puede encontrar en el núcleo como consecuencia de una sobreproducción de la misma.⁽²³⁾ Además *VHL* se mueve entre ambos compartimentos y su localización queda condicionada por su funcionalidad.⁽³²⁾

1.2.3.B- ESTRUCTURA Y TAMAÑO

Se conocen 2 isoformas de la proteína. La primera y mayoritaria posee un peso molecular de 24-30 kDa y su secuencia es completa. La segunda isoforma, debido a una pérdida de una porción del exón 2 en la traducción, es de tamaño menor siendo su peso de 18-19 kDa. Ambas proteínas tienen función supresora de tumores. Las modificaciones post-transcripcionales se están estudiando y se sugiere que *VHL* puede ser fosforilada por otras proteínas.⁽³³⁾

La proteína *VHL* contiene dos dominios:

- El dominio β , está formado por una cadena de siete láminas β (que comprende del aminoácido 63 al 154) y una hélice α (aminoácidos de 193 a 204).

- El dominio α , más pequeño que el anterior, está formado por tres hélices α (aminoácidos de 155 a 192). Este dominio contiene zonas de interacción con otras proteínas.⁽²⁴⁾ En este dominio es donde se han evidenciado multitud de mutaciones.⁽³⁴⁾

1.2.3.C.-PROTEÍNAS DE UNIÓN A VHL

La proteína VHL es una ubiquitín ligasa que interactúa con unas proteínas denominadas elonginas C (14-18KDa) y B (9-14KDa) formando un complejo que facilita el proceso de degradación de sus proteínas diana por ubiquitinación. Esta actividad está gobernada por el reconocimiento de prolinas hidroxiladas de las moléculas diana, por VHL. En la figura 3 se muestra la interacción de VHL con otras proteínas y las funciones que derivan de su actividad.

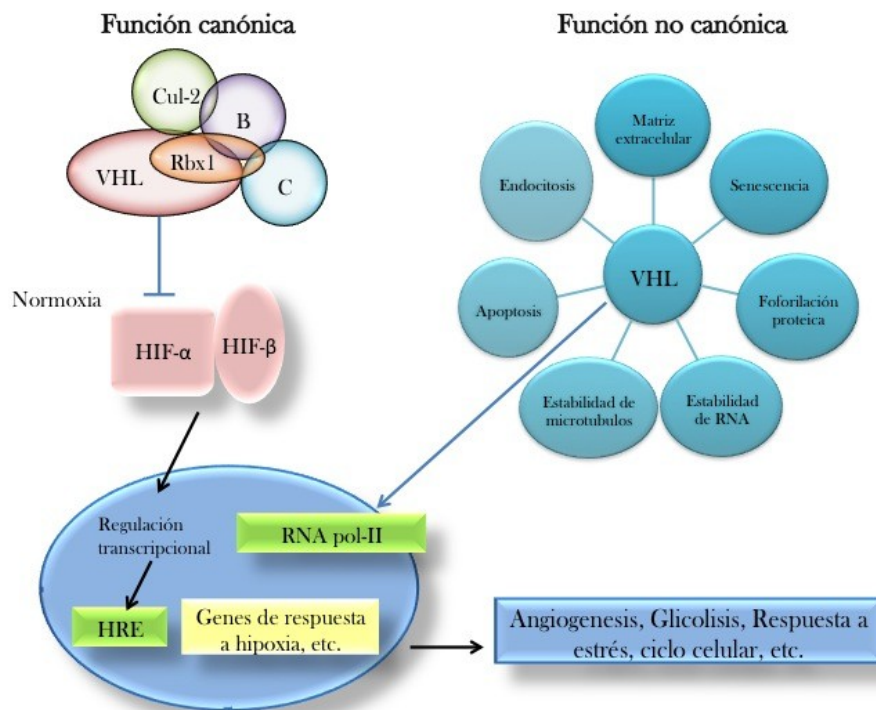


Figura 3. Esquema con las funciones de VHL y su interacción con otras proteínas.⁽³⁵⁾

1 INTRODUCCIÓN

1.2.3.C.1-ELONGINAS

En primer lugar VHL se une a la Elongina-B (por los aminoácidos 157-172 del dominio alfa de VHL) la cual a su vez se une a la Elongina-C en un mismo complejo llamado VCB.⁽³⁶⁻³⁹⁾

1.2.3.C.2.- CUL2

El complejo VCB se une a una proteína de 70-76 kDa denominada CUL2, miembro de la familia genética de las cullinas, implicadas en ciclo celular en levaduras. El complejo VCB-CUL2 posee actividad E3-ubiquitin-ligasa (marca su molécula diana con ubiquitinas) que se complementa con la proteína Rbx1 que enriquece la actividad ligasa.^(34,37)

1.2.3.C.3.- HIF1- α (FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA)

En la función ubiquitin ligasa de este complejo macromolecular compuesto por VCB, CUL2 y RBX-1, radica parte de la función supresora del gen *VHL*, puesto que este complejo mencionado es capaz de degradar, entre otras, a la proteína HIF1- α , factor de transcripción cuya misión es la transactivación de ciertos genes cuyo producto proteico aumenta la captación de oxígeno (VGEF, PDGF, EPO, etc.) o regula la adaptación metabólica cuando el oxígeno ambiental es limitado.^(39,40)

1.2.3.C.3.a.-ESTRUCTURA

El gen *HIF1- α* , codifica el factor inducible por hipoxia (HIF1- α). Se localiza en el locus 14q21-q249, el cual posee 15 exones. La proteína HIF1- α es un heterodímero compuesto por cadenas alfa (reguladas por el O₂) y beta, dispuestas en doble hélice (β HLH). Este pertenece a una familia de factores de transcripción que consta de tres subunidades alfa (HIF1- α , HIF2- α , HIF3- α) y a una subunidad beta (HIF 1 β).⁽⁴¹⁾

Existen 2 zonas de señalización nuclear (NLS) que se encuentran en el extremo C-terminal y en el N-terminal. La acumulación nuclear del HIF1- α sólo depende del extremo C-terminal.

Además, tal y como dicen Fraga y cols.,⁽⁴¹⁾ HIF1- α contiene 2 dominios de transactivación (TAD) en el extremo C-terminal que están separados por una secuencia de aminoácidos (575-786) que inhiben la transactivación. El extremo N-terminal de la molécula contiene un dominio necesario para la dimerización y ligación al ADN (β HHLH-PAS). Las interacciones entre los dominios β HHLH de ambas subunidades regulan su dimerización. El dominio C-terminal tiene como función señalar la translocación de HIF1- α hacia el núcleo y la estabilización proteica (Véase figura 4).

El dominio de la degradación oxígeno-dependiente (ODD) del HIF1- α y los residuos de prolina en las posiciones 402 y 564, poseen un gran impacto en la estabilidad de la proteína en condiciones de oxígeno normales pues permiten, cuando están hidroxiladas, el reconocimiento por la proteína VHL y la posterior activación de la vía de degradación de la ubiquitina.⁽⁴¹⁾

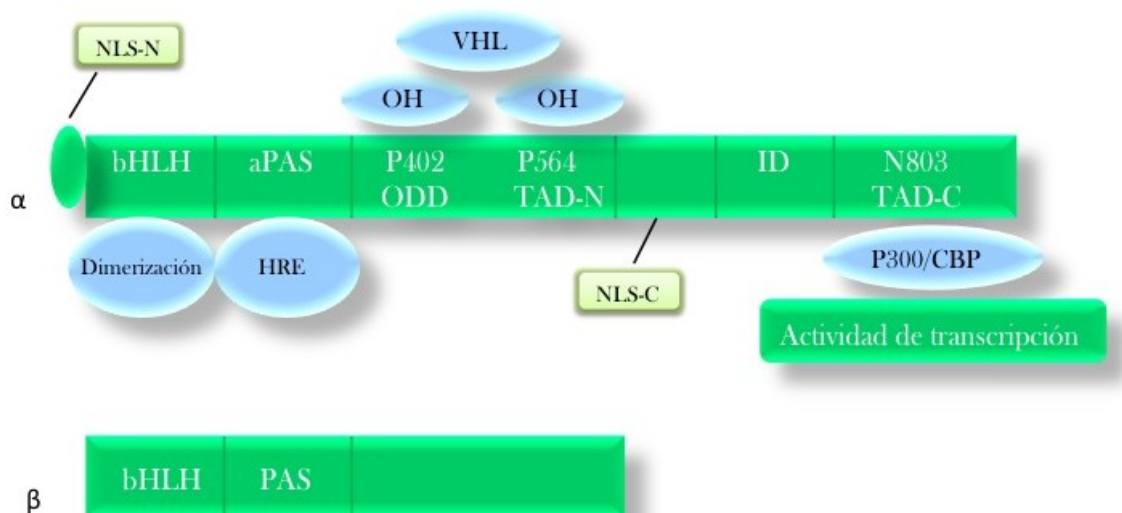


Figura 4. Estructura molecular de HIF-1 α . (Adaptado de Fraga y cols.).⁽⁴¹⁾

1 INTRODUCCIÓN

1.2.3.C.3.b.- MECANISMOS MOLECULARES

La proteína VHL reconoce y se une a HIF-1 α cuando esta subunidad se encuentra hidroxilada en prolinas y por otro lado se une a la proteína Elongina-C, la cual recluta a Elongina-B, cullina-2 y RBX-1.

Este complejo proteico compone una E3-ubiquitin-ligasa, que será responsable del marcaje por ubiquitinas de HIF-1 α . Una vez marcada la subunidad α será degradada por el proteosoma 23S.⁽⁴²⁾

En situaciones de hipoxia, con niveles de O₂ molecular bajos o nulos, HIF-1 α no se encuentra hidroxilada y VHL es incapaz de unirse a él, lo que implica un aumento de los niveles del HIF-1 α que se acumula en el interior de la célula formando un heterodímero con la subunidad beta (HIF-1 β). Este heterodímero emigra hacia el núcleo, donde se unirá a las secuencias específicas del ADN permitiendo la transactivación de sus genes diana.⁽⁴³⁾

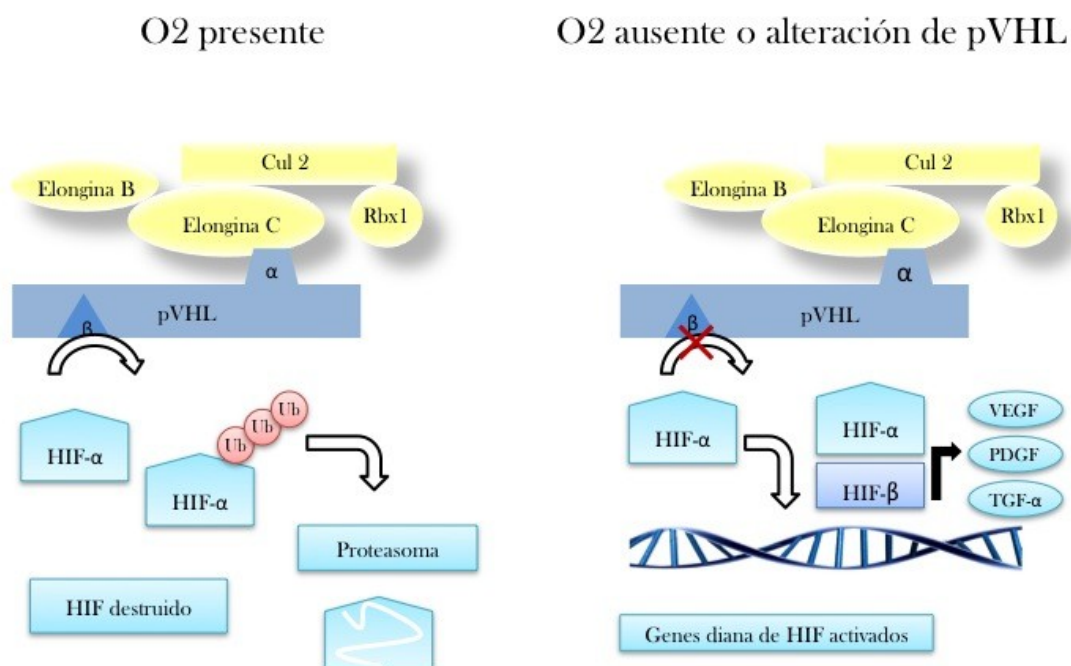


Figura 5. Esquema del mecanismo molecular de la ruta de VHL. (Adaptado de Trigo y cols.)⁽⁴²⁾

Como resumen (véase figura 5), en presencia de una actividad normal de VHL y con condiciones ambientales normales de oxígeno, HIF1- α se degrada y no ejerce su función. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, VHL no ejerce su función ubiquitín ligasa, HIF1- α no es degradado y se activa la transcripción de sus genes diana (VEGF, PDGF-R, TGF, EPO, etc.).

Entre los principales genes diana de HIF1- α podemos encontrar genes relacionados con angiogénesis como VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular), PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas), PLGF (Factor de crecimiento placentario); además de genes relacionados con proliferación y supervivencia celular como TGF- α (Factor α de crecimiento transformante), IGF (Factor de crecimiento ligado a insulina) y EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico) y también relacionados con la matriz extracelular como MMP-1 (Metaloproteínasa de matriz-1) y Lisiloxidasas; y con el control del pH, CA-IX y CA-XII (Anhidrasas carbónicas IX y XII).⁽⁴⁴⁾

1.2.3.C.3.b.- FUNCIÓN

La hipoxia es la reducción de la tensión de oxígeno que, en términos clínicos, se define por la disminución de la disponibilidad de oxígeno hasta niveles críticos y que se da cuando los valores de tensión son inferiores al 7%. HIF-1 α está involucrado en la respuesta a la hipoxia y también en la homeostasis del oxígeno en respuesta a la isquemia miocárdica, cerebral, retiniana, hipertensión pulmonar, preeclampsia, retraso en el crecimiento intrauterino y cáncer. Tiene un papel central tanto en los mecanismos fisiológicos homeostáticos como en los etiopatológicos.⁽⁴¹⁾

Como se ha comentado, HIF-1 α está relacionado con la transactivación de una gran variedad de genes. No obstante, resulta de gran interés el grupo de genes que generan proteínas transmembrana encargadas de la regulación de pH intra y extracelular: las anhidrasas carbónicas (CA). Su expresión se induce en condiciones de

1 INTRODUCCIÓN

hipoxia, probablemente regulado por HIF1- α . Además, diversos estudios⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ han mostrado la implicación de CA-IX en el pronóstico de CCR en términos de supervivencia y de respuesta a ciertas terapias inmunomoduladoras, fundamentalmente en los tumores que presentan metástasis a distancia, aunque también existe controversia en este punto.

1.2.3.D.- PROTEÍNAS DIANA DE VHL

1.2.3.D.1.- ANHIDRASA CARBÓNICA IX (CA-IX)

La familia de las CA está compuesta de una serie de enzimas que catalizan la conversión reversible de dióxido de carbono y agua a ácido carbónico.

La proteína CA-IX es un miembro de la familia de las anhidrasas carbónicas las cuales juegan un papel en la regulación de la proliferación en respuesta a hipoxia. CA-IX es una glicoproteína transmembrana con un sitio activo extracelular que está implicado en la proliferación y oncogénesis.⁽⁴⁸⁾

CA-IX juega un papel en la adaptación de los tumores a las condiciones de hipoxia y puede regular el pH de los compartimentos intra y extracelular. La expresión de CA-IX en los tejidos normales está limitada al tracto gastrointestinal, vesícula biliar y ductos pancreáticos. Se ha visto sobreexpresión de CA-IX en tumores de riñón, cervix, pulmón, estómago, cerebro, vejiga y piel. CA-IX no se expresa en tejido normal de riñón fetal o adulto, esto sugiere que no participa en la organogénesis pero que sí parece tener implicación en el crecimiento de ciertos tumores.

La pérdida de función de VHL implica una acumulación de HIF-1 α , lo que genera una sobreexpresión de CA-IX. En líneas celulares se ha visto que restaurando la función de VHL se reprime la expresión de CA-IX a niveles normales. El subtipo de células claras está ligado a la pérdida de la función de VHL por lo que esta proteína podría jugar un papel importante como biomarcador.⁽⁴⁹⁾

1.2.3.D.2.- VEGF

Como se ha comentado previamente, una de las características de los tumores renales es que presentan una gran vascularización, por lo que resulta interesante el estudio de genes/proteínas encargadas de la neoangiogénesis. VEGF es un buen ejemplo teniendo en cuenta que es diana de HIF1- α .⁽⁴¹⁾

La angiogénesis consiste en el desarrollo de nuevos vasos a partir de la red vascular preexistente⁽⁵⁰⁾ y tiene un papel preponderante en los diversos mecanismos fisiopatológicos benignos (cicatrización, heridas, isquemia, retinopatía diabética...) y malignos (crecimiento del tumor y metástasis); VEGF desempeña un papel fundamental en la angiogénesis y está regulado por HIF-1 α .

Este proceso de neoangiogénesis necesita de la migración y proliferación de células endoteliales (CEs) que se organizan formando grupos celulares con estructura tubular los cuales se unirán eventualmente para al final madurar en vasos sanguíneos estables. El factor VEGF y sus receptores constituyen el principal sistema regulador de las CEs vasculares y con ello de la angiogénesis.^(50,51)

VEGF es una molécula con actividad mitogénica altamente específica para las CEs. Es miembro de la superfamilia de genes VEGF-PDGF que incluye a VEGF-A, B, C, D y E, así como al factor de crecimiento de placenta (PLGF). Fue identificado en los años 80 como un factor de permeabilidad vascular (VPF) y como un factor de crecimiento específico de CEs vasculares codificado por el gen VEGF, por lo que ha sido referido como VEGF, VEGF/VPF o VPF.⁽⁵²⁾

VEGF activo está compuesto por dos subunidades idénticas. La modulación de su actividad está dada por la unión a heparina y a carbohidratos en la superficie celular con los dominios de unión del VEGF, los cuales son de distintos tamaños dependiendo de la isoforma de esta proteína (Figura 6).⁽⁵³⁾

1 INTRODUCCIÓN

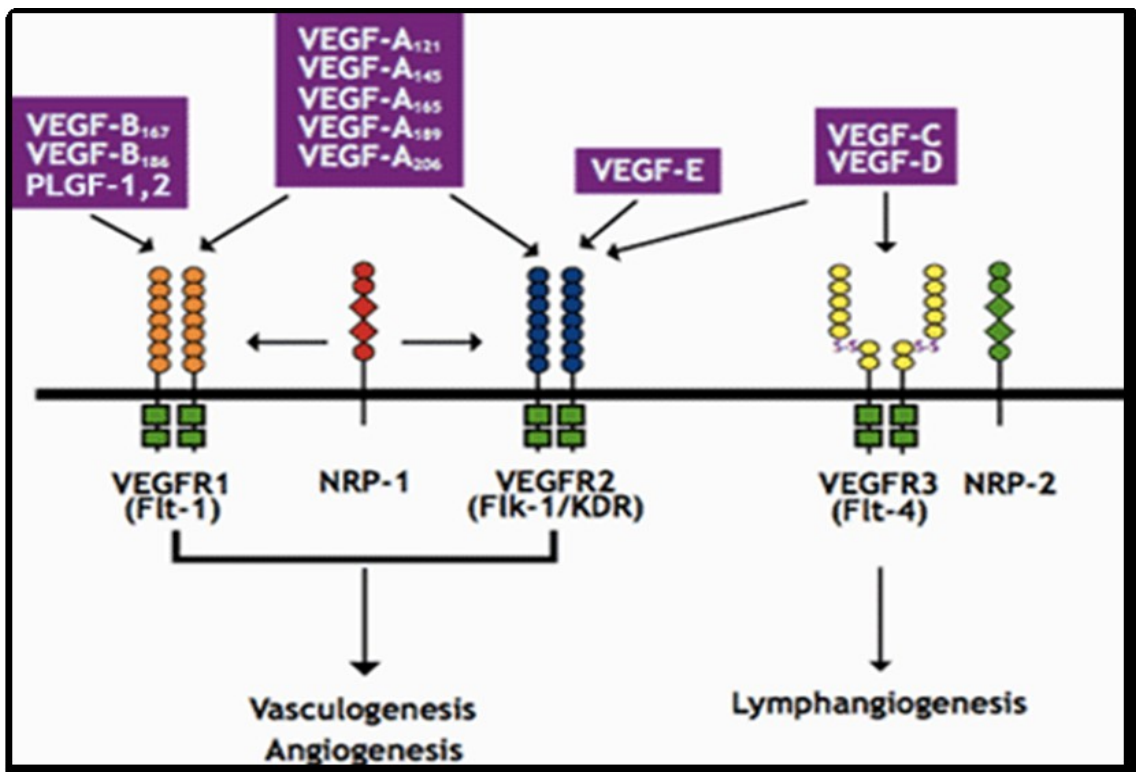


Figura 6. Esquema de las distintas isoformas de VEGF y sus receptores.⁽⁵⁴⁾

VEGF responde a hipoxia/isquemia principalmente mediante HIF1- α , aunque también en respuesta a distintos factores de crecimiento, a oncogenes activados (por ejemplo RAS) así como a distintas citosinas, gen *p53* mutado, estrógeno y óxido nítrico (NO). Mediante estos estímulos se aumenta la expresión del VEGF^(52,55) haciendo que proliferen CE de arterias, venas y vasos linfáticos⁽⁵⁶⁾ así como algunos tipos celulares no endoteliales.⁽⁵⁷⁾ Además, VEGF promueve la migración celular e inhibe la apoptosis,⁽⁵⁸⁾ incrementa la conductividad hidráulica de microvasos aislados y vasodilatación como resultado del NO derivado de CE,⁽⁵⁶⁾ promueve la angiogénesis y la permeabilización de los vasos sanguíneos y participa en la vasculogénesis⁽⁵⁵⁾ y en la linfangiogénesis.⁽⁵⁹⁾ Cuando su regulación es normal, VEGF contribuye al remodelamiento vascular durante el ciclo ovárico y la implantación embrionaria y a la cicatrización, mientras que cuando dicha regulación es inadecuada, este factor

contribuye al desarrollo de tumores sólidos al promover la angiogénesis que, por otra parte, suele ser anárquica y favorece la presencia de zonas de necrosis típicas de los tumores con crecimiento rápido. Por otro lado, se ha visto implicación de VEGF en otras patologías como psoriasis, artritis reumatoide, etc.⁽⁵⁵⁾

1.2.4.- SEÑALIZACIÓN CELULAR

Las vías de transducción de señales están relacionadas con proliferación celular positiva o negativamente. Es lógico pensar que en situaciones en que la proteína VHL esté alterada estas rutas puedan estar modificadas. Por ello, resulta interesante ahondar en el estudio de la señalización celular del cáncer. Una de las rutas que está relacionada con hipoxia, es la de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), en concreto la de ERK (Extracellular-signal Regulated Kinases).⁽⁶⁰⁾

1.2.4.A.- RUTA DE LAS MAPK

Las MAPK conforman una familia de Ser/Thr quinasas que se activan por factores de crecimiento y estrés. Juegan un papel clave en la transducción intracelular de señales respondiendo a diferentes estímulos extracelulares. Estas proteínas regulan procesos como metabolismo, apoptosis, mitosis, cambios en los patrones de expresión génica, proliferación celular, inducción de apoptosis, etc.^(61,62)

En las células de mamíferos hay cuatro familias de MAPK: ERK 1/2, ERK5, JNK (c-Jun NH2-terminal Kinase) y p38 MAPK. Cada subfamilia de MAPKs está compuesta por un módulo de señalización de tres quinasas evolutivamente conservadas que se activan de forma secuencial: primero, la MAPK quinasa quinasa (MAPKKK o MEKK) activa a la MAPK quinasa (MAPKK o MEK), y ésta a su vez activa a la MAPK por fosforilación.⁽⁶³⁾ En la figura 7 se muestra un esquema de este proceso en el que además se especifican las diferentes rutas de señalización de las MAPK que podemos encontrar en mamíferos.

1 INTRODUCCIÓN

Las MAPKKK generalmente se activan por fosforilación o por interacción directa con proteínas de unión a GTP (como la familia RAS/RHO) en respuesta a estímulos extracelulares.⁽⁶³⁾ Esto provoca la fosforilación en residuos de Ser y/o Thr de las MAPKK y su activación, que a su vez estimula la fosforilación y activación de las MAPK mediante la fosforilación dual en dos residuos (motivo Thr-X-Tyr) localizados en el motivo de activación del subdominio quinasa VIII. Finalmente, una vez activadas fosforilan a sus sustratos en residuos de Ser o Thr adyacentes a Pro.⁽⁶⁴⁾

Resumen de las cascadas de MAPK en mamíferos

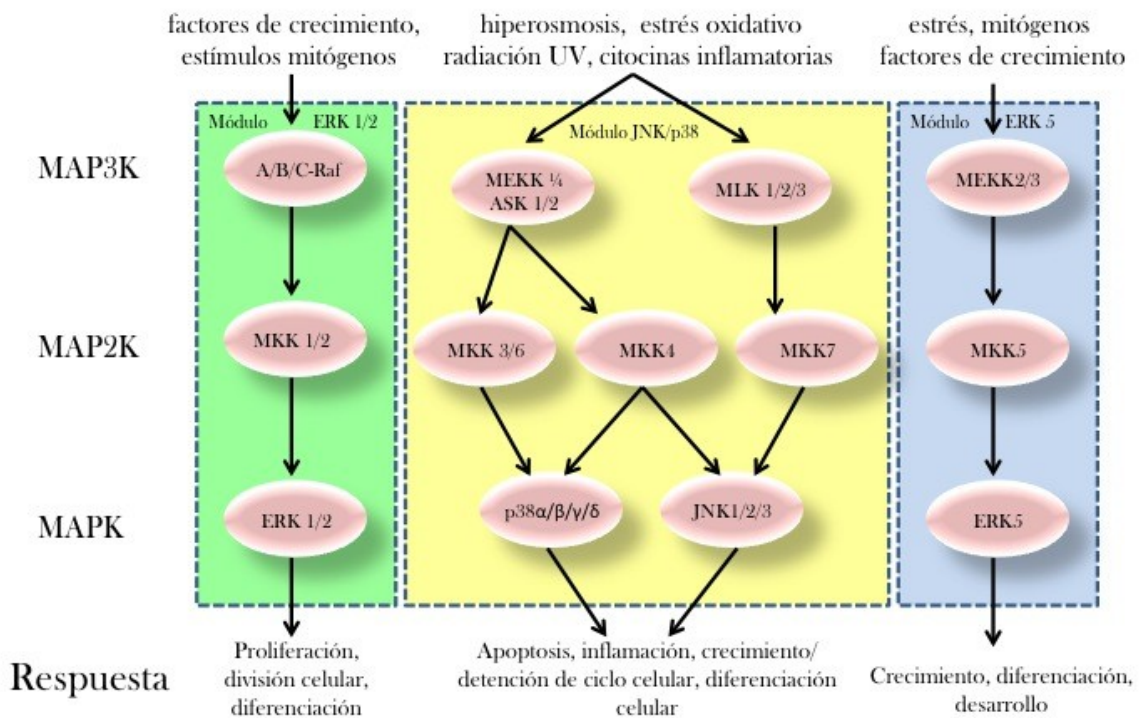


Figura 7. Cascada de señalización de las MAPKs. Se representan las diferentes rutas de señalización indicando los estímulos principales de cada ruta y las respuestas que desencadenan. Las flechas representan la estimulación directa de unas proteínas a otras.⁽⁶⁵⁾

1.2.4.B.- ERK (Extracelular regulated Kinase)

Las ERK son proteínas reguladas por estímulos extracelulares (factores crecimiento, estímulos mitogénicos, citoquinas) que generalmente están implicadas en proliferación y procesos antiapoptóticos. Basándose en el dominio de fosforilación, la secuencia, el perfil de señalización y la función, se pueden distinguir cuatro cascadas diferentes, las de ERK1/2, ERK5/BMK1, ERK3/4 y ERK7/8, siendo de gran interés las dos primeras.⁽⁶⁶⁾ A continuación, se describe con mayor profundidad las subfamilias ERK1/2 y ERK5 puesto que en estas dos se centra parte de este estudio.

1.2.4.B.1.- ERK1/2

Las proteínas ERK1 y ERK2 tienen un peso molecular de 44 y 42 kDa respectivamente y presentan una homología del 85%. Poseen dos sitios de fosforilación (Thr y Tyr) separados por glutamato (Glu). Su abundancia relativa varía de unos tejidos a otros, en muchos tejidos los niveles de una son más abundantes que los de la otra y en otros son similares. La localización de ERK1/2 puede darse tanto en el núcleo como en el citoplasma. Son estimuladas por un gran número de ligandos (suero, factores de crecimiento, citoquinas, estrés, receptores asociados a proteínas G, etc.).⁽⁶⁷⁾ ERK1/2 puede regular diferentes funciones como, crecimiento, proliferación, muerte y diferenciación celular.⁽⁶⁸⁾ De hecho, la ruta de ERK1/2 tiene un papel importante en cáncer por su papel fundamental para la proliferación celular.⁽⁶⁹⁾

Los receptores tirosina quinasa, en respuesta a estímulos mitogénicos, son capaces de formar dímeros y fosforilarse entre sí desencadenando la unión de otras proteínas. La primera proteína que interacciona con los receptores es GRB2. Al unirse al receptor permite que SOS (proteína intercambiadora de GTP/GDP) que se encuentra de forma constitutiva unida a GRB2, catalice la activación de Ras pasando de su forma inactiva RAS-GDP a su forma activa RAS-GTP e inducir la activación de la ruta de ERK1/2 gracias a su interacción con RAF (Figura 8).^(70,71)

1 INTRODUCCIÓN

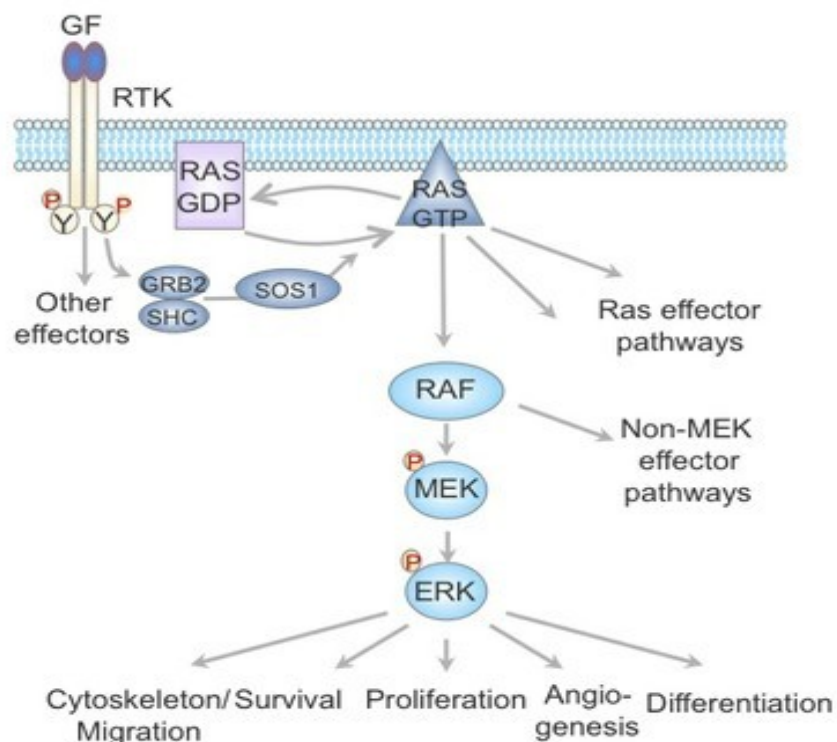


Figura 8. Ruta de ERK.⁽⁷²⁾

Las proteínas RAF son MAPKKK y constan de tres miembros: RAF-1, A-RAF, y B-RAF. Tienen un peso de 74, 68 y 94 kDa respectivamente. RAF fosforila a su MAPKK, MEK1/2, en dos residuos de serina (Ser-218 y Ser-222) provocando un incremento de su actividad del orden de 7000 veces.⁽⁶¹⁾ MEK1/2 poseen en el extremo N-terminal un dominio de regulación negativa y en el extremo C-terminal una zona de unión a MAPK necesaria para su interacción con ERK1/2. De hecho, deleciones en la región reguladora provocan una activación constitutiva de la ruta. Por último, MEK1/2 fosforila a ERK1/2 en la Thr-202 y en la Tyr-204. La activación de ERK1/2 puede provocar la dimerización de la proteína. Los dímeros suelen ser homodímeros ya que los heterodímeros formados entre ERK1 y ERK2 son muy inestables.⁽⁷³⁾ Las formas diméricas están implicadas en la activación de proteínas en el citoplasma, mientras que las formas monoméricas intervienen sobre todo en la activación de proteínas en el núcleo.

1.2.4.B.2. - ERK5

El gen *ERK5*, también llamado *BMK1* (Big MAPK 1), tiene 2445 pares de bases y codifica a una proteína de 816 aminoácidos cuya masa molecular teórica es de 98Kd.⁽⁷⁴⁾ ERK5 se expresa en una amplia variedad de tejidos de vertebrados como son corazón, cerebro, placenta, músculo esquelético, pulmón y riñón.^(75,76)

La proteína ERK5 es capaz de translocar del citoplasma al núcleo. Un posible mecanismo que explique su localización subcelular está relacionado con los dominios que la componen. La proteína codificada está compuesta por dos dominios: el dominio N-terminal importante para la localización citoplasmática, la asociación a MEK5 y en la oligomerización;⁽⁷⁴⁾ y el dominio C-terminal que es requerido para la translocación nuclear.⁽⁷⁷⁾ Este dominio posee una secuencia de localización nuclear (NLS) y dos regiones ricas en Prolina (PR1 y PR2) importantes en la interacción con dominios SH3 de otras proteínas y en el control la actividad del dominio catalítico. Se ha postulado que, en condiciones basales, la interacción entre el dominio N y C-terminal expondría el dominio de exportación nuclear o favorecería el anclaje a proteínas del citoesqueleto permitiendo la acumulación de ERK5 en el citoplasma. Ante un estímulo, la interacción entre ambos dominios se rompería y permitiría la entrada de ERK5 al núcleo.⁽⁷⁷⁾ Con respecto a la ruta señalización de la proteína ERK5, esta se activa en presencia de mitógenos, factores de crecimiento, estrés o de citoquinas; entonces las MAPKKK: MEKK2 y MEKK3 activan a MEK5 el cual fosforila a ERK5 (Ver figura 7).

Se ha observado alteración de esta ruta en cáncer y se ha descrito una posible regulación por medio de la proteína VHL,⁽⁶⁰⁾ actuando como ubiquitina-ligasa de ERK5. También se ha postulado una relación entre el nivel de la proteína ERK5 en muestras humanas de carcinoma renal de célula clara y el grado de desarrollo de la enfermedad, correspondiendo altos niveles de ERK5 con pacientes que poseen estadios más avanzados de la enfermedad y que presentan un peor pronóstico.⁽⁶⁰⁾ La desregulación en la ruta de ERK5 también se ha relacionado con otro tipo de tumores como mieloma múltiple, carcinomas de mama y cáncer de próstata.⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾

1 INTRODUCCIÓN

Finalmente, en cuanto a las funciones de la proteína ERK5/BMK1, está implicada en expresión de genes en respuesta a suero, interviene en la regulación y supervivencia de los linfocitos T y supervivencia de las neuronas del sistema central al estrés oxidativo. También se ha asociado a la respuesta inflamatoria. Además, se ha relacionado con mieloma y cáncer de mama y desarrollo vascular.⁽⁸¹⁻⁸³⁾

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2

2 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.-JUSTIFICACIÓN

Como se ha comentado, el CCR es la neoplasia maligna más frecuente en el riñón adulto. Su incidencia actualmente está en aumento por el mayor uso de técnicas de diagnóstico y, dentro de los CCR, la variedad de células claras es la más frecuente.⁽⁸⁴⁾

Estos tumores pueden aparecer en el contexto de enfermedades hereditarias o de manera esporádica. La forma esporádica constituye el 96% de los casos.⁽⁸⁴⁾ Tanto los CCR hereditarios como los esporádicos tienen alteraciones genéticas conocidas, sobre todo a nivel del gen *VHL*, existiendo una destacable relación entre las alteraciones en este gen, fundamentalmente con el CCRCC.⁽⁸⁵⁾ Este aspecto ya ha sido refrendado en estudios previos de nuestro grupo.⁽²⁵⁾

Durante los últimos años y a la vista de que los criterios diagnósticos basados únicamente en la arquitectura histológica son insuficientes, se está intentando realizar una caracterización molecular del CCR para determinar nuevos marcadores tumorales útiles tanto en el diagnóstico histológico, como en la predicción pronóstica y de respuesta a los fármacos que están desarrollándose actualmente. En este sentido, y basándose en la ya mencionada implicación del gen supresor *VHL* en los casos de CCR esporádico, resulta interesante evaluar la implicación de la ruta de señalización mediado por VHL en el CCR.

2 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como es sabido, el gen *VHL* codifica una proteína (VHL) que se une a HIF-1 α en condiciones de normoxia provocando su degradación. Es aquí donde radica parte de la función supresora del gen *VHL*. La ausencia de una función normal de VHL genera una situación parecida a la hipoxia por lo que HIF-1 α no se degrada, aumentando sus niveles. Además HIF-1 α es un factor de transcripción que induce la activación de genes cuyo producto protéico aumenta la disponibilidad de oxígeno mediante activación de factores angiogénicos (fundamentalmente VEGF, PDGF y eritropoyetina) o regula la adaptación metabólica cuando el oxígeno ambiental es limitado. Por el contrario, en presencia de una actividad normal de VHL y en condiciones de normoxia, HIF-1 α se degrada no ejerciendo su función. La sobreproducción de factores angiogénicos debida al aumento de HIF-1 α puede explicar la naturaleza hipervasculatura del CCR y el posible estímulo al desarrollo y crecimiento tumoral.^(34,45,86–88) Según lo descrito en otros trabajos, la sobreexpresión de HIF-1 α puede tener valor pronóstico en los pacientes afectados de CCRCC.^(87,88)

HIF-1 α también regula otros genes entre los que tiene especial interés las anhidrasas carbónicas, en concreto el gen productor de la proteína CA-IX. Ésta se expresa fundamentalmente en tejidos tumorales, entre ellos el CCR y es inducida también por condiciones de hipoxia.^(89,90) La sobreexpresión de CA-IX es prácticamente exclusiva de los CCRCC⁽⁹¹⁾ siendo su determinación útil en el diagnóstico de este subtipo celular. Cuando aparece sobreexpresada en otros subtipos, surge la posibilidad de que se trate de falsos positivos o CCR con componente mixto. La expresión de CA-IX puede ser determinada por inmunohistoquímica (IHQ) o métodos directos como western blot (WB), pero hasta el momento no se ha demostrado la superioridad de una u otra técnica de cara a su uso en clínica convencional.

Finalmente se ha sugerido el hecho de que la proteína VHL controle tanto a HIF1 α como a ERK5.⁽⁶⁰⁾ Ambas proteínas están controladas por la misma E3-Ubiquitina-ligasa. Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) constituyen una familia de serin/treonin quinasas activadas por factores de crecimiento y estrés y juegan un

papel clave en la transducción intracelular de señales, permitiendo a la célula integrar diferentes estímulos extracelulares. Así, las MAPK regulan procesos como mitosis, cambios en los patrones de expresión génica, movimiento, metabolismo, muerte celular programada permitiendo a las células sobrevivir, proliferar, inducir apoptosis, interactuar con múltiples tipos celulares, etc. Todos estos procesos están implicados en el correcto desarrollo del organismo así como en su homeostasis con implicaciones en cancer y su terapia.⁽⁶²⁾

Todo lo expresado anteriormente hace que sean necesarios estudios que impliquen una evaluación global de toda esta ruta de señalización VHL→ HIF-1 α →CA-IX, así como el análisis de otras proteínas y vías de señalización que, como las MAPK, podrían tener relación con esta ruta pudiéndose evaluar su posible papel en el pronóstico y diagnóstico del CCR.

Por todo ello, en nuestro estudio nos planteamos las siguientes hipótesis y objetivos:

2.2.- HIPÓTESIS

- Los carcinomas de células renales esporádicos presentan mutaciones y alteraciones epigenéticas en el gen *VHL*. Dichas modificaciones alteran la expresión de la proteína VHL, perdiendo su función y provocando cambios en la expresión de otras proteínas diana de VHL que componen su ruta molecular como son HIF-1 α , CA-IX y VEGF. Esta pérdida de función de VHL puede afectar también a la expresión y función de MAPK implicadas en proliferación (ERK5 y ERK1/2).

- La expresión de proteínas como CA-IX y VEGF generada por la no degradación de HIF-1 α , así como la de ERK5 y ERK1/2, influyen en los parámetros clinicopatológicos de los pacientes. Estas proteínas podrían constituirse como marcador pronóstico y diagnóstico del carcinoma de células renales esporádico.

2 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.3.- OBJETIVOS:

Objetivo principal:

Determinar la existencia de mutaciones y alteraciones epigenéticas (metilación del promotor) en el gen *VHL* en tejido renal tumoral de pacientes con carcinoma renal esporádico de célula clara y caracterizar, por western blot y/o inmunohistoquímica, el estado de expresión de las distintas proteínas que forman parte de la vía metabólica de señalización desencadenada por VHL, como CA-IX, HIF-1 α y VEGF y de las MAPK implicadas en proliferación como ERK5 y ERK1/2.

Objetivos secundarios:

- Valorar la utilidad de la determinación de la expresión de la proteína CA-IX como biomarcador en el carcinoma de células renales y cuál de los métodos para la detección de su expresión es más útil.
- Analizar si la expresión de VHL se asocia con la expresión de las otras proteínas implicadas en su vía de señalización.
- Determinar el valor pronóstico y diagnóstico de la existencia de mutaciones y metilación en el gen *VHL*, así como de la expresión de VHL y de las proteínas de las vías de señalización analizadas.

MATERIAL Y MÉTODO

3

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1.- DISEÑO Y SUJETOS DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio descriptivo observacional, analítico y transversal sobre 76 pacientes diagnosticados de CCR esporádico tratados quirúrgicamente según el protocolo aceptado por la comunidad urológica internacional, contando con la aprobación del Comité de Ética del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. El periodo de recogida de los datos va desde el año 2006 hasta el año 2011. Se han revisado los datos clínico-evolutivos y las preparaciones histológicas de todos los sujetos, los cuales fueron diagnosticados por el Servicio de Anatomía Patológica, tratados y controlados por personal facultativo del Servicio de Urología del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.

3.2.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Previo consentimiento informado, una vez realizada la cirugía, se extrajo de la pieza operatoria y en fresco, muestras de tejido tumoral y tejido renal sano adyacente al tumor. Una vez recogidas, las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron en el estudio pacientes sometidos a cirugía exerética de neoplasia renal, ya fuera radical o conservadora de parénquima renal, y que posteriormente el diagnóstico anatomopatológico confirmara la presencia de un carcinoma de células renales. Se desestimaron aquellos pacientes que tras la cirugía se diagnosticaron de tumores de otra estirpe, bien benignos o malignos, y los que presentaron historia de enfermedad familiar asociada a la aparición de tumores renales.

3.4.- VARIABLES DEL ESTUDIO

3.4.1.- VARIABLES DEPENDIENTES

3.4.1.A.- MUTACIÓN DEL GEN *VHL*

Tras la amplificación mediante PCR para la posterior secuenciación automática de los tres exones que componen el gen *VHL*, se pudieron obtener los siguientes datos en relación a las mutaciones encontradas:

-Tipo de mutación:

Puntual: Cambio de una base por otra.

Delección: Pérdida de uno o varios nucleótidos.

Inserción: Adición de uno o varios nucleótidos.

Las delecciones e inserciones cambian la pauta de lectura originando cambios de aminoácidos en la transcripción ocasionando, en la mayoría de los casos, una proteína truncada.

-Localización de la mutación.

-Cambio de codón.

-Cambio de aminoácido.

3.4.1.B.- METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *VHL*

Tras obtener los porcentajes de metilación de cada sitio CpG estudiado, se clasificaron las muestras como, siguiendo un esquema similar al realizado por Moore y cols.:⁽⁹²⁾

- Hipermetilado.
- No hipermetilado.

Para el estudio estadístico también se valoró conjuntamente la existencia de alteración en el gen *VHL* ya fuese por existencia de mutación, por hipermetilación del promotor o por la existencia de ambas alteraciones.

3.4.1.C.- EXPRESIÓN DE *VHL* POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Según el porcentaje de células teñidas, conforme el estudio de Shiao y cols.⁽⁹³⁾ se clasificó el estudio inmunohistoquímico de *VHL* en:

- Negativo: Ausencia absoluta de tinción celular.
- Positivo:
 - Expresión baja: <10% células marcadas.
 - Expresión moderada: 10-50% células marcadas.
 - Expresión alta: >50% células marcadas.

Además según el lugar de expresión se clasificaron como:

- Negativo.
- Membrana.
- Citoplasma.
- Núcleo.
- Membrana y citoplasma.

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.4.1.D.- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CA-IX POR WESTERN BLOT

Mediante la técnica de western blot se clasificaron como:

- Positivo (Expresa). Si la muestra en el tejido tumoral expresaba la proteína.
- Negativo (No expresa). Si no existía expresión de la proteína en la muestra tumoral.

3.4.1.E.- EXPRESIÓN DE CA-IX POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la expresión de CA-IX por inmunohistoquímica, siguiendo el método de Leibovich y cols.,⁽⁹⁴⁾ se clasificaron las muestras como:

- Positivo. Cuando se vio marcaje, células teñidas.
- Negativo. Ausencia absoluta de tinción celular.

3.4.1.F.- EXPRESIÓN DE HIF-1 α POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Según lo publicado por Klatte y cols.,⁽⁹⁵⁾ se clasificó la expresión de HIF-1 α de dos formas según el porcentaje de células marcadas:

- Negativo. Ausencia absoluta de tinción celular.
- Positivo:
 - Expresión baja: <10% células marcadas.
 - Expresión moderada: 10-50% células marcadas.
 - Expresión alta: >50% células marcadas.

Y según la intensidad de la expresión:

- Negativo
- Intensidad leve (1+)
- Intensidad moderada (2+)
- Intenso (3+)

3.4.1.G.- EXPRESIÓN DE VEGF POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Al igual que con la proteína HIF-1 α se establecieron dos clasificaciones conforme a lo publicado por Baderca y cols.⁽⁹⁶⁾ Por el porcentaje de células marcadas:

- Negativo.
- Positivo:
 - Expresión baja: <10% células marcadas.
 - Expresión moderada: 10-50% de las células marcadas.
 - Expresión alta: >50% de las células marcadas.

Y por la intensidad de la expresión:

- Negativo
- Intensidad leve (1+)
- Intensidad moderada (2+)
- Intenso (3+)

3.4.1.H.- EXPRESIÓN DE ERK5 POR WESTERN BLOT

Mediante la técnica de western blot para la proteína ERK5, los clasificamos como:

- *Sobreexpresa*. Si la expresión de ERK5 en el tumor era superior a la de la muestra de parénquima renal sano.
- *No sobreexpresa*. Si la expresión de la muestra en el parénquima renal sano era igual o inferior a la encontrada en la muestra tumoral.

3.4.1.I.- EXPRESIÓN DE ERK1/2 POR WESTERN BLOT

Mediante la técnica de western blot los clasificamos como:

- *Sobreexpresa*. Si la expresión de ERK1/2 en el tumor era superior a la de la muestra de parénquima renal sano.

3 MATERIAL Y MÉTODO

- *No sobreexpresa.* Si la expresión de la muestra en el parénquima renal sano era igual o inferior a la encontrada en la muestra tumoral.

3.4.2.- VARIABLES INDEPENDIENTES

Para clasificar las variables independientes se estableció un protocolo de recogida de datos, que incluyó distintos grupos de variables.

3.4.2.A.- VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS

- Edad
- Sexo

3.4.2.B.- VARIABLES RELACIONADAS CON EL TUMOR ACTUAL

- Motivo de consulta. Especificando la causa (síntomas) por la que el paciente acude a consulta por primera vez:
 - Masa palpable.
 - Hematuria.
 - Dolor.
 - Hallazgo incidental.
 - Otros síntomas o signos.
- Lateralidad. Si el tumor aparece en riñón derecho, izquierdo o se produce presentación bilateral.
- Localización del tumor. Según aparezca en:
 - Polo superior renal.
 - Polo inferior renal.
 - Situación mesorrenal.
- Tamaño tumoral. Por medición del patólogo sobre la pieza quirúrgica:

- Menor de 4 cm.
- Entre 4 y 7 cm.
- Mayor de 7 cm.
- Estudio anatomopatológico del tumor o tipo histológico del tumor:
 - Carcinoma de células claras.
 - Carcinoma cromofílico o papilar.
 - Carcinoma cromófono.
 - Oncocitoma.
 - Carcinoma de los ductos de Bellini.
 - Carcinoma con diferenciación sarcomatoide.
 - Variante inclasificada (subtipos con componente mixto y no clasificados en ninguno de los grupos anteriores).
- Grado nuclear, según la clasificación de Fuhrman.⁽¹⁷⁾
- Estadio tumoral, según la clasificación TNM de la UICC.⁽¹⁹⁾

3.5.- METODOLOGÍA

3.5.1.- LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS CELULARES.

En el presente estudio se utilizaron líneas celulares como control para el estudio genético y epigenético del gen *VHL*. Dichas líneas fueron las siguientes:

Caki-2: Derivadas de carcinoma de célula clara de humano caucásico de 69 años. Poseen *VHL* endógeno. El ADN de esta línea se utilizó como control para el estudio mutacional y el análisis de metilación.

796-P: Derivadas de adenocarcinoma de célula clara renal de humano caucásico de 63 años. Esta línea posee el promotor de *VHL* hipermetilado con lo que no expresa

3 MATERIAL Y MÉTODO

la proteína. El ADN genómico de esta línea celular se utilizó como control para el estudio de metilación.

786-O: Fueron derivadas de un varón de 58 años de adenocarcinoma de célula clara en riñón humano de origen caucásico. Esta línea posee el gen de *VHL* mutado, por lo que fue utilizada como control en el estudio mutacional del gen *VHL*.

Las células se encontraban en crioviales en nitrógeno líquido, fueron descongeladas de manera rápida, sembradas en placas de 100 y 60 mm y mantenidas en un ambiente de 5% CO₂ a 37°C en medios de cultivo adecuados al tipo celular. En concreto, las tres líneas celulares se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), más un combinado de antibióticos (penicilina, estreptomycin y anfotericina B) y aminoácidos no esenciales. Todos los reactivos fueron de la compañía Sigma®.

3.5.2.- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Una vez recogidas las muestras de tumor renal y de parénquima renal sano del espécimen quirúrgico, se congelaron y almacenaron a -80°C hasta su utilización. La extracción del ADN a partir de las muestras almacenadas se realizó siguiendo las instrucciones del kit de extracción de ADN QIAmp®DNA de QIAGEN®, previa digestión enzimática de los tejidos con proteinasa K. Como resultado final se obtuvieron 50 µl de ADN a una concentración media de 100 ng/µl de cada una de las muestras procesadas. Para comprobar la calidad del ADN obtenido, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio (10 mg/ml) realizada en tampón TBE 1 X (tris borato 45mM; EDTA 1mM).

La cuantificación del ADN obtenido se realizó mediante espectrofotometría (Nanodrop). La pureza de la muestra de ADN obtenida (proporción de proteínas contaminantes) se calculó mediante la relación de densidad óptica 260/280,

considerándose una razón de en torno a 2 como óptima, mientras que una razón inferior a 1,5 como insuficientemente pura precisando de un nuevo proceso de extracción de ADN.

3.5.3.- PCR. AMPLIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Para llevar a cabo la búsqueda de mutaciones en el gen *VHL* fue necesario, en primer lugar, amplificar mediante PCR las regiones que comprendían cada uno de los 3 exones que componen dicho gen. Para ello se diseñaron cebadores, es decir oligonucleótidos que se situaban en zonas intrónicas, con el objeto de obtener en el producto de PCR las secuencias completas de cada uno de los exones. Las secuencias de los cebadores fueron tomadas según el protocolo publicado por Patard JJ y cols.⁽⁹⁷⁾ En la Tabla 4 se muestran los cebadores empleados. Las condiciones de las reacciones de amplificación utilizadas para cada exón fueron las siguientes: se amplificaron entre 50 y 150 ng del ADN procedente de la muestra tumoral con la Taq polimerasa de Biorad® siguiendo las siguientes condiciones de PCR: predesnaturalización a 95°C durante 10 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto; anillamiento durante 45 segundos (55°C para el exón 1 y 58°C para los exones 2 y 3) y extensión a 72°C durante 45 segundos. Se añadió 1.5 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTP. Además se utilizó DMSO al 5% para los exones 1A y 1B.

Los cebadores fueron sintetizados por Amersham Pharmacia Biotech®. Posteriormente se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (1% en TBE) que los fragmentos amplificados correspondían a su tamaño y que no existía degradación. La secuenciación fue realizada en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

3 MATERIAL Y MÉTODO

Exón amplificado y dirección	Secuencia del cebador
1A: Forward	5'-CGC-GAA-GAC-TAC-GGA-GGT-3'
1A: Reverse	5'-GGA-CTG-CGA-TTG-CAG-AAG-AT-3'
1B: Forward	5'-GAG-TAC-GGC-CCT-GAA-GAA-GA-3'
1B: Reverse	5'-GCT-TCA-GAC-CGT-GCT-ATC-GT-3'
2: Forward	5'-CAC-CGG-TGT-GGC-TCT-TTA-AC-3'
2: Reverse	5'-TGG-GCT-TAA-TTT-TTC-AAG-TGG-3'
3: Forward	5'-GCA-AAG-CCT-CTT-GTT-CGT-TC-3'
3: Reverse	5'-ACC-ATC-AAA-AGC-TGA-GAT-GAA-3'

Tabla 4.- Secuencias de los cebadores utilizados para la PCR de los fragmentos a amplificar.

3.5.4.- ESTUDIO DEL ESTATUS GENÉTICO DEL GEN *VHL*

Uno de los objetivos del presente estudio era analizar, mediante secuenciación de ADN, las características de las mutaciones detectadas y su localización dentro de las regiones codificantes del ADN, para después ver si dichas mutaciones afectaban a la correcta expresión/función de la proteína. Para ello se utilizó la técnica de secuenciación automática mediante electroforesis capilar.

La búsqueda de mutaciones se llevó a cabo en todas las muestras tumorales de todos los pacientes incluidos en el estudio. Para ello se amplificaron y secuenciaron los tres exones del gen *VHL* de todas las muestras tumorales en una dirección (5' ó 3').

Todas las secuencias se confirmaron mediante secuenciación en sentido opuesto del exón problema; así ninguna mutación fue considerada como tal si el patrón anómalo sólo aparecía en un sentido de secuenciación.

Las muestras mutadas fueron cotejadas con la muestra control (línea celular caki-2, cuya secuencia del gen *VHL* está libre de mutaciones) obtenida para tal fin, no hallándose ninguna mutación en los citados controles.

Dado que el diseño de los cebadores utilizados para la reacción de amplificación de los distintos fragmentos exónicos era a partir de nucleótidos de localización intrónica, se pudieron detectar mutaciones no exónicas.

La búsqueda de mutaciones se realizó por medio del programa Crhomas Pro[®].⁽⁹⁸⁾

3.5.5.- ESTUDIO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE VHL

El análisis de metilación fue realizado por la empresa Sequenom[®] en la Universidad de Valencia. Se enviaron muestras de ADN genómico de los tumores de CCRCC y de tipo mixto con componente de células claras, además se enviaron a analizar muestras de ADN genómico de dos líneas celulares para su uso como controles: Caki-2 (carente de metilación del gen *VHL*) y 769-P (línea que presenta *VHL* metilado). El ADN fue extraído siguiendo el mismo protocolo tomado para las muestras destinadas a secuenciación convencional (apartado 3.5.1.).

Se preparó para analizar 1 µg de ADN genómico por muestra, a partir de ahí la empresa Sequenom[®] realizaría el estudio de metilación por un protocolo basado en primer lugar en el tratamiento con bisulfito de sodio; en segundo lugar en la realización de unas PCRs para las cuales se analizarían tres amplicones de *VHL* (en la tabla 5 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados para ello); y finalmente en la cuantificación del estado de metilación por medio de un sistema de espectrometría de masas denominado MALDI-TOF.

3 MATERIAL Y MÉTODO

Nombre del cebador	Secuencia 5'-3'
VHL1 01 Fw	aggaagagagTTATGTTTTGTAAGAATTTAGTTAGTTGAT
VHL1 01 Rv	cagtaatacgactcactatagggagaaggctTCACTACAACCTTAACCTCCCTA
VHL1 03 Fw	aggaagagagGGTTTTATAAAGAATGTTTTGGG
VHL1 03 Rv	cagtaatacgactcactatagggagaaggctAAAACTAAAACCCCTTAAAACAAAA
VHL1 04 Fw	aggaagagagTGTGTTTTGTTTTAAGGGGTTTTAG
VHL1 04 Rv	cagtaatacgactcactatagggagaaggctAACCTCCCAAATCATCTTCTA

Tabla 5.- Secuencias de los cebadores de los amplicones VHL

Tras ello, se obtuvo información sobre el estado de metilación de 41 sitios CpG dentro de esos tres amplicones de las muestras tumorales y de las líneas celulares. Para el estudio estadístico se eliminaron los sitios CpGs en los que el estado de metilación era similar entre las líneas control metilada y no metilada, quedando finalmente 26 sitios CpG a estudiar. De forma similar al método seguido por Moore y cols.⁽⁹²⁾ se consideró como muestra metilada aquella que mostraba metilación en más del 26% de los sitios CpGs estudiados.

3.5.6.- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

Las muestras fueron disgregadas utilizando el politrón y procesadas en buffer de lisis a pH 8 (100nM HEPES, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,125 mM EGTA, 0,1% Tritón X-100) en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa (50mM NaPPI, 50 mM NaF, B-glicerol, DTT, Leupeptina, aprotinina, 50µM PMSF y 100mM Na₃VO₄). Los

extractos celulares se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4⁰C. Se eliminó el pellet y la cantidad de proteína del sobrenadante se cuantificó usando el método de BCA (BCA Protein Assay Kit®). Posteriormente a las muestras se les añadió el tampón de carga (Laemmli 5X: 15 ml H₂O, 2,5 ml Tris- HCl pH 6,8 1M, 10 ml glicerol, 8 ml de SDS al 10%, 2ml de β-mercaptoetanol, 5 μL de azul de bromofenol 0.5% en H₂O), y se hirvieron a 100⁰C durante 5 minutos. Finalmente se cargaron en geles de acrilamida.

3.5.7.-WESTERN BLOT

Se utilizaron geles de acrilamida de diferente porcentaje en función del peso molecular de la proteína que se quería analizar: Al 10% para la CA-IX, ERK1/2 y Tubulina; y al 6% para ERK5. Se realizó la electroforesis en condiciones desaturalizantes (SDS-PAGE).

Una vez las proteínas se separaron en el gel, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa aplicando un voltaje constante de 15 V durante 50 min para CA-IX, ERK1/2 y Tubulina; y 65 min para ERK5. Estas membranas fueron bloqueadas durante una hora en 5% de leche desnatada en polvo diluida en TBS con Tween 20 al 0,1% (T-TBS). Tras tres lavados de 10 minutos en tampón T-TBS, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios en agitación en las condiciones que se describen en la *tabla 6* para cada una de las proteínas que se querían estudiar (en la *tabla 6* además podemos encontrar las características de los anticuerpos utilizados). Todas las membranas fueron incubadas en agitación a 4⁰C durante 16 horas.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Isotipo	Tipo
CA IX Antibody (H-120)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000 en 0,5% BSA/TTBS	Conejo	Policlonal
ERK5	Cell Signaling	1:1000 en 5% BSA/TTBS	Conejo	Policlonal
ERK1,2 (C-14):	Santa Cruz Biotechnology	1:1000 en 5% BSA/TTBS	Conejo	Policlonal
Tubuline	Santa Cruz Biotechnology	1:3000 en 0,5% BSA/TTBS	Ratón	Monoclonal

Tabla 6.- Anticuerpos primarios utilizados para la técnica de western blot y condiciones de incubación.

3 MATERIAL Y MÉTODO

Después de tres lavados de 10 minutos con T-TBS en agitación, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology®) con actividad peroxidada conjugada durante una hora a temperatura ambiente, a una dilución 1:2000 en tampón T-TBS. La detección de la señal fue realizada mediante la utilización de quimioluminiscencia (ECL, Amersham®) en una cámara de revelado modelo Las-3000 mini de la compañía Fujifilm®.

3.5.8.- ANÁLISIS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Todos los casos fueron tratados en bloques de parafina. Se cortaron secciones de 4µm de tejidos embebidos en parafina y fijados con formalin, se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en series graduales de etanol. La peroxidada endógena fue bloqueada con 3% de H₂O₂ durante 5 min. Los cortes fueron tratados con un epitopo inducido caliente e incubado con los anticuerpos monoclonales en una dilución variable para cada anticuerpo (tabla 7), y detectados usando el kit EnVision system-HRP (Dako®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El estudio inmunohistoquímico fue realizado por un solo patólogo. Dependiendo de que las células tumorales fueran teñidas y del porcentaje de tinción de las mismas se definió como inmunohistoquímica positiva o negativa según se indicó en los apartados 3.4.1.C, 3.4.1.E, 3.4.1.F y 3.4.1.G.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Isotipo	Tipo
Anti-Carbonic Anhydrase IX antibody	Abcam	1:1500	Ratón	Monoclonal
VHL	BD Pharmingen	1:200	Ratón	Monoclonal
HIF1α	Novus	1:200	Ratón	Monoclonal
VEGF	Dako	1:400	Ratón	Monoclonal

Tabla 7.- Anticuerpos utilizados para la técnica de inmunohistoquímica.

3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.6.1.-ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Para describir la distribución de cada variable como índices estadísticos, se calcularon porcentajes en el caso de variables cualitativas y medidas de tendencia central y dispersión para sintetizar la distribución de las variables cuantitativas, así como sus intervalos de confianza. Como índices complementarios, se consideró en estas últimas la asimetría de la distribución y el grado de apuntamiento respecto de la ley normal, con objeto de comprobar la idoneidad en la aplicación de posteriores test estadísticos que exigen la normalidad de la distribución de las variables.

Los datos fueron sintetizados mediante la oportuna tabulación y representados gráficamente mediante diagramas de barras o polígonos de frecuencias en el caso de variables cuantitativas discretas.

3.6.2.-ANÁLISIS BIVARIANTE

Para estudiar la asociación o relación entre dos variables cualitativas se utilizó una prueba de independencia para comparar proporciones observadas en grupos independientes (χ^2 -cuadrado), verificándose las condiciones de aplicación (efectivos esperados no inferiores a 5, o no inferiores a 3 empleando corrección de Yates).

Cuando no se cumplieron las condiciones de aplicación se empleó la prueba exacta de Fisher.

En el caso de una variable cualitativa binaria y otra con más de dos categorías ordenadas, se aplicó la prueba de tendencia lineal de Mantel-Haenscel, con objeto de establecer una asociación lineal significativa.

3 MATERIAL Y MÉTODO

Para estudiar la relación entre una variable cualitativa binaria y una cuantitativa, se utilizó la prueba “t” de comparación de medias en grupos independientes basada en la ley de Student-Fisher. La hipótesis de igualdad de varianzas se verificó con la prueba F basada en la ley de Snedecor, suponiendo en ambas pruebas que la variable cuantitativa seguía en la población una ley normal por tratarse de muestras consideradas grandes desde el punto de vista estadístico.

Por último, se utilizaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney en grupos independientes) cuando la distribución de alguna de las variables presentaba marcadas anomalías (asimetría, etc.) o al comparar grupos pequeños, cuando se vulneraban los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas.

En la comparación de medias en más de dos grupos independientes se utilizó el análisis de varianza y la prueba “H” de Kruskal-Wallis, empleando esta última cuando no se verificaban las condiciones de aplicación de la primera (homogeneidad de varianzas) o en el caso de variables con categorías ordenadas.

3.6.3.-ANÁLISIS DE CONCORDANCIA

Se realizó un análisis de concordancia para las técnicas de inmunohistoquímica y Western-Blot por separado considerando que la expresión de CA-IX es constante en los CCRCC, para obtener los acuerdos específicos positivo y negativo, así como el índice kappa que corrige los hallazgos coincidentes por el azar. De igual manera, se realizó el mismo estudio comparando ambas pruebas entre sí. También se realizó un estudio de sensibilidad y especificidad para ambas técnicas.

3.6.4.-ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE REGRESIÓN LOGÍSTICA

Mediante el procedimiento “Logistic Regression” del sistema SPSS®, se construyó un modelo de regresión logística con la finalidad de analizar la relación entre las variables estudiadas y la existencia de metástasis o no en el momento del diagnóstico de los pacientes (variable dependiente), introduciendo variables de ajuste para controlar la confusión y comprobando la existencia de variables modificadoras de

efecto e interacciones. El objeto de dicho análisis fue estimar los coeficientes de regresión parcial que expresan el peso de las distintas variables independientes en la explicación de la variabilidad de la existencia de metástasis.

La variable dependiente considerada es la existencia de metástasis (0: no metástasis; 1: si metástasis), y el resto de variables, en forma dicotómica y codificadas como 0 y 1, fueron las siguientes:

- Edad (0: <60 años; 1:60 años ó más).
- Sexo (0: varón; 1: mujer).
- Grado nuclear de Fuhrman (0: grados 1 y 2; 1: grados 3 y 4).
- Estadio pT (0: estadios pT1ab y pT2; 1: estadios pT3ab y pT4).
- Expresión de HIF1 α (0: no expresión; 1: si expresión).
- Expresión de ERK5 (0: no expresión; 1: si expresión)
- Expresión de VEGF (0: no expresión; 1: si expresión)
- Alteración en VHL (:0 no alterado; 1: si alterado)

Las variables se introdujeron secuencialmente en el modelo, como variables de control, a través del método de inclusión por pasos. Se incluyeron las variables con valores $p \leq 0,05$ en la prueba de razón de verosimilitud y fueron excluidas cuando $p \geq 0,10$.

Los criterios de convergencia utilizados comportaban detener el ciclo cuando el cambio en todos los parámetros estimados era inferior a 0,0001 o si la proporción de cambio de logaritmo de la función de verosimilitud era inferior a 0,0001.

El ajuste del modelo se valoró mediante la comparación de valores predichos y observados (especificidad, sensibilidad y clasificaciones correctas). La exponencial de cada parámetro (OR) representó el factor por el cual se multiplicaba la *odds* de la respuesta estudiada al variar el valor de cada una de las variables consideradas. Dado que se trata de un estudio transversal, la OR representa *odds* de prevalencia.

3 MATERIAL Y MÉTODO

RESULTADOS **4**

4.1.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA, VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS

4.1.1.- RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Se recogieron muestras de tejido tumoral y de tejido renal sano procedentes de 76 pacientes intervenidos por carcinoma de células renales.

La cirugía realizada mayoritariamente consistió en nefrectomía radical por vía lumbar en 30 casos (39,5%), por vía abdominal en 13 (17,1%), en 21 casos (27,6%) por vía laparoscópica y en 12 (15,8%) se practicó nefrectomía parcial, de los que en 9 la indicación fue electiva y en 3 se llevó a cabo por ser el paciente monorreno. En todas las cirugías la muestra se extrajo con un margen de parénquima renal sano, lo que permitió extraer tejido para el estudio.

De los 76 pacientes que componen el estudio, a 14 (21,1%) se les realizó algún tratamiento posterior a la cirugía: radioterapia a 3 (21,4%), quimioterapia a 8 (57,2%) y cirugía paliativa de metástasis en el momento del diagnóstico a 3 (21,4%).

4.1.2.- EDAD

La edad media de los pacientes en el momento de la realización de la cirugía fue de 64,1 años (DE: 12,4; Intervalo de confianza – I.C. 95%: 61,3 – 67,0) con un rango de edad entre 31,8 a 83,9 años.

La mediana de edad fue de 66,2 años. La muestra presentó una morfología asimétrica, aunque no difirió significativamente de la distribución normal según la prueba de Kolgomorov-Smirnov (Z: 0,952; p: n.s.). Véase figura 9.

4 RESULTADOS

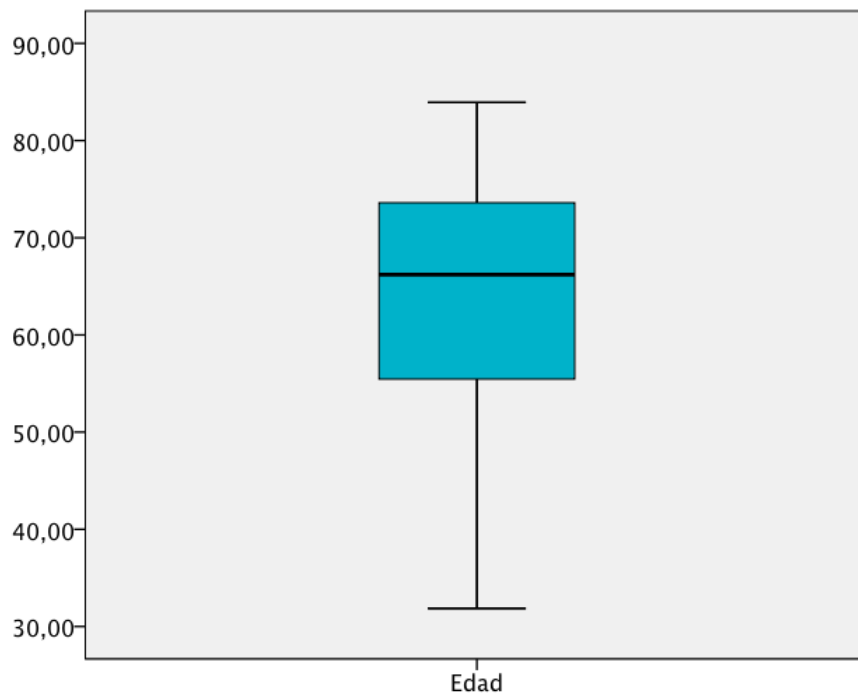


Figura 9. Edad de los pacientes.

4.1.3. - SEXO

La muestra estaba formada por 52 hombres (68,4%) y 24 mujeres (31,6%). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre edad y sexo.

4.1.4. - LATERALIDAD, LOCALIZACIÓN Y CLÍNICA

Las características de localización, lateralidad y clínica de los tumores renales se reflejan en la tabla 8.

La lateralidad de los tumores se distribuyó prácticamente por igual en un riñón que en otro. El riñón izquierdo fue el afectado en 39 pacientes (51,3%) y el derecho en 37 (48,7%).

En lo que se refiere a la localización topográfica dentro del riñón, la más frecuente fue la mesorrenal, que ocurrió en 42 casos (55,3%), en el polo renal superior en 20 casos (26,3%) y en el inferior en 14 casos (18,4%).

El motivo más frecuente por el que se diagnosticaron los pacientes con tumor renal fue su hallazgo incidental al realizar una prueba de imagen por otro motivo, lo que ocurrió en 44 pacientes (57,9%). En el resto de casos, los pacientes consultaron por otras causas como hematuria, dolor u otras manifestaciones.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Lateralidad	Derecho	37	48,7
	Izquierdo	39	51,3
Localización	Mesorrenal	42	55,3
	Polo superior	20	26,3
	Polo inferior	14	18,4
Clínica	Hematuria	12	15,8
	Dolor	7	9,2
	Incidental	44	57,9
	Otros	13	17,1

Tabla 8. Lateralidad, localización y clínica.

4.1.5.- HISTOLOGÍA

En el estudio anatomopatológico de los especímenes quirúrgicos se determinó que el carcinoma renal de células claras fue la variante histológica más frecuente ya que se presentó en 50 casos (65,8%), seguido del subtipo cromóforo en 13 casos (17,1%). Además se encontraron 9 oncocitomas (11,8%), 3 casos de carcinoma papilar (3,9%) y uno de ductos de Bellini (1,3%). En la figura 10 se muestra la distribución de frecuencia de los tumores estudiados.

4 RESULTADOS

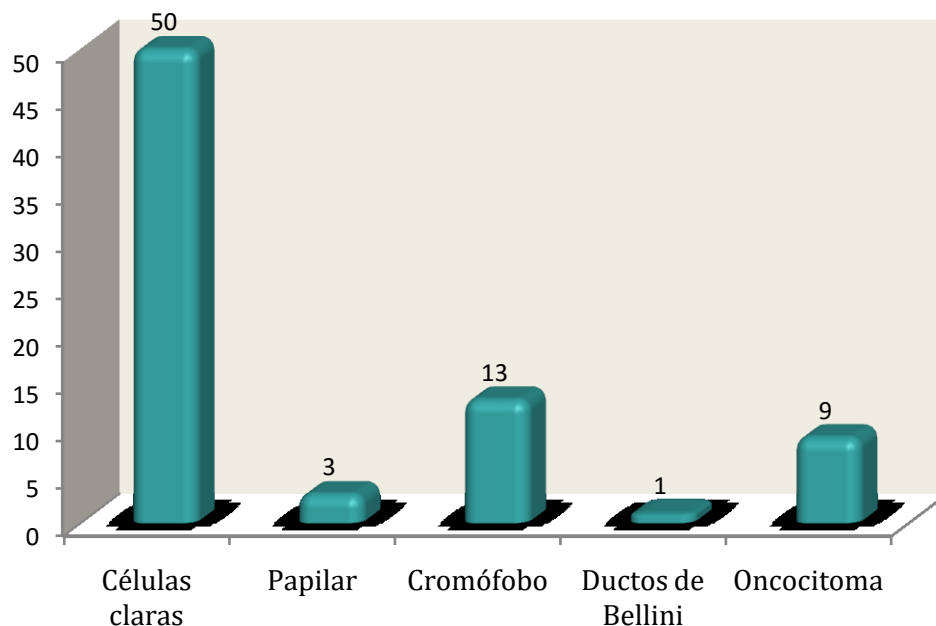


Figura 10. Frecuencia de diagnóstico de los diferentes subtipos de CCR.

4.1.6.- GRADO DE FUHRMAN

El grado nuclear de Fuhrman más frecuentemente hallado fue el 2, que se encontró en 27 casos (40,3%), seguido del grado 3 en 23 casos (34,3%), grado 4 con 13 casos (19,4%) y siendo el grado 1 el menos frecuente con 4 casos (6%). Hubo 9 casos (oncocitomas) que no tuvieron catalogación del grado nuclear.

4.1.7- CLASIFICACIÓN TNM

4.1.7.A.- TUMOR PRIMARIO (pT)

Conforme a la clasificación TNM,⁽¹⁹⁾ la frecuencia de estadios para el tumor primario se distribuyó según se muestra en la tabla 9, correspondiendo al estadio pT1b la forma de presentación más frecuente (34,2%) y al estadio pT3b la menos frecuente con 7 casos.

		Frecuencia	%
Estadio pT	pT1a	16	21,1
	pT1b	26	34,2
	pT2	16	21,1
	pT3a	11	14,5
	pT3b	7	9,2
	TOTAL	76	100
Estadio pN	pNx	70	92,1
	pN0	6	7,9
	TOTAL	76	100
Estadio pM	pMx	20	26,3
	pM0	35	46,1
	pM1	21	27,6
	TOTAL	76	100
Estadio TNM	I	39	51,3
	II	13	17,1
	III	3	3,9
	IV	21	27,6
	TOTAL	76	100

Tabla 9.-Frecuencia y porcentaje de estadios pT, pN, pM y TNM.

4.1.7.B.- GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (pN)

De los 76 casos analizados, solo se realizó linfadenectomía a 6 de ellos (7,9%) y al evaluarse la afectación tumoral los seis fueron negativos (pN0). El resto de los casos fueron clasificados como pNx, es decir, no fue posible la evaluación de los ganglios linfáticos regionales. (Tabla 9)

3.1.7.C.- METÁSTASIS A DISTANCIA (pM)

Presentaron metástasis a distancia en el momento del diagnóstico 21 casos (27,6%). En 20 casos no fue posible la valoración de la presencia o ausencia de metástasis. En el resto (46,1%) no se hallaron metástasis. En estos 21 pacientes se

4 RESULTADOS

detectaron un total de 26 metástasis (4 de 21 pacientes presentaron más de 2 metástasis en el momento del diagnóstico), véase tabla 9. De las 26 metástasis, 11 fueron pulmonares, 6 hepáticas y 2 suprarrenales. Las 7 restantes se repartieron por igual en otras localizaciones.

3.1.7.D.- AGRUPACIÓN POR ESTADIOS

Con respecto al estadio TNM, el estadio I fue el más frecuente con 39 casos de los 76 (51,3%), seguido del IV con 21 (27,6%), encontrándose 13 casos en el estadio II (17,1%) y solamente 3 casos en el estadio III (3,9%) como se muestra en la tabla 9.

4.2.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA CA-IX

Al inicio del estudio, se decidió comenzar analizando la expresión de CA-IX en las muestras de los 76 pacientes, ya que, al ser dicha proteína diana directa de HIF-1 α , podría dar una idea de posibles alteraciones en la ruta a estudiar.

Dicha expresión se estudió mediante dos técnicas: inmunohistoquímica y western blot. Todos los tumores de CCRCC, ya sea por una técnica u otra fueron positivos para CA-IX, tal y como se refleja en la tabla 10. Mediante la técnica de inmunohistoquímica, 51 muestras tumorales (67,1%) presentaron positividad para dicha proteína, mientras que cuando la expresión de CA-IX fue valorada mediante la técnica de western blot, fueron 48 (63,2%). Considerando dicha expresión en los tumores atendiendo a que éstos fueran de células claras (CCRCC) o no (CCRNCC) (tabla 11), se observó un grado de significación estadística $p < 0,005$ para ambas pruebas (IHQ y WB). En ninguna de las muestras de tejido renal normal se detectó sobreexpresión de la proteína CA-IX por ninguna de las dos técnicas y únicamente un caso de CCRCC expresó CA-IX por inmunohistoquímica.

		HISTOPATOLOGÍA		
		CCRCC N(%)	CCRNCC N(%)	Total
INMUNOHISTOQUÍMICA	Negativo	0 (0)	25 (96,2)	25 (32,9)
	Positivo	50 (100)	1 (3,8)	51 (67,1)
	Total	50 (100)	26 (100)	76 (100)
WESTERN-BLOT	Negativo	2 (4)	26 (100)	28 (36,8)
	Positivo	48 (96)	0 (0)	48 (63,2)
	Total	50 (100)	26 (100)	76 (100)

Tabla 10. Relación entre las técnicas de western Blot e inmunohistoquímica.

La figura 11 muestra las imágenes de inmunohistoquímica para CA-IX, con su referencia de expresión detectada mediante Western-Blot según su histología tumoral. Se puede observar cómo la expresión apareció sólo en tumores de células claras y en el clasificable, tanto por inmunohistoquímica como por western blot. Tomando como referencia la tubulina, la expresión es mayor en el CCRCC y, por inmunohistoquímica, se ven zonas teñidas intensamente pero no en toda la extensión de la preparación.

4 RESULTADOS

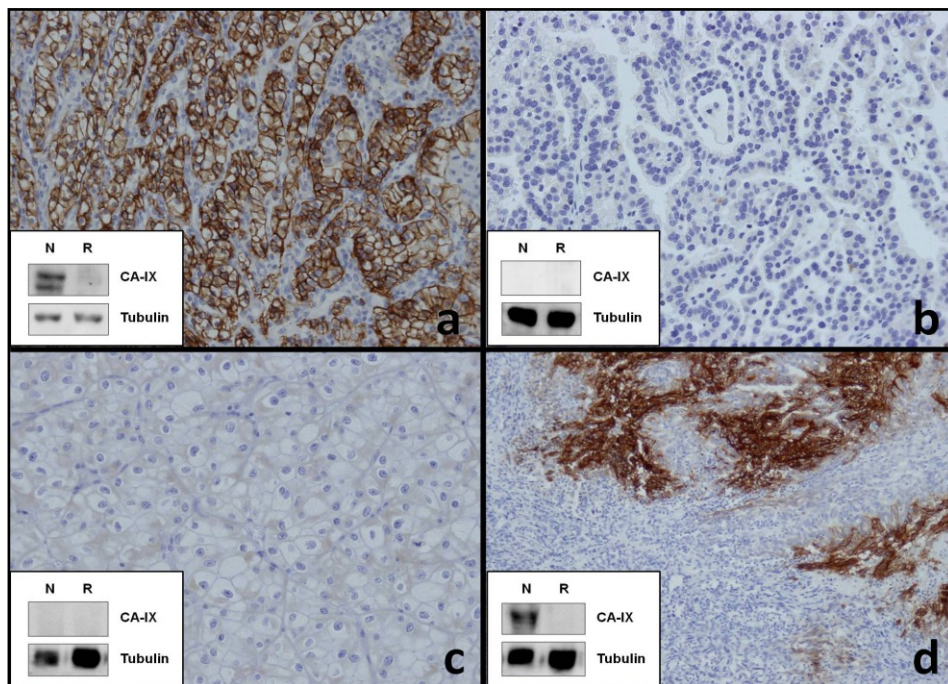


Figura 11. Inmunohistoquímica de CA-IX en el tejido tumoral y western blot de CA-IX en tejido tumoral y parénquima renal sano en diferentes subtipos histológicos de CCR: a) Carcinoma renal de célula clara; b) Cromóforo; c) Papilar; d) inclasificado con componente de célula clara.

Al comparar ambas técnicas, como se puede observar en la tabla 11, hubo 3 casos que por western blot no expresaban la proteína pero sí por inmunohistoquímica.

Se realizó un estudio de concordancia entre ambas técnicas, mediante el índice kappa y los acuerdos específicos. Los resultados se muestran en la tabla 12. Estos datos fueron obtenidos comparando la inmunohistoquímica o el western blot con los resultados histológicos (CCRCC vs CCRNCC) y cuando se compararon ambas técnicas entre sí pudimos observar altos índices de concordancia para el diagnóstico de tumores de células claras y también un alto índice de concordancia entre ambas técnicas.

CA-IX IHQ					
			No expresa (negativo)	Expresa (positivo)	Total
CA-IX WB	Negativo	Frecuencia	25	3	28
		%	100	5,9	36,8
	Positivo	Frecuencia	0	48	48
		%	0	94,1	63,2
Total	Frecuencia	25	51	76	
	%	100	100	100	

Tablas 11. Comparativa entre western blot e inmunohistoquímica

	Acuerdo específico negativo	Acuerdo específico positivo	Acuerdo global	Índice kappa	p
IHQ	98% (89,5% a 99,9%)	99,% (94,6% a 100%)	98,7% (92,9% a 100%)	1 (0,9 a 1)	<0,005
WB	96,3% (87,2% a 99,5%)	98% (92,8% a 99,7%)	97,4% (90,8% a 99,7%)	0,9 (0,9 a 1)	<0,005
IHQ-WB	94,3% (84,3% a 98,8%)	97% (91,4% a 99,4%)	96% (88,9% a 99,2%)	0,9 (0,8 a 1)	<0,005

Tablas 12. Estudio de concordancia mediante el índice kappa y los acuerdos específicos.

Según el porcentaje de positivos y negativos para ambas pruebas dependiendo de que el tumor fuera o no de células claras, la técnica de western blot presenta una sensibilidad del 96% y una especificidad del 100% mientras que para la inmunohistoquímica la sensibilidad fue del 100% y la especificidad del 96,1%.

Como se muestra en la tabla 13 al valorar la relación de la expresión de la proteína CA-IX con los parámetros clinicopatológicos, los tumores con clínica (no incidentales) presentaron con mayor frecuencia expresión de CA-IX ($p=0,007$).

4 RESULTADOS

Clínica							
			Hematuria	Dolor	Incidental	Otros	Total
CA-XI WB	Negativo	Frec.	5	0	22	1	28
		%	41,7	0	50	7,7	36,8
	Positivo	Frec.	7	7	22	12	48
		%	58,3	100	50	92,3	63,2
	Total	Frec.	12	7	44	13	76
		%	100	100	100	100	100

Tabla 13. Relación de la expresión de CA-IX con la clínica.

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la expresión de CA-IX y el grado de Fuhrman. Tampoco la hubo con respecto al estadio pT. Sí se comprobó que en estadios más altos así como en presencia de metástasis había un mayor porcentaje de casos que expresaban la proteína CA-IX (Tabla 14).

CA-IX WB								
		Negativo		Positivo		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Grado de Fuhrman	Grado 1	0	0	4	100	4	100	n.s.
	Grado 2	7	25,9	20	74,1	27	100	
	Grado 3	9	39,1	14	60,9	23	100	
	Grado 4	3	23,1	10	76,9	13	100	
	TOTAL	19	28,4	48	71,6	67	100	
Estadio pT	pT1a	7	43,8	9	56,3	16	100	n.s.
	pT1b	14	53,8	12	46,2	26	100	
	pT2	3	18,8	13	81,3	16	100	
	pT3a	3	27,3	8	72,7	11	100	
	pT3b	1	14,3	6	85,7	7	100	
	TOTAL	28	36,8	48	63,2	76	100	
Estadio pM	pMx	7	35	13	65	20	100	0,02
	pM0	18	51,4	17	48,6	35	100	
	pM1	3	14,3	18	85,7	21	100	
	TOTAL	28	36,8	48	63,2	76	100	
Estadio TNM	I	21	53,8	18	46,2	39	100	0,015
	II	3	23,1	10	76,9	13	100	
	III	1	33,3	2	66,7	3	100	
	IV	3	14,3	18	85,7	21	100	
	TOTAL	28	36,8	48	63,2	76	100	

Tabla 14. Relación de la expresión de CA-IX con los parámetros patológicos.

4.3.- ANÁLISIS GENÉTICO DE *VHL*

4.3.1- MUTACIONES DEL GEN *VHL*

El estudio de las mutaciones del gen *VHL* se realizó únicamente en las muestras de CCRCC. Esto se decidió tras analizar los resultados de los Western blot de CA-IX al comprobar que su expresión era exclusiva de este tipo de tumor. Se dio por hecho que el estatus de *VHL* en el resto de subtipos tumorales es correcto ya que al no haber expresión de CA-IX, *VHL* debería estar desarrollando correctamente su función de degradar a HIF-1 α y de ahí la ausencia de expresión de CA-IX. Por lo que el estudio del estatus del gen *VHL* en este tipo de muestras se vio innecesario.

Se analizaron y procesaron 50 muestras de tejido tumoral de pacientes con CCRCC, detectándose un total de 13 mutaciones en el gen *VHL*, suponiendo un porcentaje del 26%.

En primer lugar se relacionó la presencia de mutación con los datos clínicos de los pacientes, no viéndose relación estadísticamente significativa con parámetros como sexo, clínica, ni localización; pero sí con lateralidad, encontrando en el riñón derecho un mayor número de mutaciones (tabla 15).

4 RESULTADOS

MUTACIÓN EN <i>VHL</i>								
		NO		SI		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Sexo	Varón	26	76,5	8	23,5	34	100	n.s.
	Mujer	11	68,8	5	31,3	16	100	
	TOTAL	37	74	13	26	50	100	
Lateralidad	Derecho	14	58,3	10	41,7	24	100	0,015
	Izquierdo	23	88,5	3	11,5	26	100	
	TOTAL	37	74	13	26	50	100	
Localización	Mesorrenal	24	75	8	25	32	100	n.s.
	Polo superior	8	88,9	1	11,1	9	100	
	Polo inferior	5	55,6	4	44,4	9	100	
	TOTAL	37	74	13	26	50	100	
Clínica	Hematuria	6	85,7	1	14,3	7	100	n.s.
	Dolor	6	85,7	1	14,3	7	100	
	Incidental	16	66,7	8	33,3	24	100	
	Otros	9	75	3	25	12	100	
	TOTAL	37	74	13	26	50	100	

Tabla 15. Relación entre la presencia de mutación y los datos clínicos.

Con respecto al grado de Fuhrman, se encontraron mutaciones en todos los grados, aunque con mayor frecuencia en los grados 1 y 2, que en el resto de grados ($p=0,036$). Tampoco se observó que la existencia de mutación se correlacionara con estadio pT, pN, pM ni TNM (Tabla 16).

MUTACIÓN EN <i>VHL</i>								
		NO		SI		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Grado de Fuhrman	Grado1	1	25	3	75	4	100	0,036
	Grado2	14	66,7	7	33,3	21	100	
	Grado3	13	92,9	1	7,1	14	100	
	Grado4	9	81,8	2	18,2	11	100	
	TOTAL	37	74	13	26	50	100	
Estadio pT	pT1a	7	77,8	2	22,2	9	100	n.s.
	pT1b	8	61,5	5	38,5	13	100	
	pT2	11	84,6	2	15,4	13	100	
	pT3a	5	62,5	3	37,5	8	100	
	pT3b	6	85,7	1	14,3	7	100	
	TOTAL	37	74	13	26	50	100	
Estadio pN	pNx	31	70,5	13	29,5	44	100	n.s.
	pN0	6	100	0	0	6	100	
	TOTAL	37	74	13	26	50	100	
Estadio pM	pMx	10	71,4	4	28,6	14	100	n.s.
	pM0	12	70,6	5	29,4	17	100	
	pM1	15	78,9	4	21,1	19	100	
	TOTAL	37	74	13	26	50	100	
Estadio TNM	I	13	68,4	6	31,6	19	100	n.s.
	II	9	90	1	10	10	100	
	III	0	0	2	100	2	100	
	IV	15	78,9	4	21,1	19	100	
	TOTAL	37	74	13	26	50	100	

Tabla 16. Relación entre la presencia de mutación y los parámetros patológicos.

4.3.1.A.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES SEGÚN SU LOCALIZACIÓN GENÓMICA

Se encontraron un total de 13 mutaciones repartidas en 13 pacientes. Al analizar las mutaciones según su localización dentro del gen se halló, como se muestra en la tabla 17, un mayor número de mutaciones en el exón 1 con 7 mutaciones (53,8%).

4 RESULTADOS

Localización	Frecuencia	Porcentaje
Exon 1	7	53,8
Exon 2	3	23,1
Exon 3	2	15,4
Intrónica	1	7,7

Tabla 17. Localización de las mutaciones.

Se analizó la relación de la localización exónica de las mutaciones con los parámetros clínicos y no se observó relación estadísticamente significativa con ninguno de ellos.

4.3.1.B.- TIPO DE MUTACIÓN

Se hallaron tres tipos distintos de mutaciones: puntual (cambio de base), delección e inserción, todas ellas en heterocigosis.

La mutación observada con más frecuencia fue la delección, apareciendo en 5 casos (38,5%). El tipo de mutación no correlacionó de manera estadísticamente significativa con ningún otro parámetro.

Mutación puntual:

Las mutaciones puntuales aparecieron en 4 ocasiones (30,8%). Todas ellas fueron transversiones. Tres de ellas se encontraron en el exón 1 y una en la región intrónica cerca de la región de *splicing* del exón 2 en la posición +4. En la tabla 18 se muestran los tipos de mutaciones puntuales encontradas y su localización, y en la figura 12 podemos observar las secuencias de nucleótidos de dos muestras, una de ellas es portadora de una mutación puntual en heterocigosis, por ello se observa la presencia de un doble pico donde indica la flecha.

Localización	Tipo	Cambio de codón
Exon 1	CxT	CGG x TGG
Intrónica	CxA	
Exon 1	GxT	AAG x AAT
Exon 1	AxG	TAG x TGG

Tabla 18. Tipos de mutaciones encontradas, cambio que originan en el codón en el que se encuentran y su localización.

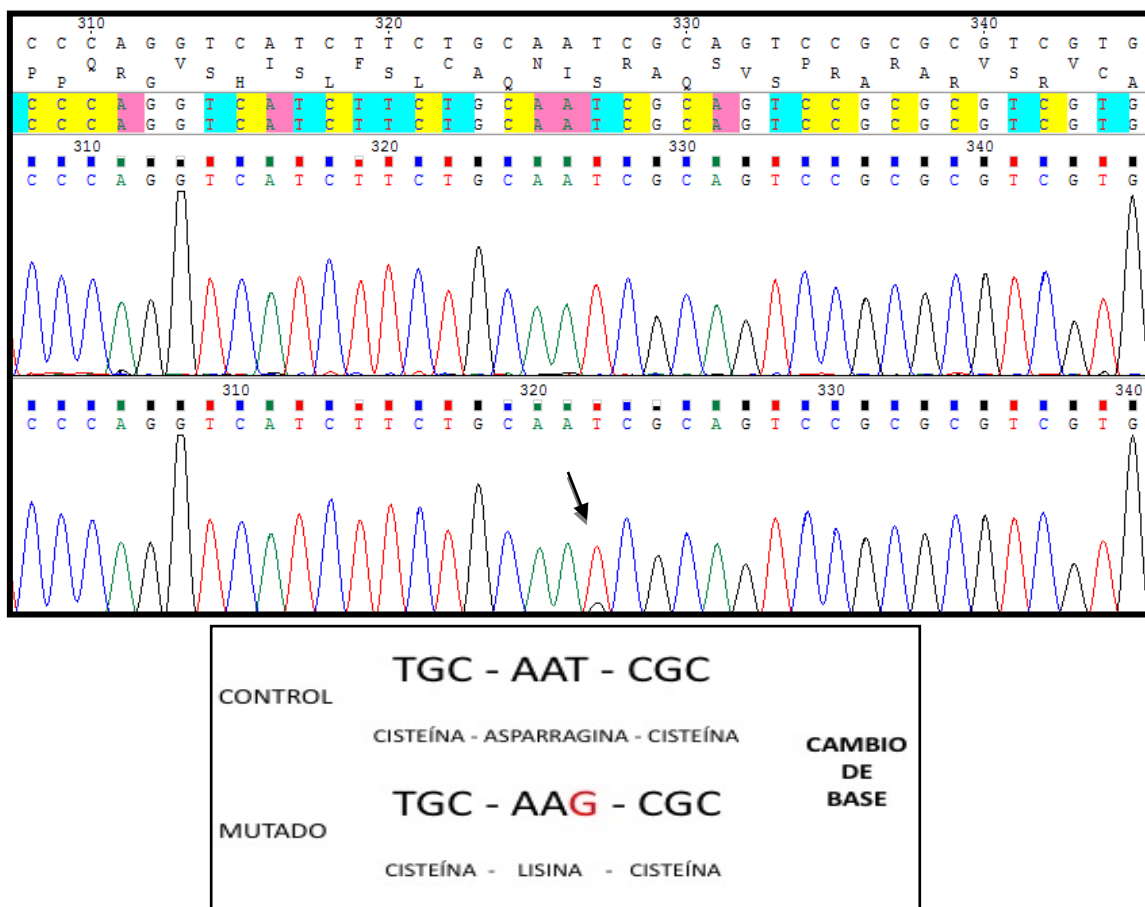


Figura 12. Se muestran dos secuencias de muestras de ADN control (parte superior) y mutado (parte inferior) de pacientes diagnosticados de CCRC. En la secuencia mutada podemos observar un cambio de base (G por T) en la región central de la misma. También se muestra el cambio que dicha mutación genera.

4 RESULTADOS

Delección:

La delección fue el tipo de mutación más frecuente encontrándose en cinco ocasiones (38,5%). En la tabla 19 se describen el tipo de delecciones encontradas.

En la figura 13 encontramos las secuencias de nucleótidos de dos muestras, una silvestre y otra portadora de una delección (en el lugar donde se comienza a ver dobles picos). En la muestra mutada se puede observar la superposición de picos de manera que la pauta de lectura cambia, alterando la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Si una delección es múltiplo de tres (número de nucleótidos que conforman un codón) y corresponde al inicio del codón, se producirá la pérdida de tantos aminoácidos como nucleótidos perdidos dividido por tres. Si la pérdida de nucleótidos no es múltiplo de tres, cambia por completo la pauta de lectura originándose en la transcripción una consiguiente proteína truncada.

Localización	Codón	Numero de pares de bases delecionadas	Bases delecionadas	Cambio de codón
Exon 2	136	(-1)	(-A)	CCT x CCA
Exon 1	54	(-11)		
Exon 1	62	(-2)	(-TG)	GCT x GTG
Exon 3	176	(-3)	(-AGG)	(-AGG)
Exon 1	107	(-1)	(-C)	GCC x CGC

Tabla 19. Diferentes delecciones encontradas, localización y efecto de cambio sobre el codón.

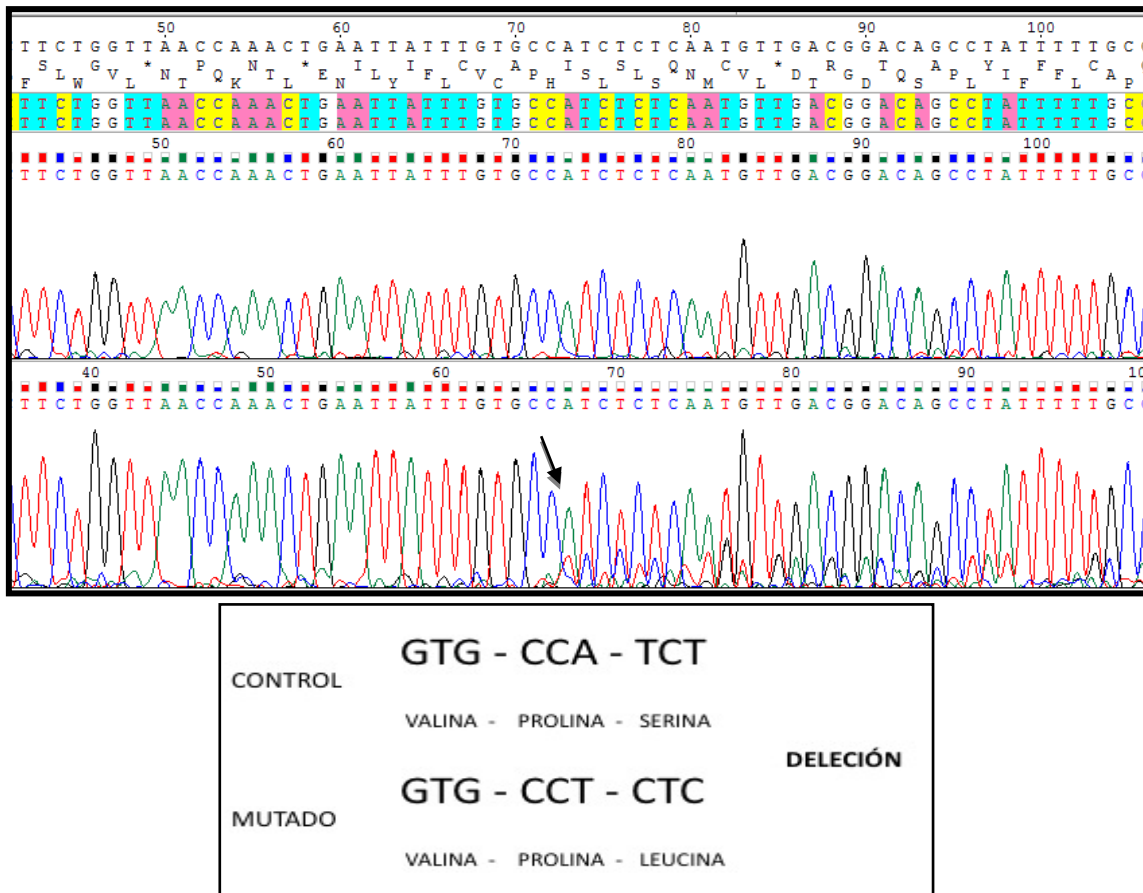


Figura 13. Secuencias de muestras de ADN control (parte superior) y mutado (parte inferior) de pacientes diagnosticados de CCRCC. En la secuencia mutada podemos observar una delección de una adenina con la aparición de dobles picos a partir de la mutación. También se muestra el cambio que dicha mutación genera.

Inserción:

Se encontraron 4 inserciones todas ellas de una base. Dos de las inserciones fueron halladas en el codón 2, el resto se muestra en la tabla 20.

Localización	Codón	Numero de pares de bases insertadas	Bases insertadas	Cambio de codón
Exon 2	137	(+1)	(+T)	TGT x GTG
Exon 1	112	(+1)	(+A)	TAA x TAC
Exon 2	128	(+1)	(+ C)	GCT x CCT
Exon 3	175	(+1)	(+T)	TTA x TAC

Tabla 20. Inserciones encontradas, localización y efecto de cambio sobre el codón.

4 RESULTADOS

En la figura 14 encontramos un patrón de superposición de picos similar al de las deleciones, pero en este caso es porque la muestra es portadora de una inserción, en este caso ocurre la adición de nucleótidos que alterarán de una manera u otra el marco de lectura según el número de bases insertadas.

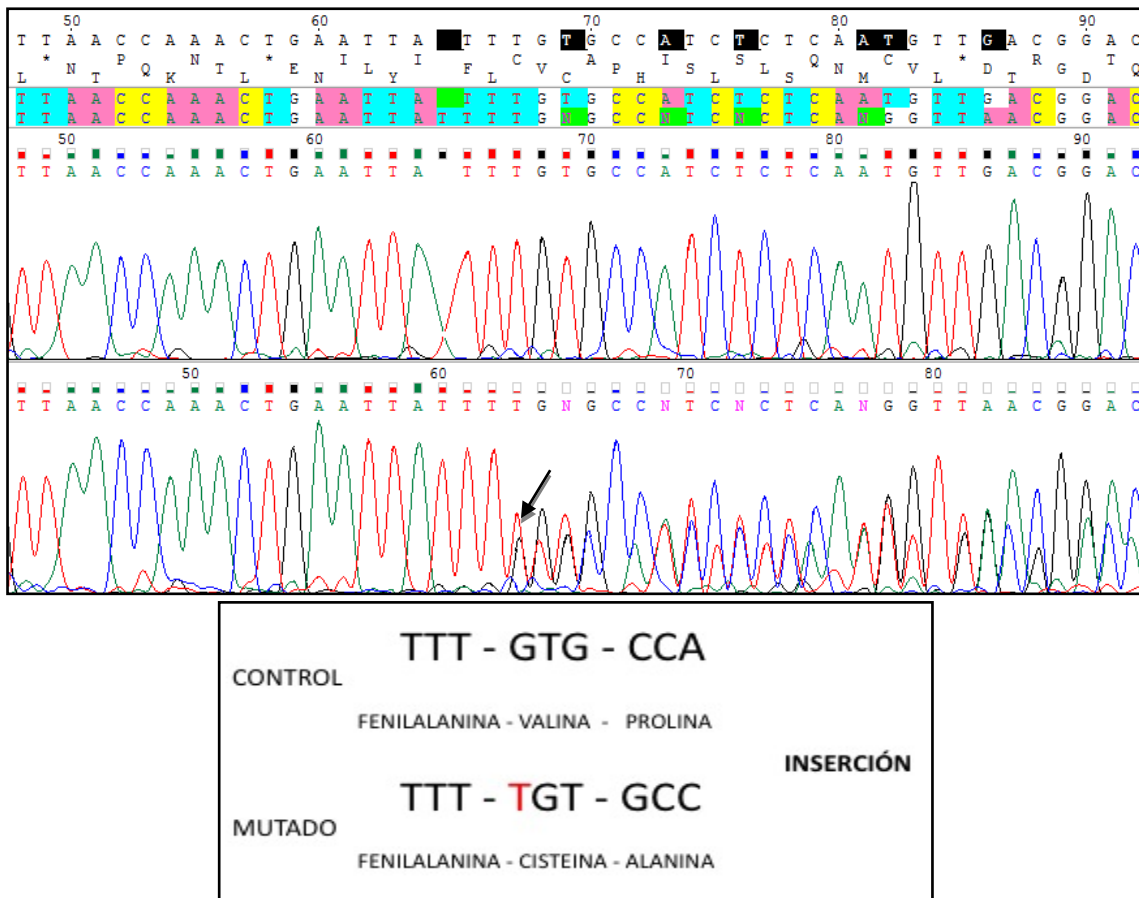


Figura 14. Secuencias de muestras de ADN control (parte superior) y mutado (parte inferior) de pacientes diagnosticados de CCRCC. En la secuencia mutada podemos observar una inserción de una Timina. También se muestra el cambio que dicha mutación genera.

Para concluir el estudio mutacional de *VHL*, en la tabla 21, se muestra un resumen con todas las mutaciones encontradas, sus características y el cambio que generan.

Mutaciones									
Localización	Codón	Tipo	Cambio de codón	Cambio de aa.	Grado de Fuhrman	pT	pN	pM	TNM
Exon 2	136	Delección (-1) (-A)	CCT x CCA	Pro x Pro	3	pT1b	pNx	pMx	I
Exon 1	88	Puntual (CxT)	CGG x TGG	Arg x Trp	1	pT1b	pNx	pMx	I
Exon 2	137	Inserción (+1) (+T)	TGT x GTG	Cys x Val	2	pT2	pNx	pM0	II
Exon 1	112	Inserción (+1) (+A)	TAA x TAC	STOP x Tyr	2	pT3a	pNx	pM1	IV
Intrónica		Puntual (CxA)			4	pT3b	pNx	pM1	IV
Exon 2	128	Inserción (+1) (+ C)	GCT x CCT	Ala x Leu	2	pT1b	pNx	pM0	I
Exon 3	175	Inserción (+1) (+T)	TTA x TAC	Leu x Tyr	1	pT1a	pNx	pM0	I
Exon 1	78	Puntual (GxT)	AAG x AAT	Lys x Asn	2	pT1b	pNx	pM0	I
Exon 1	54	Delección (-11)	Del -11		4	pT1b	pNx	pM1	IV
Exon 1	62	Delección (-2) (-TG)	GCT x GTG	Ala x Val	1	pT3a	pNx	pMx	III
Exon 3	176	Delección (-3) (-AGG)	Del -3 (-AGG)		2	pT3a	pNx	pMx	III
Exon 1	107	Delección (-1) (del -C)	GCC x CGC	Ala x Arg	2	pT1a	pNx	pM0	I
Exon 1	88	Puntual (AxG)	TAG x TGG	STOP x Tryp	2	pT2	pNx	pM1	IV

Tabla 21. Resumen del estudio mutacional de *VHL*.

4.3.2.- METILACIÓN VHL

Se analizó el patrón de metilación del promotor del gen *VHL* en 46 pacientes diagnosticados de CCRCC. De esos 46 pacientes analizados se encontraron 9 pacientes (19,6%) con hipermetilación en el promotor del gen *VHL*. En la figura 15 se muestra el patrón de metilación de los diferentes sitios CpG estudiados en los pacientes y en las dos líneas celulares utilizadas como control.

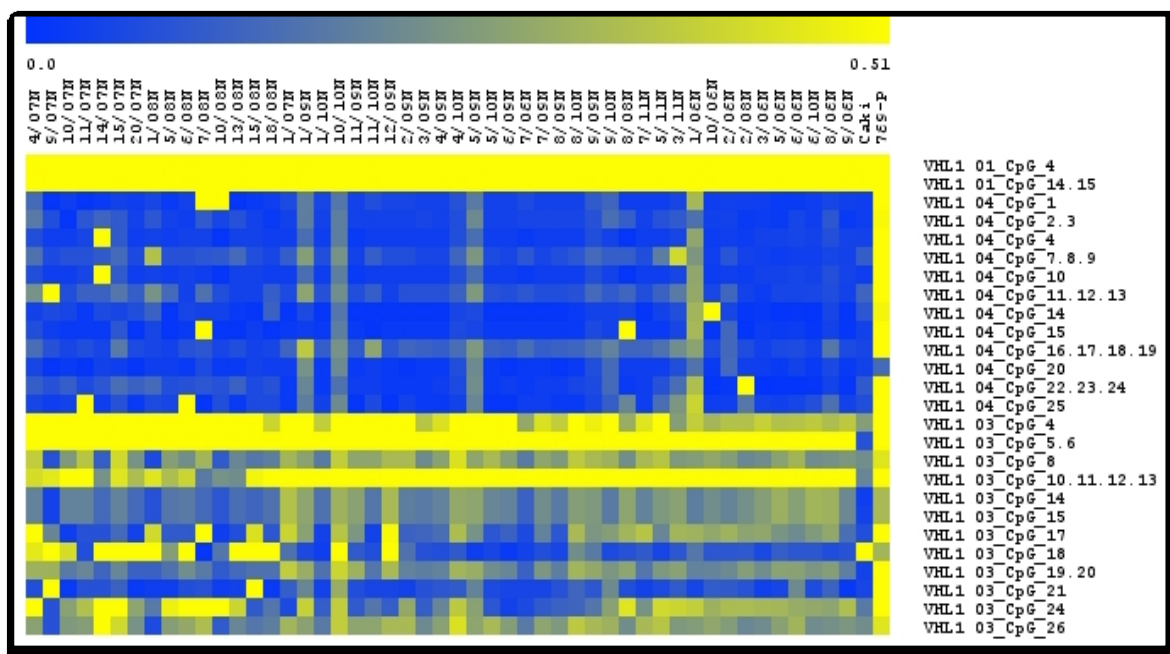


Figura 15. Se muestra el patrón de metilación de los tumores analizados y de las dos líneas celulares tomadas como control (eje x) en 26 sitios CpGs (eje y). La tonalidad amarilla corresponde a un mayor porcentaje de metilación con un máximo de 51% metilado y las tonalidades azuladas a un porcentaje menor.

Se correlacionó el estado de metilación del promotor del gen *VHL* con los diferentes parámetros clínicos no encontrándose relación significativa con ninguno de ellos, salvo con la clínica, ya que apareció hipermetilación en mayor porcentaje en los tumores que presentaron síntomas (Tabla 22).

Metilación <i>VHL</i>								
		VHL Hipermetilado		No hipermetilado		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Sexo	Varón	5	16,1	26	83,9	31	100	n.s.
	Mujer	4	26,7	11	73,3	15	100	
	TOTAL	9	19,6	37	80,4	46	100	
lateralidad	Derecho	5	20,8	19	79,2	24	100	n.s.
	Izquierdo	4	18,2	18	81,8	22	100	
	TOTAL	9	19,6	37	80,4	46	100	
Localización	Mesorrenal	7	23,3	23	76,7	30	100	n.s.
	Polo superior	1	12,5	7	87,5	8	100	
	Polo inferior	1	12,5	7	87,5	8	100	
	TOTAL	9	19,6	37	80,4	46	100	
Clínica	Hematuria	0	0	7	100	7	100	0,008
	Dolor	1	16,7	5	83,3	6	100	
	Incidental	2	9,1	20	90,9	22	100	
	Otros	6	54,5	5	45,5	11	100	
	TOTAL	9	19,6	37	80,4	46	100	

Tabla 22. Relación entre el estado de metilación y los datos clínicos.

Con respecto a la presencia de metástasis a distancia, los resultados no fueron estadísticamente significativos, pero si se observó una tendencia lineal en la que la metástasis a distancia se produjo en mayor proporción en casos con hipermetilación del gen *VHL* (Tabla 23).

4 RESULTADOS

Metilación <i>VHL</i>								
		VHL Hipermetilado		No hipermetilado		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Grado de Fuhrman	Grado1	0	0	4	100	4	100	n.s.
	Grado2	1	5	19	95	20	100	
	Grado3	5	35,7	9	64,3	14	100	
	Grado4	3	37,5	5	62,5	8	100	
	TOTAL	9	19,6	37	80,4	46	100	
Estadio pT	pT1a	1	11,1	8	88,9	9	100	n.s.
	pT1b	2	18,2	9	81,8	11	100	
	pT2	1	7,7	12	92,3	13	100	
	pT3a	2	28,6	5	71,4	7	100	
	pT3b	3	50	3	50	6	100	
	TOTAL	9	19,6	37	80,4	46	100	
Estadio pN	pNx	8	20	32	80	40	100	n.s.
	pN0	1	16,7	5	83,3	6	100	
	TOTAL	9	19,6	37	80,4	46	100	
Estadio pM	pMx	0	0	13	100	13	100	n.s.
	pM0	3	18,8	13	81,3	16	100	
	pM1	6	35,3	11	64,7	17	100	
	TOTAL	9	19,6	37	80,4	46	100	
Estadio TNM	I	2	11,8	15	88,2	17	100	n.s.
	II	1	10	9	90	10	100	
	III	0	0	2	100	2	100	
	IV	6	35,3	11	64,7	17	100	
	TOTAL	9	19,6	37	80,4	46	100	

Tabla 23. Relación entre el estado de metilación de *VHL* y los parámetros patológicos.

Presentaron el gen *VHL* mutado y/o hipermetilado 20 de 40 pacientes (50%), el resto no presentaron ninguna alteración. Tampoco hubo relación de la presencia de alteración en el gen *VHL* ya sea por mutación y/o metilación con los parámetros patológicos. (Tabla 24)

VHL								
		VHL mutado y/o hipermetilado		VHL sin alteraciones		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Clínica	Hematuria	1	5,3	6	22,2	7	100	n.s.
	Dolor	2	10,5	4	14,8	6	100	
	Incidental	8	42,1	14	51,8	22	100	
	Otros	8	42,1	3	11,1	11	100	
Grado de Fuhrman	Grado1	3	15,7	1	3,7	4	100	n.s.
	Grado2	6	31,6	14	51,8	20	100	
	Grado3	6	31,6	8	29,6	14	100	
	Grado4	4	21	4	14,8	8	100	
Metástasis	No	6	43,8	10	55	16	100	n.s.
	Si	9	56,2	8	44,4	17	100	
Estadio TNM	I-II	8	45,8	19	70,4	27	100	n.s.
	III-IV	11	57,9	8	29,6	19	100	

Tabla 24.- Relación entre las alteraciones del gen VHL (mutado, hipermetilado o ambas) y diferentes parámetros patológicos.

4.3.3.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE VHL MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizó el análisis mediante la técnica de inmunohistoquímica a los 50 casos de carcinoma renal de células claras. Como se muestra en la tabla 25 se observó expresión de VHL en más de un 50% de las células observadas, por lo que la mayor parte de los casos fueron positivos, y en cuanto al lugar de expresión fue en la membrana dónde se observó la expresión de la proteína en más de un 50% de los casos (27 casos en membrana y 8 casos donde se expresaba tanto en membrana como en citoplasma).

4 RESULTADOS

VHL IHQ			
Negativo	<10% células	10-50% células	>50% células
8	10	13	19
Lugar de expresión de VHL			
Negativo	Membrana	Citoplasma	Membrana y citoplasma
8	27	7	8

Tabla 25.- Inmunohistoquímica de VHL y número de casos encontrados según el lugar de expresión.

Se relacionó la presencia de mutación de *VHL* con los resultados obtenidos por medio de inmunohistoquímica de la proteína VHL encontrándose un mayor porcentaje de mutaciones en casos con mayor expresión de VHL (37,5% vs 5,6%), los datos se reflejan en la tabla 26. En la figura 16 se muestra una imagen representativa de los diferentes resultados que se encontraron en la inmunohistoquímica.

VHL IHQ						
			Negativo o bajo	Moderado o alto	Total	P
Mutación en vhl	NO	Frecuencia	17	20	37	0,013
		%	94,4	62,5	74	
	SI	Frecuencia	1	12	13	
		%	5,6	37,5	26	
	TOTAL	Frecuencia	18	32	50	
		%	100	100	100	

Tabla 26. Relación entre la presencia de mutación y la expresión de VHL por inmunohistoquímica.

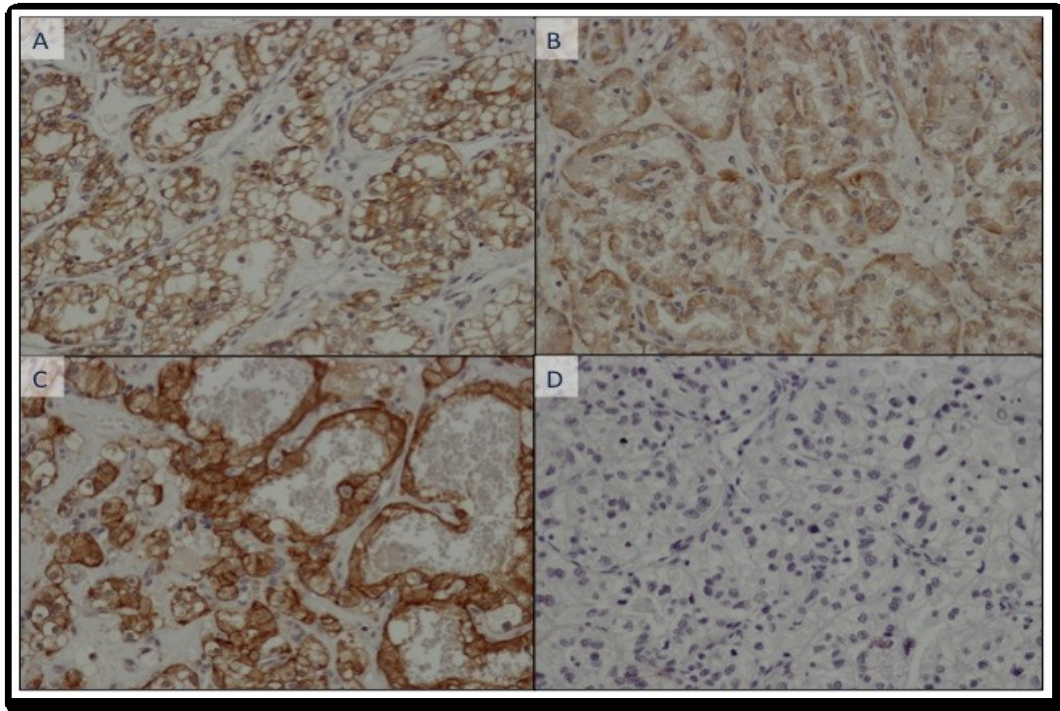


Figura 16. Expresión de VHL por inmunohistoquímica. A: Positivo en membrana; B: Positivo en citoplasma; C: Membrana y citoplasma; D: Negativo

También se halló relación estadísticamente significativa ($p=0,001$) en cuanto a la expresión de VHL con el grado de Fuhrman, observándose que los casos que poseen expresión negativa de VHL correspondían a Fuhrman más altos (14,30% de grado 3 y 54,50% de grado 4). Tabla 27.

			Grado de Fuhrman					
			Grado1	Grado2	Grado3	Grado4	Total	P
VHL IHQ	Negativo	Frec.	0	0	2	6	8	0,001
		%	0	0	14,3	54,5	16	
	Expresión (baja, moderada o alta)	Frec.	4	21	12	5	42	
		%	100	100	85,7	45,5	84	
	TOTAL	Frec.	4	21	14	11	50	
		%	100	100	100	100	100	

Tabla 27. Relación entre el grado de Fuhrman y la expresión de VHL por inmunohistoquímica.

4 RESULTADOS

4.4.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HIF-1 α .

Se realizó el análisis de la expresión de HIF-1 α por inmunohistoquímica en tejido tumoral los 47 casos de carcinoma renal de célula clara. En la figura 17 se puede observar una imagen representativa de las distintas intensidades de expresión de HIF-1 α en las que se clasificó el estudio.

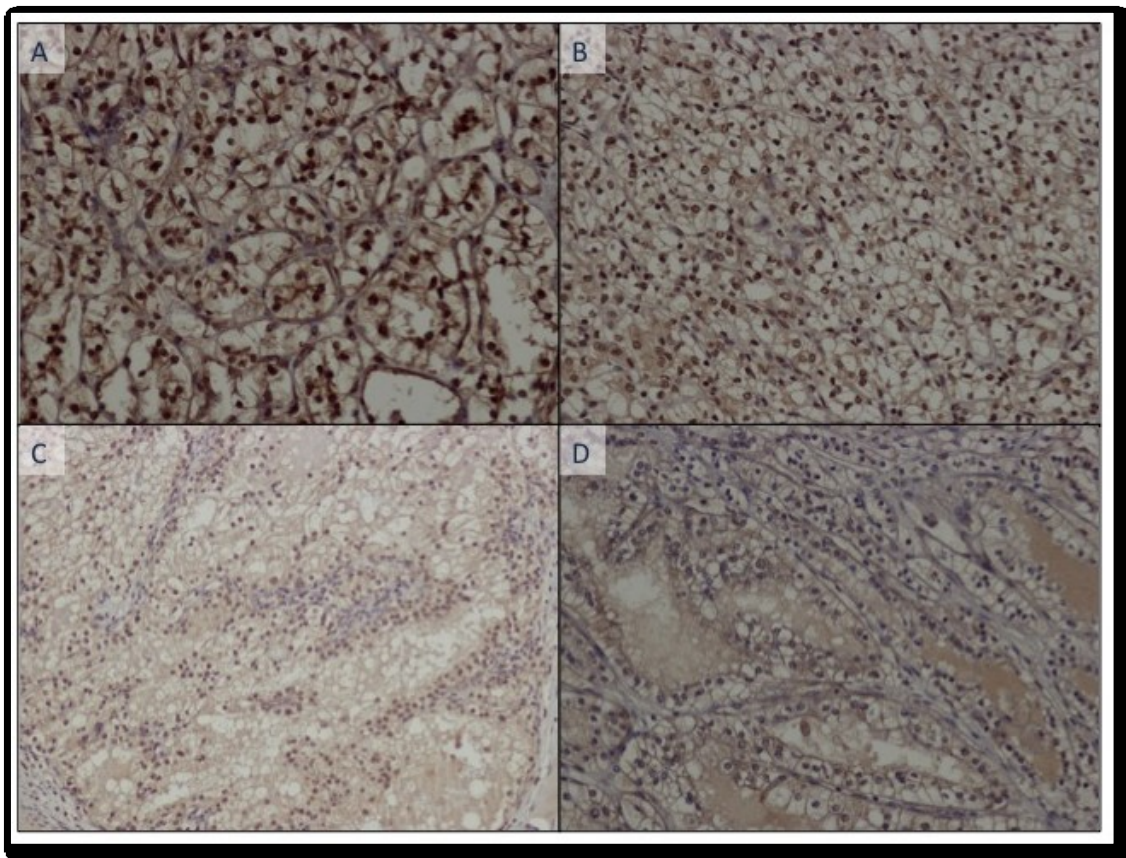


Figura 17. Expresión de HIF-1 α por inmunohistoquímica. A: Intenso (+3); B: Moderado (+2); C: Leve (+1); D: Negativo

La gran mayoría de los casos, 42 (89,4 %), fueron positivos para HIF-1 α .

La expresión de HIF-1 α no correlacionó de forma estadísticamente significativa con el sexo, clínica, localización, lateralidad, en definitiva con ninguna de las variables clínicas, tal y como puede observarse en la tabla 28.

HIF-1 α IHQ												
		Negativo		<10% células		10-50% células		>50% células		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Sexo	Varón	3	60	7	77,8	4	50	17	68	31	66	n.s.
	Mujer	2	40	2	22,2	4	50	8	32	16	34	
	TOTAL	5	100	9	100	8	100	25	100	47	100	
Lateralidad	Derecho	2	40	5	55,6	3	37,5	14	56	24	51,1	n.s.
	Izquierdo	3	60	4	44,4	5	62,5	11	44	23	48,9	
	TOTAL	5	100	9	100	8	100	25	100	47	100	
Localización	Mesorrenal	4	80	7	77,8	5	62,5	14	56	30	63,8	n.s.
	Polo superior	1	20	1	11,1	1	12,5	5	20	8	17	
	Polo inferior	0	0	1	11,1	2	25	6	24	9	19,1	
	TOTAL	5	100	9	100	8	100	25	100	47	100	
Clínica	Hematuria	1	20	1	11,1	1	12,5	4	16	7	14,9	n.s.
	Dolor	1	20	1	11,1	2	25	2	8	6	14,8	
	Incidental	1	20	3	33,3	3	37,5	16	64	23	48,9	
	Otros	2	40	4	44,4	2	25	3	12	11	23,4	
	TOTAL	5	100	9	100	8	100	25	100	47	100	

Tabla 28. Relación entre la expresión de HIF-1 α mediante inmunohistoquímica y los parámetros clínicos.

Como se muestra en la tabla 29, al relacionar la expresión de HIF-1 α con el grado nuclear de Fuhrman se observó que todos los casos cuya expresión era negativa correspondían a grados más altos ya que los únicos 5 casos negativos correspondían a grados 3 y 4.

4 RESULTADOS

HIF-1 α IHQ												
		Negativo		<10% células		10-50% células		>50% células		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Grado de Fuhrman	Grados 1 y 2	0	0	3	33,3	4	50	18	72	25	53,2	0,014
	Grados 3 y 4	5	100	6	66,7	4	50	7	28	22	46,8	
	TOTAL	5	100	9	100	8	100	25	100	47	100	
Estadio pT	pT1a	0	0	1	11,1	2	25	6	24	9	19,1	n.s.
	pT1b	1	20	2	22,2	1	12,5	8	32	12	25,5	
	pT2	3	60	3	33,3	1	12,5	6	24	13	27,7	
	pT3a	0	0	1	11,1	2	25	4	16	7	14,9	
	pT3b	1	20	2	22,2	2	25	1	4	6	12,8	
	TOTAL	5	100	9	100	8	100	25	100	47	100	
Estadio pN	pNx	4	80	7	77,8	8	100	22	88	41	87,2	n.s.
	pN0	1	20	2	22,2	0	0	3	12	6	12,8	
	TOTAL	5	100	9	100	8	100	25	100	47	100	
Estadio pM	pMx	1	20	1	11,1	2	25	9	36	13	27,7	n.s.
	pM0	1	20	3	33,3	2	25	11	44	17	36,2	
	pM1	3	60	5	55,6	4	50	5	20	17	36,2	
	TOTAL	5	100	9	100	8	100	25	100	47	100	
Estadio TNM	I	0	0	2	22,2	3	37,5	13	52	18	38,3	n.s.
	II	2	40	2	22,2	1	12,5	5	20	10	21,3	
	III	0	0	0	0	0	0	2	8	2	4,3	
	IV	3	60	5	55,6	4	50	5	20	17	36,2	
	TOTAL	5	100	9	100	8	100	25	100	47	100	

Tabla 29. Relación entre los parámetros patológicos y la expresión de HIF-1 α mediante inmunohistoquímica.

Las alteraciones del gen *VHL* se distribuyeron de forma similar entre los casos que expresaban HIF-1 α , de los 5 casos que no expresaban HIF-1 α 4 de ellos no presentaron alteraciones en el gen *VHL*, pero este hecho no fue estadísticamente significativo ($p > 0,05$). Tabla 30.

Alteración de <i>VHL</i> (metilación y/o mutación)					
			Alterado	No alterado	Total
EXPRESIÓN HIF-1 α	Negativo	Frec.	1	4	5
		%	5,3	14,8	10,9
	Positivo	Frec.	18	23	41
		%	94,7	85,2	89,1
	Total	Frec.	19	27	46
		%	100	100	100

Tabla 30.- Relación entre las alteraciones de *VHL* (mutado, hipermetilado o ambas) y la expresión de HIF-1 α .

4.5.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA VEGF

Se analizó la expresión de VEGF en tejido tumoral de 47 pacientes diagnosticados de CCRCC mediante la técnica de inmunohistoquímica. En la figura 18 se muestra una imagen representativa de las distintas intensidades de expresión que se encontraron en la inmunohistoquímica de VEGF.

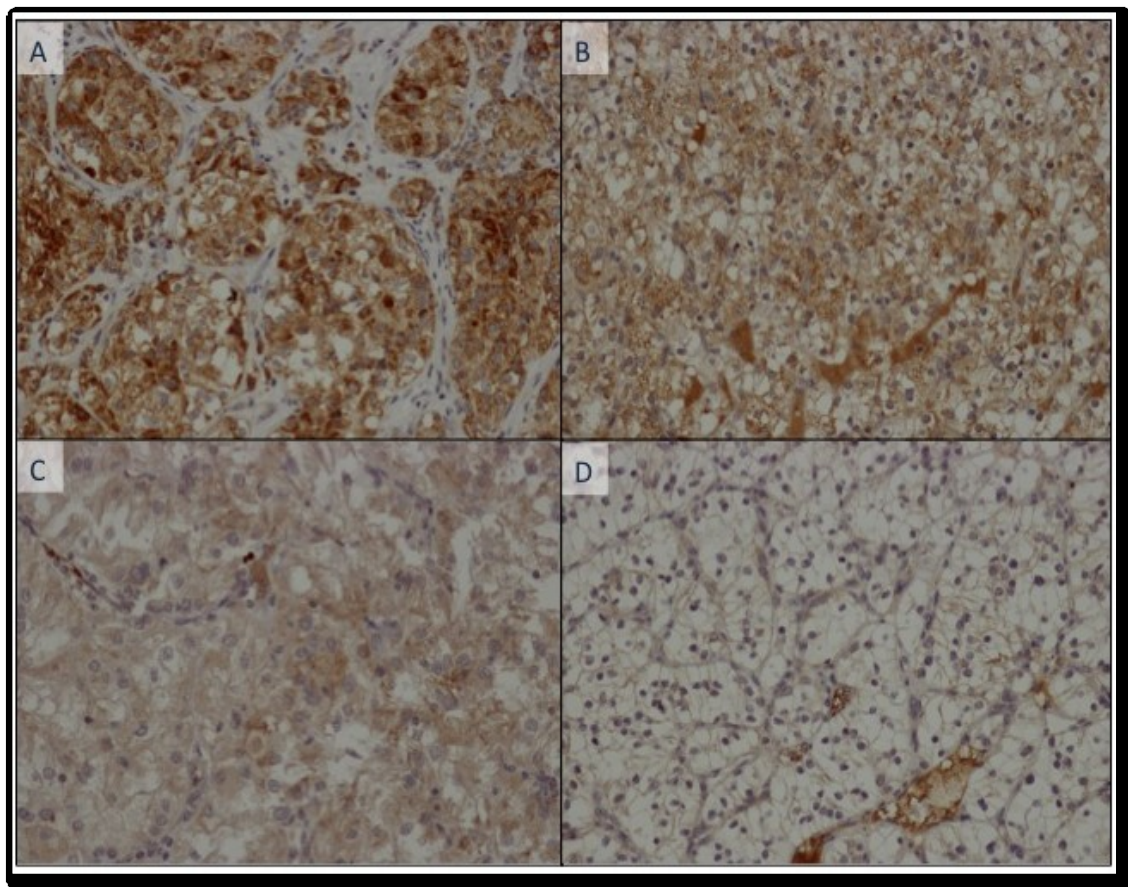


Figura 18. Expresión de VEGF por inmunohistoquímica. A: Intenso (+3); B: Moderado (+2); C: Leve (+1); D: Negativo

Se encontraron 16 (34%) casos negativos y 31 (66%) positivos.

4 RESULTADOS

Al correlacionar los resultados obtenidos en esta técnica con los diferentes parámetros clínicos, no se halló relación estadísticamente significativa entre el sexo, clínica o localización con la expresión de VEGF. (Tabla 31).

VEGF IHQ								
		Negativo		Positivo		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Sexo	Varón	9	29	22	71	31	100	n.s.
	Mujer	7	43,8	9	56,3	16	100	
	TOTAL	16	34	31	66	47	100	
Lateralidad	Derecho	8	33,3	16	66,7	24	100	n.s.
	izquierdo	8	34,8	15	65,2	23	100	
	TOTAL	16	34	31	66	47	100	
Localización	Mesorrenal	10	33,3	20	66,7	30	100	n.s.
	polo superior	3	37,5	5	62,5	8	100	
	polo inferior	3	33,3	6	66,7	9	100	
	TOTAL	16	34	31	66	47	100	
Clínica	Hematuria	2	28,6	5	71,4	7	100	n.s.
	Dolor	2	33,3	4	66,7	6	100	
	Incidental	10	43,5	13	56,5	23	100	
	Otros	2	18,2	9	81,8	11	100	
	TOTAL	16	34	31	66	47	100	

Tabla 31.- Relación entre la expresión de VEGF por inmunohistoquímica y los parámetros clínicos.

En cuanto al grado de Fuhrman, como se puede observar en la tabla 32, en grados más avanzados se daba un mayor número de casos en los que la expresión de VEGF era positiva que en los casos que no expresaron la proteína, no viéndose esta diferencia en grados nucleares bajos.

VEGF IHQ								
		Negativo		Positivo		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Grado de Fuhrman	Grados 1 y 2	12	48	13	52	25	100	0,031
	Grados 3 y 4	4	18,2	18	81,8	22	100	
	TOTAL	16	34	31	66	47	100	
Estadio pT	pT1a	3	33,3	6	66,7	9	100	n.s.
	pT1b	5	41,7	7	58,3	12	100	
	pT2	6	46,2	7	53,8	13	100	
	pT3a	2	28,6	5	71,4	7	100	
	pT3b	0	0	6	100	6	100	
	TOTAL	16	34	31	66	47	100	
Estadio pN	pNx	14	34,1	27	65,9	41	100	n.s.
	pN0	2	33,3	4	66,7	6	100	
	TOTAL	16	34	31	66	47	100	
Estadio pM	pMx	5	38,5	8	61,5	13	100	0,037
	pM0	9	52,9	8	47,1	17	100	
	pM1	2	11,8	15	88,2	17	100	
	TOTAL	16	34	31	66	47	100	
Estadio TNM	I	8	44,4	10	55,6	18	100	0,034
	II	4	40	6	60	10	100	
	III	2	100	0	0	2	100	
	IV	2	11,8	15	88,2	17	100	
	TOTAL	16	34	31	66	47	100	

Tabla 32. Relación entre la expresión de VEGF por inmunohistoquímica y los diferentes parámetros patológicos.

También se relacionó la expresión de VEGF con la presencia de metástasis a distancia, donde se comprobó con significación estadística ($p=0,04$) que había una mayor expresión de la proteína en casos con metástasis, en concreto el 88,2% de los pacientes con metástasis expresaron VEGF (véase tabla 32).

4 RESULTADOS

Finalmente se determinó, al relacionar la expresión de VEGF con el estadio TNM, que la mayor parte de los casos con estadio más avanzado (estadio IV) expresaban la proteína, ya que como se observa en la tabla 32, de los 17 casos analizados en estadio IV, 15 expresaron VEGF (88,2%) y únicamente 2 casos (11,8%) no ($p=0,034$). Estas diferencias no se hallaron en el resto de estadios.

La mayor parte (64,4%) de los CA-IX positivos por inmunohistoquímica y por western blot (65,5%) fueron también positivos para VEGF; aunque este hecho no fue estadísticamente significativo.

Se objetivó también que alteraciones en el estatus genético y epigenético de *VHL* no tenían un efecto estadísticamente significativo sobre VEGF ($p>0,05$). Véase tabla 33.

Alteración de <i>VHL</i> (metilación y/o mutación)					
			Alterado	No alterado	Total
EXPRESIÓN VEGF	Negativo	Frecuencia	6	9	15
		%	31,6	33,3	32,6
	Positivo	Frecuencia	13	18	31
		%	68,4	66,7	67,4
	Total	Frecuencia	19	27	46
		%	100	100	100

Tabla 33.- Relación entre las alteraciones de *VHL* (mutado, hipermetilado o ambas) y la expresión de VEGF.

4.6.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA ERK5

Se analizó esta proteína en las muestras de tejido tumoral y parénquima renal sano de los 50 casos de CCRCC. Se comparó la expresión de la proteína ERK5 en el tejido tumoral con la expresión en el tejido sano. Al realizar este análisis se valoró el número de casos y el porcentaje en el que sobreexpresan (la expresión de la proteína en el tumor es mayor en la muestra tumoral que en el tejido sano) o infraexpresan (expresión de la proteína menor en el tumor que en el tejido sano, o en los casos en los que la expresión es igual). En el 58% (29 casos) de tumores la proteína ERK5 estaba sobreexpresada en el tumor y en un 42% (21 casos) la proteína estaba igual o más baja en el tumor que en el parénquima renal sano. En la figura 19 se pueden observar diferentes estados de expresión de la proteína ERK5 por western blot al comparar muestras de tejido tumoral con parénquima renal sano de una serie de pacientes analizados.

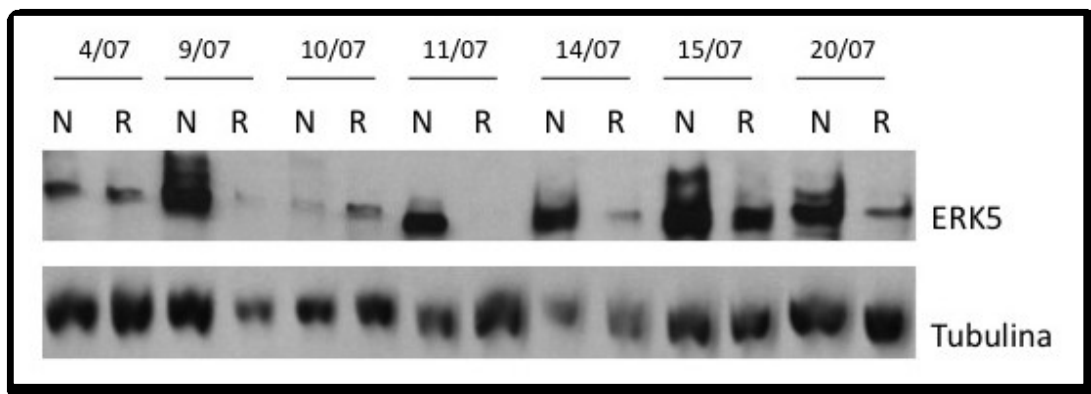


Figura 19. Imagen representativa de la expresión de la proteína ERK5 mediante la técnica de western blot en una serie de tumores de CCRCC. N: Muestra tumoral, R: parénquima renal sano.

Como puede observarse en la tabla 34, no se halló relación estadísticamente significativa al correlacionar la expresión de ERK5 con las variables clínicas pero sí con variables anatomopatológicas. Se halló correlación estadísticamente significativa con el estadio TNM ($p=0,04$) en dicho estudio. Como se puede observar en la tabla 35 de los 19 casos que se encontraban en el estadio más avanzado (estadio IV) 15 tumores sobreexpresaban ERK5.

Expresión de ERK 5 por WB								
		Sobreexpresada		No sobreexpresada		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Sexo	Varón	22	64,7	12	35,3	34	100	n.s.
	Mujer	7	43,8	9	56,3	16	100	
	TOTAL	29	58	21	42	50	100	
Lateralidad	Derecho	15	62,5	9	37,5	24	100	n.s.
	Izquierdo	14	53,8	12	46,2	26	100	
	TOTAL	29	58	21	42	50	100	
Localización	Mesorrenal	19	59,4	13	40,6	32	100	n.s.
	Polo superior	6	66,7	3	33,3	9	100	
	Polo inferior	4	44,4	5	55,6	9	100	
	TOTAL	29	58	21	42	50	100	
Clínica	Hematuria	4	57,1	3	42,9	7	100	n.s.
	Dolor	5	71,4	2	28,6	7	100	
	Incidental	12	50	12	50	24	100	
	Otros	8	66,7	4	33,3	12	100	
	TOTAL	29	58	21	42	50	100	

Tabla 34. Relación entre la expresión de ERK5 por western blot con datos clínicos.

También se halló significación estadística ($p=0,03$) al relacionar la expresión de ERK5 con la presencia de metástasis a distancia, viéndose que la sobreexpresión de ERK5 estaba ligada a la presencia de metástasis, ya que la mayoría de los tumores metastásicos (78,9%) presentaron positividad a ERK5 (tabla 35).

Expresión de ERK 5 por WB								
		Sobreexpresa		No sobreexpresa		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Grado de Fuhrman	Grados 1 y 2	12	48	13	52	25	100	n.s.
	Grados 3 y 4	17	68	8	32	25	100	
	TOTAL	29	58	21	42	50	100	
Estadio pT	pT1a	5	55,6	4	44,4	9	100	n.s.
	pT1b	6	46,2	7	53,8	13	100	
	pT2	7	53,8	6	46,2	13	100	
	pT3a	5	62,5	3	37,5	8	100	
	pT3b	6	85,7	1	14,3	7	100	
	TOTAL	29	58	21	42	50	100	
Estadio pN	pNx	25	56,8	19	43,2	44	100	n.s.
	pN0	4	66,7	2	33,3	6	100	
	TOTAL	29	58	21	42	50	100	
Estadio pM	pMx	8	57,1	6	42,9	14	100	0,03
	pM0	6	35,3	11	64,7	17	100	
	pM1	15	78,9	4	21,1	19	100	
	TOTAL	29	58	21	42	50	100	
Estadio TNM	I	8	42,1	11	57,9	19	100	0,043
	II	6	60	4	40	10	100	
	III	0	0	2	100	2	100	
	IV	15	78,9	4	21,1	19	100	
	TOTAL	29	58	21	42	50	100	

Tabla 35. Relación entre la expresión de ERK5 por western blot parámetros patológicos.

Al relacionar la expresión de ERK5 con la expresión de la proteína VHL se observó que todos los tumores que no expresaban VHL tenían sobreexpresada la proteína ERK5 (p=0,009). (Véase tabla 36).

4 RESULTADOS

Expresión de ERK 5 por WB								
		Sobreexpresa		No sobreexpresa		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
VHL IHQ	Negativo	8	100	0	0	8	100	0,009
	Expresión (baja, moderada o alta)	21	50	21	50	42	100	
	TOTAL	29	58	21	42	50	100	

Tabla 36. Relación entre la expresión de ERK5 por western blot con la expresión de VHL por inmunohistoquímica

En cambio no se observó relación alguna entre alteraciones a nivel genético y epigenético del gen *VHL* con la expresión de ERK5. (Tabla 37).

Alteración de <i>VHL</i> (metilación y/o mutación)					
			Alterado	No alterado	Total
ERK 5 recodificado	Sobreexpresa	Frecuencia	12	14	26
		%	63,2	51,9	56,5
	No sobreexpresa	Frecuencia	7	13	20
		%	36,8	48,1	43,5
	Total	Frecuencia	19	27	46
		%	100	100	100

Tabla 37.- Relación entre las alteraciones de VHL (mutado, hipermetilado o ambas) y la expresión de ERK5 .

Finalmente, al correlacionar la expresión de ERK5 con la expresión de VEGF, se vio que la mayor parte de los tumores que expresan VEGF sobreexpresan ERK5, 21 de 31 casos positivos para VEGF sobreexpresan ERK5. (Tabla 38).

Expresión de ERK 5 por WB								
		Sobreexpresa		No sobreexpresa		TOTAL		P
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
VEGF IHQ	Negativo	5	31,3	11	68,8	16	100	0,017
	Positivo	21	67,7	10	32,3	31	100	
	TOTAL	26	55,3	21	44,7	47	100	

Tabla 38. Relación entre la expresión de ERK5 por western blot con la expresión de VEGF por inmunohistoquímica.

4.7.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA ERK1/2

Al realizar el estudio de expresión de las proteínas ERK1/2 a las 50 muestras de CCRCC, el 94% (47 casos) presentaba una expresión similar en el tejido tumoral y en el parénquima renal sano (tabla 39). En la figura 20 se muestra un ejemplo representativo de ello. Al darse el mismo resultado en prácticamente la totalidad de los casos estudiados, no se encontró asociación estadística con el resto de parámetros clínicos y moleculares a estudiar.

ERK1/2 WB		
	Frecuencia	%
Sobreexpresa	3	6
Igual	47	94
Total	50	100

Tabla 39.- Frecuencia y porcentaje de expresión de ERK 1/2 por western blot.

4 RESULTADOS

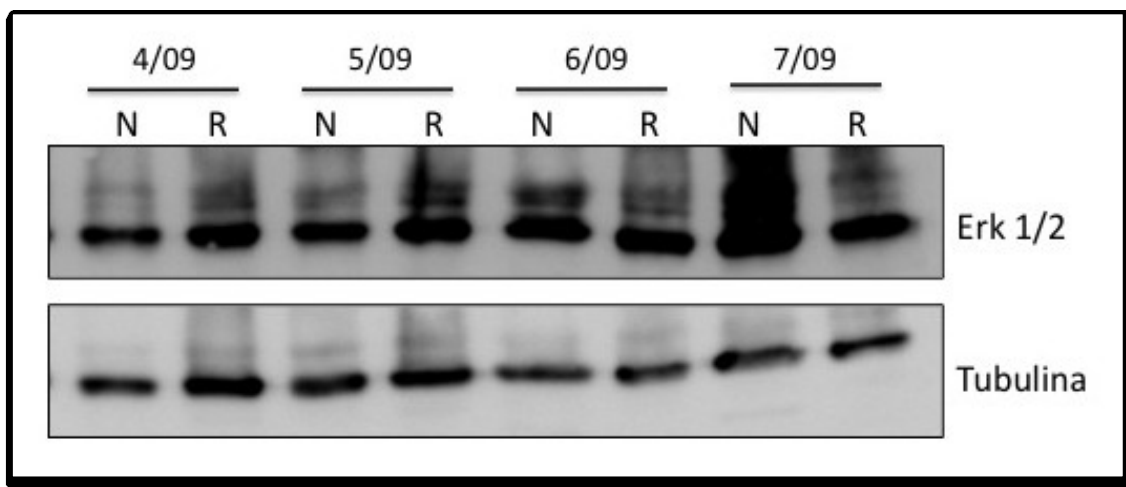


Figura 20. Imagen representativa de la expresión de las proteínas ERK1/2 mediante la técnica de western blot en una serie de tumores de CCRCC. N: Muestra tumoral, R: parénquima renal sano.

4.8.- ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE REGRESIÓN LOGÍSTICA

En el análisis de regresión logística realizado para valorar el efecto de las distintas variables independientes estudiadas sobre la existencia de metástasis en el momento del diagnóstico, la única variable que permaneció en el modelo fue la expresión de VEGF. En este análisis se observó un porcentaje de bien clasificados del 67,5% (sensibilidad 54,2% y especificidad 87,5%). Según estos datos, la existencia de metástasis en pacientes con CCRCC es 8,27 veces mayor en los enfermos que expresan VEGF en relación a los que no lo expresan ($p=0,014$). Este modelo explicaría el 23,9% de la incertidumbre de los datos (R^2 de Nagelkerke= 0,239)

La tabla 40 muestra los coeficientes y la *odds ratio* (OR) para esta variable.

VARIABLE	COEFICIENTE	P	OR	IC 95%
VEGF	2,113	0,014	8,273	1,534 - 44,618
CONSTANTE	-1,872	0,014	0,154	

Tabla 40.- Variables asociadas en el modelo de regresión logística con la existencia de metástasis.

DISCUSIÓN **5**

5.1 COMENTARIOS AL MÉTODO

5.1.1 TIPO DE ESTUDIO.

Este trabajo constituye un estudio molecular completo de la ruta de VHL en muestras de tejido tumoral y parénquima renal sano de pacientes diagnosticados de carcinoma renal de células renales de aparición esporádica. Si anteriormente se han publicado trabajos con características similares a nivel mundial, éste representa el primer estudio realizado sobre población española. En éste estudio se han seleccionado de manera consecutiva 76 pacientes diagnosticados de CCR esporádico del área de cobertura sanitaria del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (400.000 habitantes aproximadamente). Se pretendía, por tanto, conocer en una muestra poblacional representativa y no estudiada, el estatus de la ruta de VHL, analizando, tanto a nivel genético (mutacional) y epigenético el estatus del gen *VHL*, así como analizar la expresión de VHL y sus proteínas diana HIF-1 α , CA-IX y VEGF.

Tras comprobar por western blot e inmunohistoquímica que únicamente expresaban la proteína CA-IX las muestras de CCRCC, (hecho que indica que las que no lo expresan no poseen ninguna alteración en la ruta de la proteína VHL) se redujo el muestreo a 50 pacientes (los diagnosticados de CCRCC), ya que sería en este grupo de pacientes en los que podríamos encontrar cualquier disfunción de la ruta.

Los datos en los que se basa este estudio proceden de dos fuentes fundamentales: en primer lugar las historias clínicas de los pacientes, las cuales se

5 DISCUSIÓN

encuentran archivadas y organizadas en el Servicio de Archivos Generales del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete y, en segundo lugar, las muestras de tejido tumoral renal y de parénquima renal sano, de las que enviamos un fragmento al Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete para su análisis histopatológico y conservamos otro fragmento para su análisis molecular por medio de las distintas técnicas utilizadas, que se realizó en diferentes lugares:

- En el laboratorio de Oncología Molecular de la Facultad de Medicina de Albacete (CRIB/UCLM) realizamos la extracción de ADN, amplificación del mismo por medio de la técnica de PCR, purificación del producto de PCR.
- La reacción de secuenciación y purificación de la misma así como la secuenciación automática se realizó en el servicio de secuenciación del CNIO en Madrid.
- En el laboratorio de epigenética y genotipado (Plataforma Sequenom) de la Universidad de Valencia, se realizó el estudio epigenético de los ADN extraídos en el laboratorio de Oncología Molecular de la Facultad de Medicina de Albacete, siendo en este último donde se realizó el análisis de los resultados.
- En el laboratorio de Oncología Molecular también se realizó la extracción de proteína de las muestras y se realizaron los western blots de las mismas.
- En la Unidad de Investigación y en el servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete se realizó la técnica de inmunohistoquímica de las distintas proteínas.

La obtención de datos de la primera fuente no ocasionó problemas relevantes ya que, al tratarse de un estudio transversal, se completaban los cuestionarios de recogida de datos el día del ingreso hospitalario del paciente para la realización de la cirugía, y al disponer del historial clínico completo del paciente, se pudieron recoger todos los datos necesarios, incluso del pasado de su enfermedad.

En cuanto a la obtención de las muestras de tejido tras el consentimiento informado y una vez extraída la pieza quirúrgica, se obtuvo de la misma una porción de muestra tumoral suficiente para el tratamiento en el laboratorio. Para ello, se procuró obtener tejido que macroscópicamente no presentara aspecto necrótico o hemorrágico, y en cantidad suficiente para su tratamiento posterior en el laboratorio, sin comprometer la muestra requerida por el patólogo para realizar el diagnóstico histopatológico. Asimismo, se obtuvo una pequeña porción de tejido macroscópicamente sano, que en el caso de las nefrectomías radicales se extrajo del parénquima renal más alejado del tumor y en las nefrectomías parciales del margen de seguridad de parénquima sano, también lo más alejado posible del tumor. Las muestras una vez obtenidas fueron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

El resto del espécimen quirúrgico se envió al Servicio de Anatomía Patológica para su estudio. Cuando se dispuso de los datos concernientes al estudio histopatológico del tumor, se aplicó la clasificación correspondiente a la UICC,⁽⁹⁹⁾ con objeto de equiparar al máximo posible los datos, partiendo de la descripción macroscópica y microscópica de las muestras obtenidas.

5.1.2.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES DE LA MUESTRA

Aunque puede aparecer a cualquier edad, alrededor del 80% de los casos de cáncer renal se dan en pacientes con edades comprendidas entre los 50 y 70 años, con un pico de incidencia en la sexta década de la vida.^(100,101) Es más frecuente en varones que en mujeres, con una relación que oscila entre 1,6 y 2 a 1⁽¹⁰²⁾. En el presente estudio la edad media se situó en 64,1 años, afectando en un 68,4% a hombres y en un 31,6% a mujeres, lo que concuerda con la literatura consultada.

5.1.2.1.- MOTIVO DE CONSULTA DE LOS PACIENTES

En los últimos años se ha producido un incremento en la incidencia del cáncer renal. Este incremento se debe, en parte, al aumento del uso de técnicas de imagen,

5 DISCUSIÓN

por lo que hoy en día los tumores renales se diagnostican de manera más precoz, cuando todavía no han presentado ninguna sintomatología y, por tanto, habitualmente son de menor tamaño, lo que les confiere un mejor pronóstico.^(102,103) Más de la mitad de los pacientes de este estudio (55,9%) fueron diagnosticados de manera incidental, lo que apoya la confirmación de esta tendencia. La segunda causa más frecuente fue la hematuria.

5.1.2.2.- LOCALIZACIÓN TUMORAL Y TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES

En cuanto al tipo de tratamiento realizado, se practicaron cirugías conservadoras electivas en enfermos en los que la localización tumoral, el tamaño tumoral y el estadio clínico lo permitieron.⁽¹⁰⁴⁾ Así, en el 15,8% de los casos de nuestro estudio se realizó nefrectomía parcial con margen de parénquima renal sano. No obstante, la nefrectomía radical fue la opción quirúrgica mayoritaria (84,2%).

La cirugía abierta ha sido la técnica de referencia desde 1962, cuando Robson marcó unas directrices que han permanecido durante décadas hasta la aparición de la laparoscopia. En nuestro estudio esta técnica representa el 27,6%, porcentaje bajo en relación con los datos actuales. En el periodo de recogida de muestras del estudio coincidió con el inicio de implantación de esta técnica en el servicio de Urología del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, lo cual justifica este porcentaje relativamente bajo.

La primera nefrectomía laparoscópica fue realizada por Clayman en 1990. Desde entonces, ha ido sustituyendo progresivamente al abordaje clásico a cielo abierto en el tratamiento quirúrgico del tumor renal. Se considera la técnica de elección en el tratamiento del cáncer renal en estadios T1 y T2. Los beneficios reportados para este tipo de técnica incluyen : una disminución en el dolor postoperatorio, una menor permanencia en el hospital y una más rápida convalecencia. Aun así, existen límites que están relacionados con las características del paciente, las características (tamaño y localización) del tumor y la experiencia del cirujano.⁽¹⁰⁵⁾

5.1.2.3.- ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Con un porcentaje del 70% el carcinoma renal de células claras es el subtipo histológico más frecuente de los CCR.^(12,106)

De los 76 casos que se estudiaron inicialmente en este trabajo, el 65,8% (50 casos) fueron carcinomas de células claras; esto es similar a lo encontrado en la literatura. Este tipo de tumor es el de peor pronóstico de todas las variantes celulares, si bien, dicho pronóstico mejora con el diagnóstico precoz.⁽¹⁰⁷⁾

Según la distribución clásica encontrada en la bibliografía, lo habitual es que la variante papilar sea la segunda en frecuencia, con un porcentaje aproximado de entre el 10%⁽¹⁰⁸⁾ y el 15%,^(12,16) pero en este trabajo el segundo subtipo de CCR encontrado fue el de la variante cromófoba con un 17,1% (13 casos), encontrándose el subtipo papilar únicamente en 3 casos, lo que nos lleva a opinar que en los últimos años haya un cambio en esta tendencia ya que recientemente se ha descrito un incremento en el diagnóstico de la variante cromófoba.^(16,107) Nuestros datos apoyan este hecho.

5.1.2.4.- GRADO NUCLEAR

El grado nuclear constituye el factor pronóstico más importante después del tipo histológico y del estadio tumoral.⁽¹⁰⁹⁾ En consonancia con otras series⁽¹¹⁰⁾ el grado nuclear más frecuentemente hallado en los carcinomas de células claras fue el grado 2. Actualmente se debate sobre la necesidad de cambiar el sistema de graduación uniendo los grados 1 y 2,⁽¹¹¹⁾ ya que parece ser que la influencia pronóstica del grado nuclear es más significativa cuando se agrupan los tumores bien diferenciados (G1 y G2 de Fuhrman) y los tumores indiferenciados (G3 y G4 de Fuhrman).⁽¹¹²⁾

5.1.2.5.- ESTADIO TUMORAL SEGÚN LA CLASIFICACIÓN TNM

La extensión tumoral es el más importante de los posibles factores pronósticos del cáncer renal. En el CCR la clasificación más utilizada es la TNM.⁽¹⁸⁾

Siguiendo la clasificación TNM,⁽¹⁹⁾ se obtuvo una mayoría de estadios inferiores a pT2. Esto concuerda con que a su vez se hayan encontrado un mayor número de casos en los que el hallazgo fue incidental, asintomáticos, pues tumores de bajo grado no suelen estar acompañados de clínica en pacientes. En línea con lo publicado, el estadio más frecuente fue pT1b con un 34,2%.

En cuanto al estadio pN, sólo fue evaluado en 6 casos ya que no se realizó linfadenectomía en todos los pacientes. El papel de la linfadenectomía en el cáncer renal continúa siendo un tema de discusión hoy en día ya que no se ha demostrado claramente que mejore la supervivencia. Además, no hay acuerdo en cuál debe ser su extensión y, aunque no se han demostrado diferencias en morbilidad entre realizar linfadenectomía o no, la mayoría de los autores la consideran un técnica quirúrgica con un gran riesgo potencial de complicaciones intraoperatorias.⁽¹¹³⁾ Los seis casos sometidos a linfadenectomía fueron estadios pN0.

La presencia de metástasis a distancia (estadio pM) implica muy mal pronóstico, aun así, se puede encontrar tumores que han metastatizado y presentan largas supervivencias.⁽¹¹⁴⁾ En este estudio, los pacientes que presentaron metástasis al diagnóstico tuvieron tumores que se manifestaron clínicamente en todos los casos excepto en dos. La mayoría de los casos presentaron grados nucleares altos.

Las metástasis halladas en este estudio fueron fundamentalmente pulmonares, hepáticas y suprarrenales. El carcinoma de células renales tiene el potencial de metastatizar a prácticamente cualquier parte del cuerpo.⁽¹¹⁵⁾ Los órganos a los que afecta más frecuentemente son el pulmón, el hueso, el cerebro, las suprarrenales, el riñón contralateral o el hígado. Aproximadamente el 30% de los pacientes tienen metástasis al momento del diagnóstico y otro 30% la desarrollará después de la nefrectomía.⁽¹¹⁶⁾

5.1.3.- ESTUDIO GENÉTICO DE LAS MUESTRAS

5.1.3.1.- OBTENCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Para el análisis molecular es necesario un cuidadoso manejo de las muestras utilizadas ya que la inadecuada manipulación de las mismas podría llevar a la degradación o pérdida de un material procedente de un tipo de tumor de relativa o escasa incidencia. Además, la utilización de un tejido sólido puede ocasionar dificultades tanto en la obtención como en el procesado y purificación del ADN y en concreto el tumor renal presenta una gran heterogeneidad en su estructura pudiendo presentar zonas hemorrágicas o necróticas que hay que evitar para su procesado lo que, en ocasiones, dio lugar a dificultades en el tratamiento de las muestras.

Una vez obtenido el ADN de cada una de las muestras (ADN problema), se sometía al amplificado de cada uno de los exones que conforman el gen *VHL* mediante la técnica de PCR. Para obtener un producto de amplificado de características idóneas la técnica de PCR debe ponerse a punto mediante múltiples ajustes tanto en los tiempos como en la temperatura de cada uno de los pasos de dicha reacción, así como en las cantidades de cada uno de los reactivos utilizados (dNTPs, Taq ADN polimerasa, cebadores, tampones y ADN problema).

Los cebadores se diseñaron con una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos y su localización fue intrónica con el objeto de obtener productos de amplificado que contuvieran cada uno de los tres exones del gen. De este modo, en el producto de PCR se conseguía el exón completo y pequeños fragmentos de los intrones adyacentes, por lo que fue posible detectar anomalías en los nucleótidos de estos fragmentos intrónicos.

En cuanto a la secuenciación del gen, y en concreto al exón 1, se utilizó un cebador intraexónico, aparte de los dos intrónicos, para obtener una correcta lectura de la secuencia completa del exón ya que, debido a su gran tamaño, esta labor en

5 DISCUSIÓN

ocasiones era dificultosa en algunas regiones. En algunos trabajos está descrito realizar más de una PCR para obtener amplificadores del exón 1 en partes.⁽⁹⁷⁾

Debido a la gran sensibilidad de la PCR, uno de los mayores problemas que surgen al usar esta técnica es la contaminación. Se deben extremar las precauciones para evitarla⁽¹¹⁷⁾ y es necesario comprobar tanto la integridad del producto de PCR como la ausencia de contaminación, para evitar falsos positivos.

Con objeto de obtener un producto de PCR lo más libre posible de contaminantes y agentes inespecíficos que entorpecieran la posterior secuenciación, se realizó purificación de dicha reacción y posterior comprobación de su cantidad y calidad mediante electroforesis en gel de agarosa. Esta purificación elimina los restos de nucleótidos no usados en la PCR y otros agentes que a la hora de la secuenciación pudieran entorpecer su lectura.

5.1.3.2.-ANÁLISIS POR SECUENCIACIÓN DEL GEN *VHL*

Se realizó secuenciación automática de los productos de PCR de cada uno de los tres exones del gen *VHL* obtenidos de todas las muestras tumorales que constituyen este estudio. Mediante esta técnica se pretendía detectar mutaciones en el gen *VHL* a través de la comparación de la secuencia de ADN obtenida de cada paciente con la secuencia original. La secuenciación constituye la herramienta más precisa para la detección de alteraciones genómicas y proporciona una excelente calidad de lectura que, en la mayoría de los casos, alcanza una fiabilidad superior al 98%. Sin embargo, precisa de una comprobación final puesto que el éxito de cada proceso de secuenciación de ADN es directamente proporcional a la calidad y pureza de la muestra,⁽¹¹⁸⁾ por lo que fue necesario incorporar un paso de purificación de la reacción de secuenciación, antes de ser analizada en el secuenciador.

Cuando se detectaba una anomalía en una secuencia, no se consideraba como mutación hasta que no se confirmaba mediante secuenciación de la cadena complementaria. Si dicha anomalía aparecía de nuevo, se consideraba mutación, mientras que era descartada si la secuencia aparecía normal. Con esta rutina se

pretendió eliminar al máximo los posibles errores en la lectura de las secuencias, así como estar completamente seguros de que las mutaciones encontradas eran tales, pudiendo descartar así la existencia de falsos positivos y falsos negativos. Barnabas y cols.⁽¹¹⁹⁾ en un estudio sobre 67 tumores renales encuentra 5 patrones anómalos en la secuenciación que no se pudieron confirmar mediante secuenciación en el sentido opuesto. No es generalizada la realización de doble secuenciación de comprobación, que da lugar a una sensibilidad muy cercana al 100% en las mutaciones encontradas,⁽¹²⁰⁾ en este estudio consideramos que era necesaria la doble secuenciación para aumentar la sensibilidad.

5.1.3.3.-ANÁLISIS POR METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *VHL*

La metilación del ADN es una modificación epigenética del genoma donde un grupo metilo (CH₃) se une covalentemente a la posición 5 del anillo pirimidínico de la citosina (5-MeC), esto ocurre generalmente en un entorno rico en dinucleótidos 5'-CpG-3' (sitios CpG). Estos sitios CpG se concentran a menudo en distintas áreas del genoma ricas en citosinas y guaninas a las que denominamos islas CpG. El estado de metilación de los sitios CpG puede afectar a la estructura de la cromatina y a la actividad transcripcional del gen asociado, por lo que tiene un papel importante en cáncer.⁽¹²¹⁾

La mejor técnica para la determinación y cuantificación del estado de metilación de un área de genómica en la resolución de un solo nucleótido, es el análisis de la secuencia después de la conversión por bisulfito. Este método se basa en la capacidad de bisulfito sódico de cambiar residuos de citosina de manera eficiente a uracilo en el ADN de una sola cadena, no pudiendo hacer esto cuando las citosinas están metiladas (5-MeC). Después de la amplificación por PCR todos los residuos de uracilos y timinas son amplificados como timinas (T) y solo los residuos 5-MeC son amplificados como citosina (C).⁽¹²²⁾

5 DISCUSIÓN

Al igual que en el caso de la secuenciación, la calidad del ADN es directamente proporcional a la calidad y pureza de la muestra, por lo que es necesaria la previa purificación del mismo antes de su procesado. La posterior secuenciación de los productos de PCR amplificados ofrece información detallada sobre todos los sitios CpG en la región amplificada.

5.1.3.4.-ANÁLISIS POR INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS VHL, CA-IX, HIF-1 α Y VEGF.

Se realizó el análisis de inmunohistoquímica a todas las muestras tumorales de CCRCC y en todos los pacientes de CCR para CA-IX.

El estudio de la anatomía patológica ha sufrido grandes avances importantes en las últimas décadas en búsqueda de diagnósticos más precisos y completos. Sin embargo, en el área de procesamiento de tejidos los avances han sido escasos, por lo que se continúa la búsqueda de métodos alternativos que nos permitan obtener muestras procesadas en un menor tiempo, menor coste y que no representen riesgo para la calidad del tejido ni para sus propiedades tintoriales.⁽¹²³⁾

La técnica de inmunohistoquímica es una de las técnicas más importantes en anatomía patológica y la calidad de los anticuerpos a utilizar y la calidad del tejido es fundamental para evitar que se generen falsos positivos.⁽¹²³⁾

En este estudio todos los anticuerpos utilizados fueron monoclonales los cuales poseen como ventaja el presentar una mayor homogeneidad que los policlonales, lo que conlleva una mejor reproducibilidad y una mayor afinidad por la proteína a estudiar.

Además todos los casos fueron evaluados por el mismo patólogo, para que la interpretación de los resultados fuese más restrictiva.

5.1.3.5.-ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LAS PROTEÍNAS CA-IX, ERK5, ERK2.

Se analizaron por western blot todas las muestras tumorales y tejido sano de todos los pacientes para la proteína CA-IX y sólo los de célula clara para ERK5 y ERK2.

Se tomó como control el parénquima renal sano de cada paciente para la comparación de la mayor o menor expresión de la proteína del tumor con respecto a su control sano. El peso molecular de cada proteína también fue un parámetro importante a tener en cuenta como control, ya que daba la seguridad de que la banda correspondía a la proteína en cuestión.

Para validar la prueba del western blot, se evaluaron los parámetros especificidad, límite de detección, precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad) y robustez.

Se trabajó con los mismos reactivos, equipos, condiciones de laboratorio, en días diferentes y soluciones preparadas en el mismo laboratorio. Los datos fueron reproducibles ya que se repitieron los western blots con condiciones, soluciones y días diferentes.

Antes de comenzar el estudio se testaron los anticuerpos utilizados para la técnica de western blot en líneas celulares para cerciorarse de la puesta a punto de la técnica. El anticuerpo usado para western blot para la proteína CA-IX fue de distinta casa comercial al utilizado para la técnica de inmunohistoquímica, ya que el anticuerpo de Abcam® tiene mayor indicación para inmunohistoquímica y el de Santa Cruz Biotechnology® está indicado únicamente para western blot, además se realizaron pruebas control para testar los anticuerpos que nos hicieron tomar esta decisión puesto que el anticuerpo de Abcam® generaba bandas inespecíficas por western blot.

Se intentó realizar la técnica de western blot para la proteína VHL pero no se consiguió ver VHL endógeno en líneas celulares, únicamente se vio en líneas que lo tenían sobreexpresado, por lo que en tejido sería todavía más complicado y se decidió no realizar finalmente el análisis de esta proteína mediante esta técnica.

5.2.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA CA-IX

Aunque primariamente se describió la mucosa gástrica como único tejido normal en el que CA-IX se expresaba,⁽¹²⁴⁾ estudios más recientes han demostrado que CA-IX puede aparecer con menor intensidad en otros tejidos normales.⁽¹²⁵⁾ Sin embargo, es fundamentalmente en los tumores donde se manifiesta su expresión.⁽⁴⁹⁾

En cualquier caso, el tejido renal normal constituye una localización en la que no se ha demostrado presencia de CA-IX mientras que en el CCR, esta expresión es patente y de manera casi exclusiva en el subtipo de células claras, de forma que en las ocasiones que se ha encontrado expresión en otros tumores renales, además de escasas, se ha sugerido la posibilidad de ser falsos positivos.^(126,127)

Por otro lado, el diagnóstico patológico de los tumores en general ha cambiado y en particular el de los tumores renales, que ya no se basan únicamente en criterios microscópicos.⁽¹²⁸⁾ Así pues, la clasificación actual más usada para la catalogación de los tumores renales publicada por la OMS en 2004⁽¹¹⁾ separa los tumores basándose en la morfología histológica, comportamiento clínico y en las alteraciones genéticas (mutaciones) subyacentes.

Diferentes técnicas son actualmente utilizadas para apoyar el diagnóstico histopatológico clásico, basadas en su mayoría en la variable expresión de determinados genes o proteínas atendiendo a su origen histológico, tales como PCR-cuantitativa, microarrays, western blot, etc. Teniendo en cuenta estos aspectos, se conoce que los genes relacionados con la angiogénesis están sobreexpresados en el CCRCC, por lo que la distinta manifestación de los mismos son la base de algunas terapias antiangiogénicas usadas en la actualidad o en diversas fases de ensayos clínicos.⁽¹²⁹⁾

La expresión de CA-IX fue exclusiva de los CCRCC en nuestro estudio. Valorando este hecho, podemos plantearnos el uso de dicha expresión para el diagnóstico. Si bien se ha comunicado expresión de CA-IX en subtipos distintos al de células claras (nunca

en los carcinomas cromófobos), cuando aparece se encuentra en un porcentaje mucho menor y con menos intensidad.^(49,130,131) Además se ha de tener en cuenta que se han descrito tumores que presentan arquitectura fundamentalmente papilar, pero que cuentan con una extensión importante de células con citoplasma claro (este tipo de tumores serían los englobados como inclasificables en la clasificación histológica) y que en estudios moleculares muestran características de los tumores de células claras, como inactivación de *VHL*, pérdida de heterocigosidad en el brazo corto del cromosoma 3, etc., que podrían explicar una sobreexpresión de CA-IX.⁽¹³²⁾ Esta circunstancia se podría trasladar a aquellos tumores con diferenciación sarcomatoide extensa y cuyo origen celular es difícil de catalogar por sus características morfológicas.

Otro punto importante a discutir es el hecho de que CA-IX se relacione con pT y pM y estadio TNM altos. En nuestra serie puede deberse a que los tumores de célula clara presentaban estadios más altos, lo que por otra parte es lógico ya que es el subtipo tumoral con peor pronóstico.⁽¹⁰⁶⁾

En el presente estudio se pretendía a su vez estimar la validez de dos métodos distintos de detección de expresión de CA-IX. La inmunohistoquímica constituye el método clásico utilizado por patólogos y depende de la subjetividad del mismo. El western blot es una técnica más objetiva, menos generalizada para el diagnóstico clínico-patológico, pero sujeta a menos errores y subjetividad.⁽¹³³⁾ Según los resultados obtenidos, encontramos altos porcentajes de acuerdo específico positivo, negativo y global, al considerar que los CCRCC tenían expresión constante de CA-IX, como en realidad fue. Comparados entre sí, se puede inferir que ambas técnicas son válidas para la detección de expresión de CA-IX. No obstante, se obtuvo un leve mejor resultado a favor de la inmunohistoquímica debido a dos falsos negativos detectados por western blot. También es cierto, que en la inmunohistoquímica se está seguro de que sólo se valora el tumor, y en el caso del extracto para western blot no se puede estar completamente seguro de que sólo se esté tomando tejido tumoral y no haya tejido sano en la muestra. Los casos considerados falsos positivos fueron iguales para ambas técnicas, pero ambos casos correspondieron con los tumores clasificados como

5 DISCUSIÓN

inclasificables, lo que se puede explicar por un origen o transformación en células claras como se ha comentado anteriormente. Por estas razones, la sensibilidad para la inmunohistoquímica fue superior a la del western blot, aunque ambas pruebas mostraron porcentajes de sensibilidad y especificidad altos. Si bien la muestra limitada de este estudio no permite generalizar estos resultados para su uso habitual en clínica, sí sirven de aproximación diagnóstica. Además la inmunohistoquímica y el western blot se han realizado con anticuerpos diferentes, lo que podría justificar esa pequeña diferencia en el resultado.

Por lo tanto, podemos considerar ambas técnicas de detección de CA-IX como válidas para el diagnóstico de CCRCC, fundamentalmente en los casos en que los criterios morfológicos no sean suficientes y, ocasionalmente, para predecir el comportamiento clínico de los mismos y el planteamiento de nuevas alternativas terapéuticas emergentes en el cáncer renal, ya que se ha postulado la posibilidad de CA-IX como marcador de pronóstico dependiendo de su expresión y de respuesta a ciertos agentes terapéuticos.⁽¹³⁴⁻¹³⁶⁾

5.3. ESTUDIO DEL GEN Y PROTEÍNA VHL.

El CCR se compone por distintos subtipos histológicos con comportamientos clínicos diferentes y son una multitud de genes en los que reside la causa de cada una de estas neoplasias. En la medicina del futuro podría ser posible individualizar los procesos terapéuticos del cáncer de riñón si comprendiésemos las bases genéticas de cada tipo.⁽¹³⁷⁾ Un punto importante para llegar a ello sería la mejora progresiva de las técnicas de biología molecular y el conocimiento de las alteraciones citogenéticas que se producen en el CCR. Este conocimiento en la actualidad ha mejorado considerablemente, conociéndose nuevos datos que ayudan a una mejor comprensión de la carcinogénesis renal, así como a aportar instrumentos que mejoran el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de este tumor.⁽¹³⁸⁾

En cuanto a lo que se conoce de la biología molecular del CCR esporádico, se han observado múltiples alteraciones genéticas, la gran mayoría están ligadas al gen *VHL*, o a la región del brazo corto del cromosoma 3 donde reside.⁽¹⁰⁾ En consonancia con su papel como supresor tumoral, la pérdida de la función normal de *VHL* es algo común en tumores renales esporádicos.⁽¹³⁹⁾ Las mutaciones somáticas cuando ocurren en un gen supresor tumoral pueden iniciar el desarrollo de un cáncer. Se ha sugerido que la pérdida de función de la proteína *VHL* puede ser un paso precoz en la tumorigénesis renal.⁽¹⁴⁰⁾ Un hecho que apoya esta teoría es que la restauración de la función de *VHL* es suficiente para suprimir la capacidad de formar tumores.⁽¹⁴¹⁾

5.3.1. ESTUDIO MUTACIONAL DEL GEN *VHL*.

En nuestro estudio como ya se ha comentado, sólo se realizó el análisis mutacional del gen *VHL* únicamente a los tumores con subtipo histológico de células claras. En general, se considera que las mutaciones producidas en el gen *VHL* en los tumores renales aparecen con mucha más frecuencia en este subtipo y son más infrecuentes en otros subtipos aunque estén descritas, por lo que no vimos necesario realizar el análisis a los tumores con diagnóstico de otros subtipos histológicos⁽¹⁴²⁾

Se detectaron mutaciones en 13 pacientes (26,0%). La prevalencia de mutaciones comparada con la de otros estudios es más baja; así Schraml y cols. encontraron 38 en 113 pacientes (34%)⁽¹⁴³⁾ y Gnarra y cols. detectaron 56 en 98 pacientes (57%).⁽¹⁴⁴⁾ Es probable que la mejora de las técnicas de laboratorio y la comprobación de las mutaciones en las dos direcciones (con ambos cebadores: Fw y Rv), hagan que en nuestro caso, los porcentajes de detección de mutaciones hayan sido menores ya que al hacer el estudio más restrictivo la probabilidad de falsos positivos es menor.

En nuestro estudio el porcentaje de mutaciones es ligeramente superior a los obtenidos en un trabajo previo de nuestro grupo en el que se encontraron 22,1%. Sin embargo, el estudio anterior además de los casos de CCRCC también incluyó otros

5 DISCUSIÓN

subtipos de CCR, lo que podría explicar que ese porcentaje haya sido inferior.

Todas las mutaciones detectadas en el presente estudio fueron en heterocigosis, por lo que para considerar que la mutación produzca alteraciones en la función de la proteína debe existir una alteración en el otro alelo del gen. Esta alteración habitualmente consiste en pérdida de heterocigosidad o en la hipermetilación de determinadas zonas del gen, las cuales ocurren con alta frecuencia, llegándose a describir porcentajes superiores al 90% en diversos estudios.^(138,145,146)

En nuestro estudio no se realizó detección de pérdida de heterocigosidad pero si se analizó el estado de hipermetilación del promotor, coincidiendo en dos casos mutación e hipermetilación. En uno de esos dos casos el tumor se encontraba en estadio pT3b, pM1 y grado de Fuhrman 4; el otro caso presentaba estadio pT1b con grado de Fuhrman 2 y pM0. Se consideró que existía una elevada probabilidad de que en el resto de muestras mutadas existiese pérdida de heterocigosidad ya que el porcentaje de alteraciones en el gen *VHL* descritas por otros autores es superior al encontrado en nuestro estudio. Además para que la proteína no se exprese debe haber alteración en los dos alelos, y como ya se ha mencionado, únicamente en dos casos se observó doble alteración en los estudios genéticos que hemos realizado (hipermetilación y mutación) cuando el número de pacientes que no expresaba *VHL* fue mayor. En nuestro caso no se realizó análisis de pérdida de heterocigosidad, la cual es otro tipo de alteración descrita, por lo que completar el estudio de alteraciones estudiando la existencia de pérdida de heterocigosidad podría aumentar nuestro porcentaje.

En cuanto a la clínica, no se ha hallado relación estadísticamente significativa en el presente estudio entre la existencia de mutación, con los distintos parámetros clínicos ni patológicos lo que concuerda con otros estudios⁽¹³⁸⁾ exceptuando al grado de Fuhrman, en el que se encontró un mayor número de mutaciones en estadios bajos (3 mutaciones en pacientes con grado de Fuhrman 1 y 7 mutaciones con grado de Fuhrman 2). El hecho de esta falta de asociación entre mutaciones y parámetros clínico-patológicos sugiere que la mutación del gen *VHL* está relacionada con el origen pero no con la progresión tumoral.⁽²⁷⁾ En un estudio previo de nuestro grupo realizado

por Giménez Bachs y cols.⁽²⁵⁾ tampoco hallaron relación con los distintos parámetros clínicos y patológicos pero sí observaron que el mayor número de mutaciones también se dio en pacientes con grado de Fuhrman 2 y en cuanto al estadio, el mayor porcentaje de mutaciones se encontró en estadio pT1, mientras que no hallaron ningún tumor en estadio pT4, hecho que apoya esta idea.

La mayor parte de las mutaciones detectadas en este estudio se localizaron en el exón 1 (53,8%). Si bien existen estudios donde la mayor parte de las mutaciones residen en el exón 2.^(119,137,140) Se tiende a pensar que, en general, las mutaciones se agrupan fundamentalmente en el último tercio del exón 1 y los exones 2 y 3,⁽¹⁴⁷⁾ lo que resultaría lógico teniendo en cuenta que es en esta zona donde se codifican los dominios funcionales de la proteína.⁽³⁴⁾ Todas las mutaciones detectadas en el presente estudio se localizan a partir del codón 62 del gen, por lo que se confirma la tendencia de un menor número de mutaciones en los primeros residuos.⁽¹⁴⁷⁾ Está descrito que hay mayor agresividad en los tumores que presentan mutaciones en el exón 3.⁽¹¹⁹⁾ En este estudio, encontramos una de los dos casos con mutaciones en este exón con estadio pT3a, lo que apoya estas observaciones.

Encontramos tres tipos distintos de mutaciones: mutación puntual, delección e inserción. La mutación más frecuente fue la delección (38,5%). Si las mutaciones que aparecen en los tumores familiares son fundamentalmente puntuales y de cambio de sentido, la mayoría de las mutaciones que aparecen en tumores esporádicos resultan en una proteína truncada, ya sea por la aparición de un codón de parada en una mutación puntual o por la presencia de delecciones o inserciones que habitualmente resultan en una “catástrofe” molecular.⁽¹⁴⁸⁾ Por tanto, nuestro estudio apoya el hecho de que la mayoría de las alteraciones genéticas que se encuentran en conjunto son delecciones e inserciones. Todas las mutaciones puntuales fueron transversiones guanina por citosina. Parece que las transversiones son más frecuentes cuando ocurren en tumores esporádicos, mientras que se han detectado mayor proporción de transiciones en las mutaciones germinales o de casos familiares.⁽¹⁴⁹⁾

La aparición de una proteína truncada como consecuencia de una mutación genera una pérdida absoluta de la función de la proteína. En la mayoría de los casos

5 DISCUSIÓN

desaparece la expresión de la proteína, y por tanto deja de ejercer su función supresora tumoral, dando paso a la activación de mecanismos que pueden llevar a la génesis tumoral. De las 12 mutaciones detectadas en localización exónica, 11 originaron una proteína truncada y solo una de ellas no supuso cambio en el aminoácido codificado (mutación silente). El cambio de un aminoácido por un codón de parada prematuro se produjo en dos ocasiones, siendo las restantes proteínas truncadas por un cambio en la pauta de lectura debido a la delección de nucleótidos en 5 casos y a 4 de inserción de una adenina. Únicamente, una de las delecciones halladas ocasionó la pérdida de un codón entero y, por lo tanto, no se modificó la pauta de lectura, pero dio lugar a una proteína con un aminoácido menos. En el resto de delecciones e inserciones sí se modificó la pauta de lectura por lo que dichas proteínas sufrieron un cambio total de su estructura. En estos casos, depende de la localización de los aminoácidos delecionados y de su importancia para la función de la proteína, el que la pérdida sea o no relevante, aunque lo habitual es que generen una proteína truncada.

En cuanto a las mutaciones intrónicas, éstas pueden tener efectos perjudiciales sobre la proteína expresada, ya que es en estas porciones de ADN donde pueden residir determinadas secuencias reguladoras, promotoras o amplificadoras de la transcripción. Los intrones son secuencias interpuestas de ADN que no codifican ningún producto y que son eliminadas por un mecanismo de “corte y empalme” durante la maduración del ARN mensajero. Aunque se ha defendido que estas secuencias pudieran representar un exceso de ADN, hoy en día se piensa que juegan un importante papel en la evolución y que presentan funciones biológicas potenciales.⁽¹⁵⁰⁾ Hay mutaciones puntuales en los intrones que producen un acoplamiento defectuoso de las secuencias intermedias, esto interfiere con el procesamiento normal del ARN mensajero inicial y da lugar a un fallo en la producción del ARN, pudiendo afectar la traducción y no llegar a sintetizarse la proteína.⁽¹⁵¹⁾

En este estudio se encontró una mutación intrónica que consistió en un cambio de base en la posición +4 del intrón 2. Este cambio de base apareció justo en el segundo nucleótido después de la timina de la secuencia de *splicing* o de “corte y

empalme” del intrón 2. Si bien no afecta directamente a dicha secuencia, el hecho de que esté tan próximo al lugar de *splicing* podría perturbar la correcta eliminación del intrón 2 y, por tanto, del ARN mensajero, de manera que no se produjera un ARN normal y que, o bien se transcriba una proteína alterada, o bien el ARN sea defectuoso y no permita la traducción proteica y su expresión, afectando finalmente la función de la misma.

Con todo ello, podemos ver que las mutaciones, ocurran en los exones o en los intrones, pueden generar alteraciones de gran importancia en la futura proteína. Por tanto, el CCRCC presenta mutaciones en el gen *VHL* no del todo específicas, sino más bien invalidantes de la función de la proteína, y es ahí donde quizá resida su capacidad tumorigénica.

5.3.2. ESTUDIO EPIGENÉTICO DEL GEN *VHL*.

Se han observado patrones de metilación del ADN anormales, ya sea por hipermetilación o hipometilación, en muchos tipos de cáncer, los cuales conllevan la inactivación de genes supresores de tumores y la inestabilidad del genoma.⁽¹⁵²⁾ De hecho, se ha demostrado por un lado que hay una hipermetilación restringida a determinadas regiones del ADN que inactivaría genes constitutivos y genes supresores tumorales debido a un cambio estructural de la cromatina que la hace inaccesible a los factores de transcripción.⁽¹⁵³⁾ Entre los genes más frecuentemente reprimidos por hipermetilación del promotor en cáncer se pueden destacar supresores tumorales como *VHL*, *BRCA1*, *p6/CDKN2*, *p21*, *Rb*;⁽¹⁵⁴⁾ genes de reparación del ADN como *hMLH1*,⁽¹⁵⁵⁾ proteínas kinasas asociadas a muerte celular o el gen de la *Trombospondina-1*.⁽¹⁵⁴⁾ Por otro lado, también se ha observado que puede haber una hipometilación generalizada del genoma en tejidos tumorales⁽¹⁵³⁾ la cual podría generar una inestabilidad cromosómica.⁽¹⁵⁶⁾ Este hecho podría inactivar genes de control de la proliferación y el crecimiento.^(156,157) así como generar la sobreexpresión de proteínas involucradas en procesos de invasión y metástasis.⁽¹⁵⁸⁾

5 DISCUSIÓN

Diversos estudios han mostrado que el CCR puede estar relacionado con la hipermetilación de una amplia variedad de genes, como, por ejemplo: *CDH1*, *APC*, *MGMT*, *RASSF1A*, *GSTP1*, *p16*, *RAR-beta2*, *ARF*, *Timp-3*, *VHL* y el gen de la *E-caderina*.⁽¹⁵⁵⁾ En cuanto al gen *VHL*, la hipermetilación de su promotor únicamente aparece en el CCR de tipo células claras.⁽¹⁵⁵⁾ El gen *VHL* puede ser inactivado por hipermetilación de las islas CpG que normalmente no están metiladas, en la región 5',^(31,159,160) este mismo fenómeno ha sido detectado en una gran variedad de genes supresores tumorales.⁽¹⁵⁹⁾

Se ha descrito hipermetilación en el gen *VHL* en tumores con subtipo histológico de células claras con un porcentaje de entre el 15% y el 19%^(145,159-161) cuyo resultado final es la silenciamiento alélica. En el presente estudio hemos obtenido un porcentaje de 19,6% lo que se ajusta a lo encontrado en lo publicado. En algunos estudios se han visto casos con metilación en un alelo y mutación en el otro, y ocasionalmente ambos alelos están metilados.⁽¹⁵⁹⁾ Igualmente, se han encontrado dos casos en el que apareció mutación e hipermetilación conjuntamente, como ya se mencionó anteriormente

Encontramos metilación del promotor del gen *VHL* en 9 casos (19,6%), no hallándose correlación estadísticamente significativa entre el estado de metilación del promotor y los parámetros clínicos. Se ha descrito que en estadios más avanzados (pT3) o cuando existe progresión del tumor, aparecen eventos genéticos de este tipo.⁽¹⁴⁵⁾ Sí observamos una tendencia lineal, aunque no significativa, al relacionarlo con la presencia de metástasis a distancia. Quizás con un aumento en el muestreo, se igualaría a lo publicado por otros autores. Sí se vio que la presencia de metilación correspondía con Fuhrman más altos, hecho que también observaron Banks y cols.,⁽¹⁶²⁾ lo que indica también un peor pronóstico. Otros autores no han encontrado relación entre el estado de metilación del gen *VHL* con los parámetros clinicopatológicos habituales.^(108,163)

5.3.3. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA VHL MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA.

El estado de la expresión de la proteína VHL por inmunohistoquímica fue negativo en 8 casos (16%) y bajo en 10 casos (20%). Paradójicamente la presencia de mutación corresponde a una mayor expresión de la proteína por inmunohistoquímica lo que, en principio, no tiene sentido. Una posible explicación a esto sería que la mutación se encuentre fuera del dominio de reconocimiento del anticuerpo, o que la región o el epítipo de reconocimiento del anticuerpo utilizado mediante la técnica de inmunohistoquímica no haya sido afectado por dicha alteración (encuéntrese o no la mutación dentro de esta región), lo que puede hacer que el marcaje sea positivo aunque la proteína no sea funcional. Además en la inmunohistoquímica se pueden generar falsos negativos (otras proteínas que interaccionen con el anticuerpo) ya que no se posee un criterio como el peso molecular que no dé lugar a duda de un posible marcaje inespecífico. Otra posibilidad sería que la mutación afectara a la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, es sabido que en el caso de otros genes supresores tumorales, como es el caso del gen *p53* las técnicas de inmunohistoquímica están basadas en que las mutaciones en el este gen inducen cambios conformacionales en la proteína que causan un incremento en la vida media de la proteína, acumulación y sobre-expresión a nivel nuclear^(164,165) por lo que las mutaciones en el gen son necesarias para la detección de la proteína por inmunohistoquímica.

Lo que sí concuerda con la bibliografía revisada es que la metilación del gen *VHL* y la ausencia de expresión de proteína VHL se correlacionaron con el grado de Fuhrman ($p < 0.05$),⁽¹⁶²⁾ ya que como supresor tumoral, la inactivación o no expresión de esta proteína correlacionará con un peor pronóstico. Además, el hecho de que la expresión de VHL estuviera ausente se correlacionó con la presencia de metástasis a distancia.

5 DISCUSIÓN

Por todo ello podemos decir que la presencia de mutaciones o metilación no conlleva necesariamente la ausencia de expresión de proteína VHL analizada por inmunohistoquímica, pero sí que la ausencia de expresión de dicha proteína se correlaciona con un peor pronóstico.

5.4. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HIF-1 α .

Una de las dianas del complejo VCB-CUL2 es HIF-1 α como ya se dijo, factor que juega un papel fundamental en la regulación de genes envueltos en metabolismo energético, angiogénesis y apoptosis en respuesta a hipoxia.^(166,167)

A partir de los 47 tumores analizados se encontró que el 89,4% de ellos presentaron sobreexpresión de HIF-1 α , hecho que viene a decir que en este subtipo de tumores (carcinoma renal de células claras) se produce un aumento significativo de la expresión de HIF-1 α en la mayoría de los casos. Este dato concuerda con lo referido en la bibliografía.

Las mutaciones en el dominio β de *VHL* reducen la unión de ambas proteínas (VHL y HIF-1 α) y por tanto bloquean la degradación de HIF-1 α .⁽¹⁶⁸⁻¹⁷¹⁾ Las mutaciones en el dominio α de VHL también estabilizan HIF-1 α ya que previene la formación del complejo VCB. En dicho estudio todas las mutaciones de VHL se encontraban dentro del dominio β , por lo que esperábamos ver expresión de HIF-1 α en los tumores mutados y de acuerdo con lo esperado todos los tumores que presentaron mutación, excepto un caso, expresaban HIF-1 α .

En cuanto a la relación de la expresión de HIF-1 α con el pronóstico de los pacientes, no está clara que la expresión de dicha proteína conlleve a un peor pronóstico. Autores como Lidgren y cols.⁽⁸⁷⁾ investigaron la expresión de esta proteína en 66 casos de célula clara, 20 papilares y 6 cromófobos, concluyendo que los niveles de HIF-1 α varían de unos subtipos de CCR a otros y que en el CCR convencional HIF-1 α es independiente como factor pronóstico. No se vio asociación entre la expresión de HIF-1 α con el estadio tumoral, grado, tamaño o presencia de metástasis. En otro

estudio, como el de Klatte y cols,⁽⁹⁵⁾ hallan importancia en la expresión de HIF-1 α como indicador pronóstico en pacientes con CCRCC metastático, ya que correlacionaron una elevada expresión de la proteína con una supervivencia pobre y sugieren que, en conjunto, las proteínas HIF-1 α y CA-IX representan unos marcadores complementarios ideales para la predicción del pronóstico. En nuestro estudio no se halló relación estadísticamente significativa con el estadio pT, pN y pM, ni con el TNM, ni en general con ninguna de los parámetros clínicos aunque el hecho de que la mayoría de los tumores sobreexpresen HIF-1 α puede ser la explicación. Esto es lógico, HIF-1 α es la diana directa de VHL, si VHL no correlaciona, HIF-1 α es difícil que lo haga.

Sí se vio que la expresión de este factor correlacionaba significativamente con el grado de Fuhrman. Los únicos casos negativos, correspondían a grados altos, 3 y 4. Lo cual no concuerda con lo esperado. Una explicación podría ser que el efecto de VHL sobre HIF-1 α sea necesario en la génesis del tumor pero no en los estadios más avanzados donde ya está el tumor establecido.

5.5.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA VEGF.

Entre los recientes avances en el desarrollo de las terapias diana para el tratamiento del cáncer uno de los temas que ha generado mayor interés es el desarrollo de agentes inhibidores de la angiogénesis.^(42,172) Los tumores requieren un crecimiento y remodelación vascular constante, generalmente no pueden crecer más allá de 1-2 mm de diámetro sin desarrollar un aporte vascular. Hoy por hoy se han descrito muchos factores pro y antiangiogénicos. Uno de los factores de mayor importancia en el desarrollo vascular es la proteína VEGF.⁽⁵⁰⁾

Como ya es sabido, en un alto porcentaje de carcinomas renales de células claras se produce inactivación del gen supresor *VHL*, inhibiéndose la generación de un complejo transcripcional de elongación denominado elongina que regula negativamente el factor inducible de hipoxia (HIF-1 α) que activa los genes que regulan

5 DISCUSIÓN

ciclo celular, angiogenesis y formación de matriz extracelular ;^(37,173) lo que da lugar, entre otras, a una sobreexpresión de VEGF.

Las terapias con agentes directos contra las proteínas del VEGF o del receptor de VEGF han demostrado inicialmente una actividad clínica en el carcinoma renal metastásico, ya que el tratamiento directo contra el VEGF parece tener una fuerte racionalidad biológica, como se ha demostrado en diversos ensayos clínicos . Es interesante plantearse determinar la expresión del VEGF en tumores renales de células claras, con la intención de establecer grupos de tumores en los que podría ser más eficaz este tipo de tratamientos.

De los 47 casos analizados en este estudio, 16 casos fueron negativos y 31 positivos para la expresión de VEGF. La expresión de VEGF se correlacionó con grados de Fuhrman altos, con estadios TNM altos y con la presencia de metástasis a distancia. De hecho en el análisis multivariante la única variable que se relacionó con la presencia de metástasis fue la expresión de VEGF, de manera que los pacientes que tienen VEGF expresado multiplican por 8 la probabilidad de sufrir metástasis en el momento del diagnóstico. Podemos decir por tanto, que la expresión de la proteína VEGF presenta un comportamiento que podría establecerse como marcador pronóstico.

Apoyando los resultados de este estudio, diversos autores relacionan la expresión de VEGF con la presencia de metástasis, ya que es un factor importante en la creación de nuevos vasos sanguíneos, por lo que VEGF está ligado a un mal pronóstico.⁽¹⁷²⁾ Además incluso en estudios en los que se ha analizado la expresión de VEGF en tumores no metastásicos, la expresión de éste estaba ligada a estadios TNM y grados avanzados.⁽¹⁷⁴⁾

Los resultados obtenidos hacen interesante el estudio de la expresión del VEGF en los tumores renales de células claras , utilizando series más amplias y comparando los casos en el mismo estadio independientemente de su evolución, lo cual podría permitir separar grupos de tumores en base a la expresión del VEGF, abriendo la posibilidad al beneficio terapéutico de la inhibición del VEGF.

5.6. ESTUDIO DE LAS MAPK (ERK5 Y ERK2).

El hecho de elegir las proteínas ERK5 y ERK2 como MAPK a analizar en este estudio viene debido a que ambas proteínas están relacionadas con proliferación y, en concreto ERK5, con la vascularización, que como ya se ha comentado, es un proceso abundante en el CCR. Además, VHL controla tanto a HIF1- α como a ERK5 lo que, desde el punto de vista biológico, puede tener distintos significados.⁽⁶⁰⁾ Por un lado, el que ambas proteínas estén controladas por VHL hace que las dos se estén degradando en condiciones normales de oxígeno y en las que VHL es funcional en la célula; sin embargo, esta degradación es diferente en cuanto a la eficiencia ya que la degradación de HIF1- α es más eficaz que la de ERK5. Por otro lado, ambas proteínas poseen dianas comunes, por lo que en condiciones en las que HIF1- α no fuera funcional, como puede ser en normoxia, la regulación de esos genes diana dependería de ERK5; esto supondría una vía de regulación alternativa de genes que se expresan principalmente en hipoxia por la inducción de HIF1- α .⁽¹⁷⁵⁾ Además, determinados estudios han propuesto la existencia de una regulación de HIF-1 α mediada por ERK5.⁽¹⁷⁶⁾ Este hecho serviría para controlar el exceso de genes que se transcriben en respuesta a hipoxia, ERK5 estaría controlando la estabilidad de HIF1- α evitando un aumento excesivo de los niveles de las proteínas diana, entre las que se encuentra VEGF, principal responsable de la angiogénesis. De cualquier modo, VHL es considerado como un supresor de tumores, lo cual encaja con el efecto inhibitorio sobre ERK5, una ruta claramente implicada en crecimiento celular.

Desde el punto de vista clínico, el papel de ERK5 en crecimiento celular y cáncer sería consistente con datos que reflejasen expresión de dicha proteína en tumores de pacientes con peor pronóstico. Así, en un estudio realizado por Arias y cols.⁽⁶⁰⁾ se vio que en casos diagnosticados como carcinoma renal de célula clara, pacientes con un

5 DISCUSIÓN

bajo estadio TNM presentaban muy bajos (o inexistentes) niveles de proteína ERK5. De la misma forma, los pacientes con altos niveles de ERK5 en tejido tumoral correlacionaban con estadios más avanzados de la enfermedad. En consonancia con ello, en nuestro caso la sobreexpresión de ERK5 en tejido tumoral con respecto al parénquima renal sano, correlacionó con estadios TNM avanzados y con la presencia de metástasis a distancia.

La ruta de ERK5 también se ha asociado a diferentes procesos angiogénicos. Se ha relacionado tanto con la angiogénesis embrionaria, necesaria para la correcta formación de nuevos vasos, como con procesos de angiogénesis en adultos, importante para la curación de heridas y, además, con procesos patológicos como es la angiogénesis tumoral. En el presente estudio, las muestras tumorales presentaron aumento de la expresión de la proteína ERK5 en el 58% de los casos, correlacionando de manera significativa con VEGF. Como ya se mencionó, parece ser que ERK5 regula los niveles de VEGF en procesos de hipoxia, siendo éste uno de los factores de crecimiento necesarios en la formación de nuevos vasos.^(176,177) Este hecho es consistente con que en nuestro estudio la mayor parte de los tumores que expresaron VEGF, sobreexpresaron ERK5 (21 de 31 casos). Además apoya el que VHL regule también a ERK5.

La expresión de VEGF y ERK5 se relacionó con estadios tumorales altos así como con la presencia de metástasis, por lo que también podría establecerse como marcador pronóstico. Esto concuerda con lo descrito por otros autores los cuales sugieren que ERK5 podría considerarse un biomarcador nuevo para el carcinoma renal de célula clara⁽⁶⁰⁾ y supondría una buena herramienta a la hora de establecer un protocolo de seguimiento más individualizado del paciente. Es más, el estudio de la ruta de ERK5 podría ser de gran potencial terapéutico, de hecho, en nuestro grupo (datos no mostrados), hemos comprobado el efecto tóxico de diferentes inhibidores de ERK5 sobre líneas celulares provenientes de CCRCC como son las ACHN; lo que también apoya que ERK5 pueda ser diana terapéutica en el CCRCC. Además, la importancia de ERK5 como marcador pronóstico se podría extrapolar a otros tipos de cánceres, un ejemplo de ello es el estudio realizado por Simões y cols.⁽¹⁷⁸⁾ los cuales

relacionan la ruta de ERK5 con progresión tumoral y metástasis. Es más, diversos autores han mostrado interés recientemente por esta proteína realizando estudios en los que han descrito alteraciones en ERK5 en otro tipo de tumores como próstata, mama, hepatocarcinoma o mieloma múltiple.⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾

En cuanto a ERK2, no se encontraron variaciones en los niveles de expresión de la proteína en tejido tumoral y tejido sano. Esta proteína posee una alta homología a ERK5, motivo por el cual se planteó su estudio; pero no hay evidencias de que sea diana de VHL, lo que podría justificar esta ausencia de variación en el carcinoma renal de células claras con respecto al parénquima renal sano. Además ERK2 es una proteína casi de expresión constitutiva (ya que en todos los tejidos hay ERK1/2). Por lo que hubiese sido deseable realizar estudio de funcionalidad (estudiar si la proteína se encuentra fosforilada) debido a su implicación en proliferación, pero el uso del fosfoanticuerpos implica un procesamiento de la muestra rápido y dado el tipo de metodología empleada para extraer la muestra el número de falsos positivos sería muy elevado. ERK2, no parece un buen biomarcador ni parece estar implicado en esta patología. De hecho evidencias en cultivo (no mostradas) indican que células derivadas de CCR pueden crecer en presencia de inhibidores para ERK1/2, pero si es en presencia de inhibidores de ERK5 las células presentan una alta toxicidad al inhibidor. Además existen estudios en los que se ha observado la existencia de unos genes diana comunes para las rutas de HIF1- α y de ERK5 que no se ven afectados por la ruta de ERK2,⁽¹⁷⁵⁾ hecho que también indica que la ruta de las proteínas ERK1/2 no se vea afectada por la ruta de VHL.

CONCLUSIONES **6**

6 CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1.- CA-IX es un marcador específico del carcinoma renal de células claras. Las técnicas de inmunohistoquímica y de Western blot para la detección de la expresión anómala de proteína CA-IX en CCRCC son válidas para el apoyo de las técnicas diagnósticas basadas en la morfología tumoral.

2.- El carcinoma de células renales de células claras de aparición esporádica presenta alteraciones en el gen *VHL*, por mutación y/o metilación, en porcentajes de 26% y 21,7% respectivamente.

3.- El estudio mediante inmunohistoquímica de *VHL* no es relevante en el CCRCC. Las alteraciones en el gen *VHL* (mutación/metilación) no se correlacionan con un patrón determinado de expresión de la proteína *VHL* por inmunohistoquímica.

4.- La expresión de *VHL* no se correlacionó con la expresión de las otras proteínas implicadas en la vía de señalización. La ausencia de expresión de proteína *VHL* se asocia con grados de Fuhrman altos.

5.- Los CCRCC presentan, en general, un aumento significativo de la expresión de HIF-1 α .

6.- Las proteínas VEGF y ERK5, pueden establecerse como marcadores pronósticos. La expresión de ambas proteínas está correlacionada entre sí y se expresan, en mayor porcentaje, en grados de Fuhrman y estadios TNM más altos. Además, su expresión está directamente ligada a la presencia de metástasis a distancia.

6 CONCLUSIONES

RESUMEN



INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células renales representa aproximadamente el 90% de los tumores renales malignos en adultos, siendo la variedad de células claras la más frecuente. Dentro de los factores genéticos que pueden afectar a este tipo de tumores destacan las alteraciones en el gen supresor tumoral *VHL*. Este gen codifica una proteína denominada VHL, la cual desarrolla su función como supresor tumoral provocando la degradación de HIF-1 α , factor de transcripción cuya misión es la transactivación de ciertos genes cuyo producto proteico aumenta la disponibilidad de oxígeno (VGEF, PDGF, EPO, etc.), o que están relacionados con la regulación del pH (CA-IX) cuando el oxígeno ambiental es limitado. En presencia de una actividad normal de VHL y con condiciones ambientales de oxígeno normales, HIF-1 α se degrada y no ejerce su función. Sin embargo, en condiciones de baja tensión de oxígeno, VHL no ejerce su función ubiquitín ligasa, HIF1-alfa no es degradado y se activa la transcripción de sus genes diana. A su vez se ha descrito el hecho de que la proteína VHL controle tanto a HIF1- α como a ERK5, proteína perteneciente al grupo de las MAPK que se ha relacionado con vascularización y, al igual que las proteínas ERK 1,2, con proliferación celular. Todo ello hace interesante evaluar la implicación de la ruta de señalización mediada por VHL y MAPK en el CCR.

OBJETIVOS

-Determinar la existencia de mutaciones y alteraciones epigenéticas (metilación del promotor) en el gen *VHL* en tejido renal tumoral de pacientes con carcinoma renal

esporádico de célula clara y caracterizar, por western blot y/o inmunohistoquímica, el estado de expresión de las distintas proteínas que forman parte de la vía metabólica de señalización desencadenada por VHL, como CA-IX, HIF-1 α y VEGF y de las MAPK implicadas en proliferación como ERK5 y ERK1/2.

-Valorar la utilidad de la determinación de la expresión de la proteína CA-IX como biomarcador en el carcinoma de células renales y cuál de los métodos para la detección de su expresión es más útil.

-Analizar si la expresión de VHL se asocia con la expresión de las otras proteínas implicadas en su vía de señalización.

-Determinar el valor pronóstico y diagnóstico de la existencia de mutaciones y metilación en el gen *VHL*, así como de la expresión de VHL y de las proteínas de las vías de señalización analizadas.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio descriptivo observacional, analítico y transversal sobre 76 pacientes diagnosticados de CCR y tratados quirúrgicamente en el Servicio de Urología del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete entre los años 2006 y 2011. Se obtuvieron muestras de tejido tumoral y parénquima renal de los especímenes quirúrgicos. A dichas muestras se les realizó un análisis de expresión de la proteína CA-IX por inmunohistoquímica; además se les extrajo proteína para realizar el análisis de expresión de la misma proteína mediante la técnica de western blot. De esos 76 pacientes se seleccionaron los 50 diagnosticados de CCRCC a los se extrajo: ADN, para realizar el estudio genético y epigenético de *VHL*. Para el estudio de las mutaciones del gen se amplificaron los 3 exones que conforman el gen *VHL* mediante la técnica de PCR y se sometieron a secuenciación automática. Para el estudio epigenético se analizó el análisis de hipermetilación de tres amplicones que componen el mayor número de sitios CpG del promotor de *VHL*. También se extrajo proteína para realizar el análisis de expresión de las proteínas ERK5 y ERK1,2 por western blot y se realizó un análisis de expresión de las proteínas VHL, HIF-1 α y VEGF por inmunohistoquímica.

RESULTADOS

La edad media de los pacientes fue de 64,1 años, con una distribución por sexos de 52 hombres (68,4%) y 24 mujeres (31,6%). La cirugía realizada mayoritariamente consistió en nefrectomía radical en un 84,2% y en 12 (15,8%) se practicó nefrectomía parcial. Respecto a la clínica el hallazgo incidental de los tumores fue la causa más frecuente (55,9%). El tipo histopatológico de mayor frecuencia fue el de células claras encontrado en 50 casos (65,8%), seguido del cromóforo (17,1%). En un 40,3% de los casos el grado nuclear de Fuhrman fue el 2. Un 34,2% de los pacientes tenían un estadio pT1b al diagnóstico y tan solo el 9,2% fueron estadio pT3b. El 27,6% de los casos presentaron metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. Con respecto al estadio TNM, el estadio I fue el más frecuente con 39 casos de los 76 (51,3%), seguido del IV con 21 (27,6%).

En cuanto a la expresión de CA-IX, todos los CCRCC fueron positivos para CA-IX. Podemos considerar ambas técnicas como válidas para el diagnóstico de CCRCC. No se encontró relación entre la expresión de CA-IX y el grado de Fuhrman ni con el estadio pT. Sí se comprobó que en estadios más altos así como en presencia de metástasis había un mayor porcentaje de casos que expresaban la proteína CA-IX.

Con respecto al estado mutacional del gen *VHL*, se detectaron 13 mutaciones (26%) en los 50 pacientes de CCRCC distribuidas en los 3 exones pero con mayor porcentaje en el exón 1 (53,8%) y siendo la delección la más frecuente (38,5%). Se encontró un mayor número de mutaciones en el riñón derecho. Con respecto al grado de Fuhrman, las mutaciones se dieron con mayor frecuencia en los grados 1 y 2 ($p=0,036$). No se observó que la existencia de mutación se correlacionara con estadio pT, pN, pM ni TNM.

De 46 pacientes analizados con CCRCC se encontraron 9 pacientes con hipermetilación en el promotor del gen *VHL*. Apareció hipermetilación en mayor porcentaje en los tumores que presentaron síntomas. Se observó una tendencia lineal entre la presencia de metástasis a distancia y una mayor proporción de casos con hipermetilación del gen *VHL*. Más del 50% de los casos expresaron la proteína VHL por

inmunohistoquímica. Los casos que no expresaron VHL correspondieron a tumores con Fuhrman más altos (14,30% de grado 3 y 54,50% de grado 4).

La expresión de HIF-1 α fue positiva en la gran mayoría de los casos (89,4%). En cuanto a VEGF y ERK5, su expresión correlacionó con estadios TNM avanzados y con la presencia de metástasis. Además la expresión de VEGF se relacionó también con grados de Fuhrman altos.

CONCLUSIONES

CA-IX es un marcador específico del carcinoma renal de células claras. Técnicas como la inmunohistoquímica y de western blot son válidas para su detección pudiendo servir de apoyo a las técnicas diagnósticas de CCRCC basadas en la morfología tumoral.

El CCRCC presenta alteraciones en el gen *VHL*, por mutación y/o metilación, en porcentajes de 26% y 19,6%. Dichas alteraciones no correlacionan con la expresión de la proteína por inmunohistoquímica. La expresión de VHL no se correlacionó con la expresión de las otras proteínas implicadas en la vía de señalización, pero su ausencia se asocia a grados de Fuhrman altos, indicando peor pronóstico. En cuanto a HIF-1 α , su diana directa, se expresa en un alto porcentaje en el CCRCC, lo que, al igual que CA-IX, lo haría buen biomarcador.

Las proteínas VEGF y ERK5, pueden establecerse como marcador pronóstico. La expresión de ambas proteínas está correlacionada entre sí y se expresan, en mayor porcentaje, en grados de Fuhrman y estadios TNM más altos. Además, su expresión está directamente ligada a la presencia de metástasis a distancia.

BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Ljungberg B, Campbell SC, Cho HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, et al: The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol.* 2011; 60: 615-21.
2. Cancer of the Kidney and Renal Pelvis - SEER Stat Fact Sheets [Internet]. [citado 23 de marzo de 2015]. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html>
3. Yuan JM, Castela JE, Gago-Dominguez M, Ross RK, Yu MC: Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 1998; 77: 1508-13.
4. Tavani A, La Vecchia C: Epidemiology of renal-cell carcinoma. *J Nephrol.* 1997; 10: 93-106.
5. Wolk A, Gridley G, Niwa S, Lindblad P, McCredie M, Møller A, et al: International renal cell cancer study. VII. Role of diet. *Int J Cancer J Int Cancer.* 1996; 65: 67-73.
6. Iliopoulos O, Eng C: Genetic and clinical aspects of familial renal neoplasms. *Semin Oncol.* 2000; 27: 138-49.
7. Giménez Bachs JM, Molina JD, Martínez Ruiz J, Morales R, Serrano M, Segura M, Martínez Sanchiz C, Lorenzo JG, Salinas AS: "Masas riñón". En: *Green Book. Diagnóstico y Tratamiento Médico.* Grupo Científico DTM, Eds. Madrid, España. Marbán Libros. 2015: 2435-46.
8. Congregado Ruiz B, Medina López RA, Sánchez Gómez E, Morales López A, Pascual del Pobil JL: Diagnóstico incidental del carcinoma renal. ¿Implica un mejor pronóstico?. *Actas Urol Esp.* 2001; 25: 278-82.
9. Novick AC, Campbell SC: "Renal Tumors". En: *Campbell's Urology.* 8th Edition. Walsh PC, Retik AB, Vaughan DE, Wein AJ. Philadelphia (Pennsylvania), U.S.A. Edit. Saunders Company, 2003: 2672-731.
10. Oosterwijk E, Rathmell WK, Junker K, Brannon AR, Pouliot F, Finley DS, et al: Basic research in kidney cancer. *Eur Urol.* 2011; 60: 622-33.
11. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA: *Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs.* Lyon: IARC Press; 2004.
12. Störkel S, Eble JN, Adlaka K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, et al: Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer.* 1997;80: 987-9.

8 BIBLIOGRAFÍA

13. Steiner G, Sidransky D: Molecular differential diagnosis of renal carcinoma: from microscopes to microsatellites. *Am J Pathol.* 1996; 149: 1791-5.
14. Presti JC Jr, Reuter VE, Cordon-Cardo C, Mazumdar M, Fair WR, Jhanwar SC: Allelic deletions in renal tumors: histopathological correlations. *Cancer Res.* 1993; 53: 5780-3.
15. Füzési L, Cober M, Mittermayer C: Collecting duct carcinoma: cytogenetic characterization. *Histopathology.* 1992; 21: 155-60.
16. Algaba F, Akaza H, López-Beltrán A, Martignoni G, Moch H, Montironi R, et al: Current pathology keys of renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2011; 60: 634-43.
17. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C: Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982; 6: 655-63.
18. Medeiros LJ, Jones EC, Aizawa S, Aldape HC, Cheville JC, Goldstein NS, et al: Grading of renal cell carcinoma: Workgroup No. 2. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer.* 1997; 80: 990-1.
19. Moch H, Artibani W, Delahunt B, Ficarra V, Knuechel R, Montorsi F, et al: Reassessing the current UICC/AJCC TNM staging for renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2009; 56: 636-43.
20. Longo R, D'Andrea MR, Sarmiento R, Salerno F, Gasparini G: Integrated therapy of kidney cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2007;18 Suppl 6: vi141-8.
21. Zbar B, Brauch H, Talmadge C, Linehan M: Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature.* 1987; 327: 721-4.
22. Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Farmer GE, Lamiell JM, et al: Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature.* 1988; 332: 268-9.
23. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al: Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science.* 1993; 260: 1317-20.
24. Richards FM: Molecular pathology of von Hippel-Lindau disease and the VHL tumour suppressor gene. *Expert Rev Mol Med.* 2001; 2001: 1-27.
25. Giménez-Bachs JM, Salinas-Sánchez AS, Sánchez-Sánchez F, Lorenzo-Romero JG, Donate-Moreno MJ, Pastor-Navarro H, et al: Determination of vhl gene mutations in sporadic renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2006; 49 : 1051-7.

26. Lessi F, Mazzanti CM, Tomei S, Di Cristofano C, Minervini A, Menicagli M, et al: VHL and HIF-1 α : gene variations and prognosis in early-stage clear cell renal cell carcinoma. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2014; 31: 840.
27. Kenck C, Wilhelm M, Bugert P, Staehler G, Kovacs G: Mutation of the VHL gene is associated exclusively with the development of non-papillary renal cell carcinomas. *J Pathol*. 1996; 179: 157-61.
28. Maher ER, Neumann HP, Richard S: Von Hippel–Lindau disease: A clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet*. 2011; 19: 617-23.
29. Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Richter J, Gasser TC, Mihatsch MJ, et al: Intratumoral Heterogeneity of Von Hippel-Lindau Gene Deletions in Renal Cell Carcinoma Detected by Fluorescence in Situ Hybridization. *Cancer Res*. 1998; 58: 2304-9.
30. Jones PA, Laird PW: Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999; 21: 163-7.
31. Prowse AH, Webster AR, Richards FM, Richard S, Olschwang S, Resche F, et al: Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors. *Am J Hum Genet*. 1997; 60: 765-71.
32. Lee S, Neumann M, Stearman R, Stauber R, Pause A, Pavlakis GN, et al: Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol*. 1999; 19: 1486-97.
33. Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG Jr: pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 11661-6.
34. Stebbins CE, Kaelin WG Jr, Pavletich NP: Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science*. 1999; 284: 455-61.
35. Hsu T: Complex cellular functions of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene: insights from model organisms. *Oncogene*. 2012; 31: 2247-57.
36. Minervini G, Panizzoni E, Giollo M, Masiero A, Ferrari C, Tosatto SCE: Design and Analysis of a Petri Net Model of the Von Hippel-Lindau (VHL) Tumor Suppressor Interaction Network. *PLoS ONE*. 2014 ;9.
37. Duan DR, Pause A, Burgess WH, Aso T, Chen DY, Garrett KP, et al: Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science*. 8 de 1995; 269: 1402-6.

8 BIBLIOGRAFÍA

38. Duan DR, Humphrey JS, Chen DY, Weng Y, Sukegawa J, Lee S, et al: Characterization of the VHL tumor suppressor gene product: localization, complex formation, and the effect of natural inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 6459-63.
39. Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, Kamura T, Conaway RC, Conaway JW, et al: Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol*. 1998; 18: 732-41.
40. Kapitsinou P, Haase V: The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ*. 2008; 15: 650-9.
41. Fraga A, Ribeiro R, Medeiros R: Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urol Esp*. 2009; 33: 941-51.
42. Trigo JM, Bellmunt J: Estrategias actuales en el tratamiento del carcinoma de células renales: fármacos dirigidos a dianas moleculares. *Med Clínica*. 2008; 130: 380-92.
43. Baldewijns MM, van Vlodrop IJH, Vermeulen PB, Soetekouw PMMB, van Engeland M, de Bruïne AP: VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. *J Pathol*. 2010; 221: 125-38.
44. Semenza GL: Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 721-32.
45. Ljungberg B: Prognostic markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol*. 2007; 17: 303-8.
46. Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MHT, Yu H, et al: Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004; 10: 5464-71.
47. Panelli MC, Wang E, Marincola FM. The pathway to biomarker discovery: carbonic anhydrase IX and the prediction of immune responsiveness. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005; 11: 3601-3.
48. Said J: Biomarker discovery in urogenital cancer. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem*. 2005;10 Suppl 1: S83-6.
49. Leppert JT, Lam JS, Pantuck AJ, Figlin RA, Belldegrun AS: Carbonic anhydrase IX and the future of molecular markers in renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2005; 96: 281-5.
50. Dvorak HF: Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 1835-42.

51. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K: Regulation of Angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cancer Res.* 2000; 60: 203-12.
52. Shibuya M: Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct.* 2001; 26: 25-35.
53. Goodsell DS: The Molecular Perspective: VEGF and Angiogenesis. *Stem Cells.* 2003; 21: 118-9.
54. VEGF Receptors & VEGF Ligands | BioOncology [Internet]. [citado 24 de marzo de 2015]. <http://www.bioncology.com/research-education/vegf/vegf/vegf-pathway/receptors>
55. Partanen TA, Paavonen K: Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech.* 2001; 55: 108-21.
56. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9: 669-76.
57. Matsumoto T, Claesson-Welsh L: VEGF Receptor Signal Transduction. *Sci Signal.* 2001; 2001:re21.
58. D'Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM, Melillo G, Illi B, Testolin L, et al: Acidosis Inhibits Endothelial Cell Apoptosis and Function and Induces Basic Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *Circ Res.* 2000; 86: 312-8.
59. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, et al: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med.* 2002; 196: 1497-506.
60. Arias-González L, Moreno-Gimeno I, Del Campo AR, Serrano-Oviedo L, Valero ML, Esparís-Ogando A, et al: ERK5/BMK1 Is a Novel Target of the Tumor Suppressor VHL: Implication in Clear Cell Renal Carcinoma. *Neoplasia.* 2013; 15: 649-59.
61. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001; 22: 153-83.
62. Roberts PJ, Der CJ: Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 2007; 26: 3291-310.

8 BIBLIOGRAFÍA

63. Kolch W: Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 2000; 351 Pt 2: 289-305.
64. Roux PP, Blenis J: ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2004; 68: 320-44.
65. Robinson MJ, Cobb MH: Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9:180-6.
66. Krishna M, Narang H: The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2008; 65: 3525-44.
67. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG: Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 1998; 74: 49-139.
68. Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E: Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J.* 1997; 16: 1901-8.
69. Meloche S, Seuwen K, Pagès G, Pouysségur J: Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 1992; 6: 845-54.
70. Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, Nishida E: ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci.* 2006; 97: 697-702.
71. Dance M, Montagner A, Salles J-P, Yart A, Raynal P: The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cell Signal.* 2008; 20: 453-9.
72. Catrin Pritchard's Research Interests — University of Leicester [Internet]. [citado 24 de marzo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www2.le.ac.uk/departments/biochemistry/staff/pritchard/research-interests>
73. Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, et al. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell.* 1998; 93: 605-15.
74. Yan C, Luo H, Lee JD, Abe J, Berk BC. Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem.* 2001; 276: 10870-8.
75. Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE: Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1995; 270: 12665-9.

76. Lee JD, Ulevitch RJ, Han J: Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 213: 715-24.
77. Buschbeck M, Ullrich A: The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem.* 2005; 280: 2659-67.
78. Carvajal-Vergara X, Tabera S, Montero JC, Esparís-Ogando A, López-Pérez R, Mateo G, et al: Multifunctional role of Erk5 in multiple myeloma. *Blood.* 2005; 105: 4492-9.
79. Esparís-Ogando A, Díaz-Rodríguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P, Pandiella A: Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 270-85.
80. Mehta PB, Jenkins BL, McCarthy L, Thilak L, Robson CN, Neal DE, et al: MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene.* 2003; 22: 1381-9.
81. Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD: BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J.* 1997; 16: 7054-66.
82. Roberts OL, Holmes K, Müller J, Cross DAE, Cross MJ: ERK5 and the regulation of endothelial cell function. *Biochem Soc Trans.* 2009; 37: 1254-9.
83. Woo C-H, Massett MP, Shishido T, Itoh S, Ding B, McClain C, et al: ERK5 activation inhibits inflammatory responses via peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) stimulation. *J Biol Chem.* 2006; 281: 32164-74.
84. Salinas-Sánchez AS, Giménez-Bachs JM, Serrano-Oviedo L, Nam Cha S, Sánchez-Prieto R: Papel de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en el carcinoma de células renales esporádico. *Actas Urol Esp.* 2012; 36: 99-103.
85. Hamano K, Esumi M, Igarashi H, Chino K, Mochida J, ISHIDA And H, et al: Biallelic inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma. *J Urol.* 2002; 167: 713-7.
86. George DJ, Kaelin WG: The von Hippel-Lindau protein, vascular endothelial growth factor, and kidney cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349: 419-21.
87. Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J, Ljungberg B: The Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Is a Favorable Independent Prognostic Factor in Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 1129-35.

8 BIBLIOGRAFÍA

88. Lam JS, Klatter T, Kim HL, Patard J-J, Breda A, Zisman A, et al: Prognostic factors and selection for clinical studies of patients with kidney cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008; 65: 235-62.
89. Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, Pack S, Geil L, Johnson BE, et al: Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 12596-601.
90. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, et al: Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 2000; 60: 7075-83.
91. Liao SY, Aurelio ON, Jan K, Zavada J, Stanbridge EJ: Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res.* 1997; 57: 2827-31.
92. Moore LE, Nickerson ML, Brennan P, Toro JR, Jaeger E, Rinsky J, et al: Von Hippel-Lindau (VHL) inactivation in sporadic clear cell renal cancer: associations with germline VHL polymorphisms and etiologic risk factors. *PLoS Genet.* 2011; 7: e1002312.
93. Shiao Y-H, Forsti A, Egevad L, Anderson LM, Lindblad P, Hemminki K: VHL down-regulation and differential localization as mechanisms in tumorigenesis. *Kidney Int.* 2003; 64: 1671-4.
94. Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM, Thompson RH, Cheville JC, Zavada J, et al: Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 4757-64.
95. Klatter T, Seligson DB, Riggs SB, Leppert JT, Berkman MK, Kleid MD, et al: Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 7388-93.
96. Baderca F, Alexa A, Lighezan R, Izvernariu D, Raica M: The diagnostic value of VEGF expression in the renal parenchyma tumors. *Romanian J Morphol Embryol.* 2011; 52: 581-6.
97. Patard J-J, Fergelot P, Karakiewicz PI, Klatter T, Trinh Q-D, Rioux-Leclercq N, et al: Low CAIX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2008; 123: 395-400.
98. Technelysium | ChromasPro [Internet]. [citado 28 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: http://technelysium.com.au/?page_id=27

99. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W: The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. 1969. *J Urol.* 2002; 167: 873-5; discussion 876-7.
100. McLaughlin JK, Lipworth L, Tarone RE: Epidemiologic aspects of renal cell carcinoma. *Semin Oncol.* 2006; 33: 527-33.
101. Robles JE, Rosell D, Zudaire JJ, Berián JM: Epidemiología de los tumores del parénquima renal. *Rev Med Univ Navarra.* 1999; 43: 68-76.
102. Giménez Bachs JM, Donate Moreno M^a, Salinas Sánchez AS, Lorenzo Romero JG, Segura Martín M, Hernández Millán IR, et al: Incidencia creciente en el carcinoma de células renales. *Actas Urol Esp.* 2006; 30: 295-300.
103. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin R, de Kernion JB, Belldegrun A: Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors. *J Urol.* 2000; 163: 426-30.
104. Giménez Bachs JM, Salinas Sánchez AS, Hernández Millán IR, Ruiz Mondéjar R, Lorenzo Romero JG, Segura Martín M, et al: Cirugía conservadora de parénquima en los tumores renales. *Rev Clin Esp.* 2004; 204: 191-7.
105. Rosales Bordes A, Salvador Bayarri J, Rodríguez O, Peña JA, Gaya JM, Parada Moreno R, et al: Límites de la cirugía laparoscópica en el tratamiento del tumor renal. *Actas Urol Esp.* 2009; 33: 550-61.
106. Steffens S, Roos FC, Janssen M, Becker F, Steinestel J, Abbas M, et al: Clinical behavior of chromophobe renal cell carcinoma is less aggressive than that of clear cell renal cell carcinoma, independent of Fuhrman grade or tumor size. *Virchows Arch Int J Pathol.* 2014; 465: 439-44.
107. Reuter VE, Presti JC: Contemporary approach to the classification of renal epithelial tumors. *Semin Oncol.* 2000; 27: 124-37.
108. Van Houwelingen KP, van Dijk BA, Hulsbergen-van de Kaa CA, Schouten LJ, Gorissen HJ, Schalken JA, et al: Prevalence of von Hippel-Lindau gene mutations in sporadic renal cell carcinoma: results from the Netherlands cohort study. *BMC Cancer.* 2005; 5: 57.
109. Pai J-T, Hsu C-Y, Hua K-T, Yu S-Y, Huang C-Y, Chen C-N, et al: NBM-T-BBX-OS01, Semisynthesized from Osthole, Induced G1 Growth Arrest through HDAC6 Inhibition in Lung Cancer Cells. *Mol Basel Switz.* 2015; 20: 8000-19.
110. Park MJ, Baek HW, Rhee Y-Y, Lee C, Park JW, Kim HW, et al: Transglutaminase 2 expression and its prognostic significance in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol Transl Med.* 2015; 49: 37-43.

8 BIBLIOGRAFÍA

111. Goldstein NS: Grading of renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am.* 1999; 26: 637-42, vii.
112. López Ferrandis J, Sánchez Zalabardo D, Rioja Zuazu J, Arocena García-Tapia J, Regojo Balboa JM, Fernández Montero JM, et al: Tumores renales incidentales: Factores pronósticos. *Actas Urol Esp.* 2004; 28: 561-6.
113. Ríos González E, Martínez-Piñeiro Lorenzo L: Papel actual de la linfadenectomía y la adrenalectomía en la cirugía radical del cáncer renal. *Actas Urol Esp.* 2009; 33: 562-8.
114. Resel Folkersma LE, Ramírez Rodríguez F, Marrero Domínguez R: Estadaje tumoral y factores pronósticos del carcinoma de células renales. En: *Oncología urológica. 1ª Edición.* Resel Estévez L, Moreno Sierra J. Madrid, España. Edit. Grupo Saned, 2003: 337-56.
115. Patel S, Zebian B, Gurjar S, Pavithran N, Singh K, Liston T, et al: An unusual gallbladder polyp - site of metastatic renal cell carcinoma: a case report. *Cases J.* 2009; 2:172.
116. Zevallos Quiroz JC, Lizarazu Pérez A, Guisasola Gorrochategui E, Medrano Gomez MÁ, Jiménez Agüero R: Metástasis a vesícula biliar de un carcinoma de células renales, un sitio extremadamente raro de diseminación neoplásica. *Cir Esp.* 2014; 92: 295-6.
117. Espy MJ, Smith TF, Persing DH: Dependence of polymerase chain reaction product inactivation protocols on amplicon length and sequence composition. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 2361-5.
118. Lorenzo Romero JG: Determinación de las mutaciones del gen P53 en los tumores de células transicionales de la vejiga urinaria y su implicación con el pronóstico. 2002; Tesis Doctoral. Dpto. de Cirugía de la Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, 2001: 2-40
119. Barnabas N, Amin MB, Pindolia K, Nanavati R, Amin MB, Worsham MJ: Mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) gene refine differential diagnostic criteria in renal cell carcinoma. *J Surg Oncol.* 2002; 80: 52-60.
120. Mattocks C, Tarpey P, Bobrow M, Whittaker J. Comparative sequence analysis (CSA): a new sequence-based method for the identification and characterization of mutations in DNA. *Hum Mutat.* 2000; 16: 437-43.
121. Rodríguez Dorantes M, Téllez Ascencio N, Cerbón MA, López M, Cervantes A. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev Investig Clínica.* 2004; 56: 56-71.

122. Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S: DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. *J Vis Exp [Internet]*. 21 de octubre de 2011 [citado 20 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.jove.com/details.php?id=3170>
123. Martínez Rivera P, Osuna P, Karina A, Soto Domínguez A, García Garza R: Comparación histológica e inmunohistoquímica de muestras de tejido procesadas por la técnica convencional o por el método simplificado de acetonas. *Int J Morphol*. 2011; 29: 575-80.
124. Opavský R, Pastoreková S, Zelník V, Gibadulinová A, Stanbridge EJ, Závada J, et al: Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics*. 1996; 33: 480-7.
125. Ivanov S, Liao S-Y, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, et al: Expression of Hypoxia-Inducible Cell-Surface Transmembrane Carbonic Anhydrases in Human Cancer. *Am J Pathol*. 2001; 158: 905-19.
126. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, et al: Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol*. 2001; 158: 905-19.
127. Gilbert SM, Whitson JM, Mansukhani M, Buttyan R, Benson MC, Olsson CA, et al: Detection of carbonic anhydrase-9 gene expression in peripheral blood cells predicts risk of disease recurrence in patients with renal cortical tumors. *Urology*. 2006; 67: 942-5.
128. Young AN, Dale J, Yin-Goen Q, Harris WB, Petros JA, Datta MW, et al. Current trends in molecular classification of adult renal tumors. *Urology*. 2006; 67: 873-80.
129. Young AN, Master VA, Paner GP, Wang MD, Amin MB: Renal epithelial neoplasms: diagnostic applications of gene expression profiling. *Adv Anat Pathol*. 2008; 15: 28-38.
130. Ficarra V, Galfano A, Novara G, Iafrate M, Brunelli M, Secco S, et al: Risk stratification and prognostication of renal cell carcinoma. *World J Urol*. 2008; 2: 115-25.
131. Barocas DA, Rohan SM, Kao J, Gurevich RD, Del Pizzo JJ, Vaughan ED, et al: Diagnosis of renal tumors on needle biopsy specimens by histological and molecular analysis. *J Urol*. 2006; 176: 1957-62.
132. Salama ME, Worsham MJ, DePeralta-Venturina M: Malignant papillary renal tumors with extensive clear cell change: a molecular analysis by microsatellite analysis and fluorescence in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127: 1176-81.

8 BIBLIOGRAFÍA

133. Rubio Briones J, Algaba Arrea F, Almenar S, Solsona Narbón E: Immunohistoquímica aplicada en urología. *Actas Urol Esp.* 1999; 23: 819-34.
134. McDonald PC, Winum J-Y, Supuran CT, Dedhar S: Recent Developments in Targeting Carbonic Anhydrase IX for Cancer Therapeutics. *Oncotarget.* 2012; 3: 84-97.
135. Sandlund J, Oosterwijk E, Grankvist K, Oosterwijk-Wakka J, Ljungberg B, Rasmuson T: Prognostic impact of carbonic anhydrase IX expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2007; 100: 556-60.
136. Atkins M, Regan M, McDermott D, Mier J, Stanbridge E, Youmans A, et al: Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005; 11: 3714-21.
137. Linehan WM, Walther MM, Zbar B: The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol.* 2003; 170: 2163-72.
138. Kondo K, Yao M, Yoshida M, Kishida T, Shuin T, Miura T, et al: Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002; 34: 58-68.
139. Sun M, Shariat SF, Cheng C, Ficarra V, Murai M, Oudard S, et al: Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review. *Eur Urol.* 2011; 60: 644-61.
140. Linehan WM, Lerman MI, Zbar B. Identification of the von Hippel-Lindau (VHL) gene. Its role in renal cancer. *JAMA.* 1995; 273: 564-70.
141. Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG: Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med.* 1995; 1: 822-6.
142. Ma X, Yang K, Lindblad P, Egevad L, Hemminki K: VHL gene alterations in renal cell carcinoma patients: novel hotspot or founder mutations and linkage disequilibrium. *Oncogene.* 2001; 20: 5393-400.
143. Schraml P, Struckmann K, Hatz F, Sonnet S, Kully C, Gasser T, et al: VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol.* 2002; 196: 186-93.
144. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, et al: Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet.* 1994; 7: 85-90.
145. Brauch H, Weirich G, Brieger J, Glavac D, Rödl H, Eichinger M, et al: VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res.* 2000; 60: 1942-8.

146. Martinez A, Fullwood P, Kondo K, Kishida T, Yao M, Maher ER, et al: Role of chromosome 3p12-p21 tumour suppressor genes in clear cell renal cell carcinoma: analysis of VHL dependent and VHL independent pathways of tumorigenesis. *Mol Pathol.* 2000; 53: 137-44.
147. Bailly M, Bain C, Favrot MC, Ozturk M: Somatic mutations of von Hippel-Lindau (VHL) tumor-suppressor gene in European kidney cancers. *Int J Cancer.* 1995; 63: 660-4.
148. Bérout C, Joly D, Gallou C, Staroz F, Orfanelli MT, Junien C: Software and database for the analysis of mutations in the VHL gene. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 256-8.
149. Gallou C, Joly D, Méjean A, Staroz F, Martin N, Tarlet G, et al: Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. *Hum Mutat.* 1999; 13: 464-75.
150. Doenlson JE: Regulación de la expresión génica. En: *Bioquímica.* 2ª Edición. Devlin TM. Barcelona, España. Edit. Reverté, S.A. 1989: 969-1020.
151. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: Trastornos genéticos. En: *Patología estructural y funcional.* 4ª Edición. Madrid, España. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Edit McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A. 1990: 125-68.
152. Herman JG, Baylin SB: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003; 349: 2042-54.
153. Leone G, Teofili L, Voso MT, Lübbert M: DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica.* 2002; 87: 1324-41.
154. Yuan Y, Mendez R, Sahin A, Dai JL: Hypermethylation Leads to Silencing of the SYK Gene in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 5558-61.
155. Salinas-Sánchez AS, Rubio-del-Campo A, Sánchez-Sánchez F, Giménez-Bachs JM, Donate-Moreno MJ, García-Olmo DC, et al: Hipermetilación del promotor del gen reparador *hMLH1* en la patogenia del carcinoma de células renales esporádico. *Med Clin (Barc).* 2006; 126: 452-4.
156. Bird A: DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002; 16: 6-21.
157. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100: 57-70.

8 BIBLIOGRAFÍA

158. Mack GS: Epigenetic cancer therapy makes headway. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98: 1443-4.
159. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, et al: Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91: 9700-4.
160. Graff JR, Herman JG, Myöhänen S, Baylin SB, Vertino PM: Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J Biol Chem.* 1997; 272: 22322-9.
161. Clifford SC, Prowse AH, Affara NA, Buys CH, Maher ER: Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumourigenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998; 22: 200-9.
162. Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, Hornigold N, Astuti D, Cohen D, et al: Genetic and Epigenetic Analysis of von Hippel-Lindau (VHL) Gene Alterations and Relationship with Clinical Variables in Sporadic Renal Cancer. *Cancer Res.* 2006; 66: 2000-11.
163. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, et al: Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 4726-34.
164. Salinas-Sánchez AS, Atienzar-Tobarra M, Lorenzo-Romero JG, Sánchez-Sánchez F, Giménez-Bachs JM, Donate-Moreno MJ, et al: Sensitivity and specificity of p53 protein detection by immunohistochemistry in patients with urothelial bladder carcinoma. *Urol Int.* 2007; 79: 321-7.
165. Vet JA, Bringuier PP, Schaafsma HE, Witjes JA, Debruyne FM, Schalken JA: Comparison of P53 protein overexpression with P53 mutation in bladder cancer: clinical and biologic aspects. *Lab Invest.* 1995; 73: 837-43.
166. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al: Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998; 394: 485-90.
167. Dang CV, Semenza GL: Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24: 68-72.
168. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L: Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* 2000; 19: 4298-309.

169. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, et al: Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: 423-7.
170. Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, et al: Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* 2000; 275: 25733-41.
171. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al: The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999; 399: 271-5.
172. Patard J-J, Rioux-Leclercq N, Masson D, Zerrouki S, Jouan F, Collet N, et al: Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2009; 101: 1417-24.
173. Pavlovich CP, Schmidt LS, Phillips JL: The genetic basis of renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am.* 2003; 30: 437-54, vii.
174. Song SH, Jeong IG, You D, Hong JH, Hong B, Song C, et al: VEGF/VEGFR2 and PDGF-B/PDGFR- β expression in non-metastatic renal cell carcinoma: a retrospective study in 1,091 consecutive patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7: 7681-9.
175. Schweppe RE, Cheung TH, Ahn NG: Global gene expression analysis of ERK5 and ERK1/2 signaling reveals a role for HIF-1 in ERK5-mediated responses. *J Biol Chem.* 2006; 281: 20993-1003.
176. Sohn SJ, Sarvis BK, Cado D, Winoto A: ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem.* 2002; 277: 43344-51.
177. Hayashi M, Kim S-W, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Abel ED, Eliceiri B, et al: Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. *J Clin Invest.* 2004; 113: 1138-48.
178. Simões AES, Pereira DM, Gomes SE, Brito H, Carvalho T, French A, et al: Aberrant MEK5/ERK5 signalling contributes to human colon cancer progression via NF- κ B activation. *Cell Death Dis.* 2015; 6: e1718.

8 BIBLIOGRAFÍA

ANEXO1

-TABLA RESUMEN GENERAL DE RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS A LOS CCRCC Y SU CLÍNICA.

Muestra	Mutado	Metilado	CA-IX WB	CA-IX IHQ	VHL IHQ	HIF IHQ	VEGF IHQ	ERK5 WB	ERK2WB	Grado Fuhrman	pT	pN	pM	TNM
01-06	No	Si	+	+	+	+	+	+	=	3	pT3b	pNx	pM1	IV
02-06	No	No	+	+	+	+	+	+	=	2	pT1a	pNx	pMx	I
03-06	No	No	+	+	+	+	-	-	=	3	pT1a	pNx	pMx	I
05-06	No	No	+	+	+	+	+	+	=	2	pT2	pNx	pMx	II
06-06	Si	No	+	+	+	+	+	+	=	3	pT1b	pNx	pMx	I
07-06	No	No	+	+	+	+	+	+	=	2	pT3b	pNx	pM1	IV
08-06	No	No	+	+	+	+	+	+	=	2	pT1b	pNx	pMx	I
09-06	Si	No	+	+	+	+	-	+	=	1	pT1b	pNx	pMx	I
10-06	No	No	-	+	+	+	+	-	=	2	pT1b	pNx	pMx	I
01-07	No	No	+	+	+	-	+	-	+	3	pT2	pNx	pM1	IV
04-07	No	Si	+	+	+	+	+	-	=	3	pT1b	pNx	pM0	I
07-07	No		+	+	-			+	=	4	pT1b	pNx	pMx	I
09-07	No	No	+	+	+	+	+	+	=	2	pT1a	pNx	pM1	IV
10-07	No	No	+	+	+	+	+	-	=	2	pT1b	pNx	pM0	I
14-07	Si	No	+	+	+	+	+	+	=	2	pT2	pNx	pM0	II
15-07	No	Si	+	+	+	+	+	+	=	4	pT3b	pN0	pM1	IV
20-07	Si	No	+	+	+	+	+	+	=	2	pT3a	pNx	pM1	IV
01-08	Si	Si	+	+	+	+	+	-	=	4	pT3b	pNx	pM1	IV
02-08	Si		+	+	+	+	-	-	=	2	pT1b	pNx	pM0	I
05-08	No	No	+	+	-	+	+	+	=	4	pT3a	pNx	pM1	IV
06-08	No	No	+	+	+	-	-	-	=	3	pT2	pNx	pM0	II
07-08	No	No	+	+	+	+	-	-	=	2	pT1a	pNx	pM0	I
08-08	Si	No	+	+	+	+	+	+	=	1	pT1a	pNx	pM0	I
09-08	No		+	+	+			+	=	4	pT3a	pNx	pM1	IV
12-08	No		-	+	-			+	=	4	pT3b	pNx	pM1	IV
13-08	No	No	+	+	+	+	+	-	=	2	pT2	pN0	pM0	II
15-08	No	No	+	+	-	-	+	+	=	4	pT3b	pNx	pM1	IV
18-08	No	No	+	+	+	+	-	+	=	2	pT2	pNx	pM1	IV
01-09	Si	Si	+	+	+	+	-	-	=	2	pT1b	pNx	pM0	I
02-09	No	No	+	+	-	-	-	+	=	3	pT2	pN0	pMx	II
03-09	No	No	+	+	+	+	-	-	=	2	pT2	pN0	pM0	II
04-09	No	No	+	+	+	+	-	+	=	2	pT1b	pNx	pM0	I
05-09	No	Si	+	+	+	+	-	+	=	3	pT2	pNx	pM0	II
06-09	No	No	+	+	+	+	+	+	=	4	pT3a	pNx	pM1	IV
07-09	Si	No	+	+	-	-	+	+	=	4	pT1b	pNx	pM1	IV
08-09	No	No	+	+	+	+	-	-	=	2	pT1a	pNx	pM0	I
09-09	No	No	+	+	+	+	-	-	=	1	pT1b	pNx	pM0	I
11-09	No	No	+	+	-	+	+	+	=	4	pT3b	pN0	pM1	IV
12-09	Si	No	+	+	+	+	-	-	=	1	pT3a	pNx	pMx	III
01-10	No	No	+	+	+	+	+	-	+	3	pT2	pNx	pMx	II
04-10	No	Si	+	+	-	+	+	+	+	3	pT1a	pNx	pM1	IV
05-10	Si	No	+	+	+	+	-	-	=	2	pT3a	pNx	pMx	III
06-10	No	No	+	+	+	+	+	-	=	3	pT1a	pNx	pMx	I
08-10	No	No	+	+	+	+	+	-	=	2	pT1b	pNx	pM0	I
09-10	No	Si	+	+	+	+	+	-	=	4	pT3a	pNx	pM1	IV
10-10	No	Si	+	+	+	+	+	+	=	3	pT3a	pNx	pM1	IV
11-10	Si	No	+	+	+	+	+	+	=	2	pT1a	pNx	pM0	I
03-11	No	No	+	+	+	+	+	+	=	3	pT2	pNx	pMx	II
05-11	Si	No	+	+	+	+	-	-	=	2	pT2	pNx	pM1	IV
07-11	No	No	+	+	+	+	+	+	=	3	pT2	pN0	pM0	II

ANEXO²

**-PREMIOS, COMUNICACIONES Y PUBLICACIONES
DERIVADAS DE ESTE ESTUDIO:**

Segundo Premio “Julián Gutiérrez de Toledo”, a la mejor comunicación oral que será presentada en el LXXIX Congreso Nacional de Urología, por el trabajo: “Caracterización molecular de una serie de tumores renales” celebrado 14 de junio del 2014 y otorgado por la Fundación para la Investigación en Urología (FIU).

LXXIX Congreso Nacional de Urología. 14 de Junio de 2014. Presentación oral: Alteraciones en el gen *vhl* y en su expresión proteica y sus consecuencias clínicas, diagnósticas y pronósticas. Giménez Bachs J.M.; **Serrano Oviedo, L.**; Sánchez Prieto, R.; Nam Cha, S.H.; Moreillo Vicente, L.; Agustí Martínez, A.; Salinas Sánchez, A.S.

LXXIX Congreso Nacional de Urología. 14 de Junio de 2014. Presentación oral: Caracterización molecular de una serie de tumores renales. Salinas Sanchez, A.S.; **Serrano Oviedo, L.**; Sanchez Prieto, R.; Nam Cha, S.Y.; Moreillo Vicente L., Fernandez Anguita P.J.; Nuñez Sarrion, M.A.; Gimenez Bachs, J.M.

LXXVII Congreso Nacional de la Asociación Española de Urología. Vigo. 13-16 de Junio de 2012. Poster: ERK 5 como marcador molecular de pronóstico en el carcinoma de células claras de aparición esporádica. Giménez Bachs JM, **Serrano Oviedo L**, Salinas Sánchez AS, Arias L, Nam Cha SH, Perán Teruel M, Núñez Sarrión MA, Sánchez Prieto R.

LXXVII Congreso Nacional de la Asociación Española de Urología. Vigo. 13-16 de Junio de 2012. Poster: Valor pronóstico de la expresión de VHL, HIF-1alfa y VEGF en el carcinoma renal de células claras. Salinas Sánchez AS, Nam Cha SH, **Serrano Oviedo L**, Giménez Bachs JM, Martínez Sanchiz C, Fernández Anguita PJ, Sánchez Prieto R.

XXVII Reunión Nacional del Grupo de Urología Oncológica, 9 y 10 de Abril del 2010. Presentación de poster: Utilidad diagnóstica y pronóstica de CA-IX en el carcinoma renal de células claras. **Serrano Oviedo, L**; Giménez Bachs, J.M.; Salinas Sánchez, A.S.; Rubio del Campo,A; Martínez Sanchiz, C; Martínez Ruiz, J.; Carrión López, P.;Perán Teruel, M.; Nam-Cha, S.H.; Sánchez Prieto,R. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Centro Regional de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Castilla la Mancha.

ERK5/BMK1 Is a Novel Target of the Tumor Suppressor VHL: Implication in Clear Cell Renal Carcinoma^{1,2}

Laura Arias-González^{*,3},
Inmaculada Moreno-Gimeno^{*,3},
Antonio Rubio del Campo^{†,3},
Leticia Serrano-Oviedo[†], María Llanos Valero^{*},
Azucena Esparis-Ogando[‡],
Miguel Ángel de la Cruz-Morcillo^{*},
Pedro Melgar-Rojas^{*}, Jesús García-Cano^{*},
Francisco José Cimas^{*}, María José Ruiz Hidalgo[§],
Alfonso Prado[¶], Juan Luis Callejas-Valera^{*},
Syong Hyun Nam-Cha[#],
José Miguel Giménez-Bachs^{**},
Antonio S. Salinas-Sánchez^{**},
Atanasio Pandiella[‡], Luis del Peso[¶]
and Ricardo Sánchez-Prieto^{*}

*Laboratorio de Oncología Molecular, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas/University of Castilla la Mancha (CRIB/UCLM), Albacete, Spain; [†]Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Albacete, Spain; [‡]Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; [§]Departamento de Química Orgánica, Inorgánica y Bioquímica, CRIB/Facultad de Medicina, UCLM, Albacete, Spain; [¶]Departamento de Bioquímica, Universidad Autónoma de Madrid and Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; [#]Departamento de Anatomía Patológica, CHUA, Albacete, Spain; ^{**}Servicio de Urología, CHUA, Albacete, Spain

Abstract

Extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5), also known as big mitogen-activated protein kinase (MAPK) 1, is implicated in a wide range of biologic processes, which include proliferation or vascularization. Here, we show that ERK5 is degraded through the ubiquitin-proteasome system, in a process mediated by the tumor suppressor *von Hippel-Lindau* (*VHL*) gene, through a prolyl hydroxylation-dependent mechanism. Our conclusions derive from transient transfection assays in Cos7 cells, as well as the study of endogenous ERK5 in different experimental systems such as MCF7, HMEC, or Caki-2 cell lines. In fact, the specific knockdown of ERK5 in pVHL-negative cell lines

Abbreviations: ERK5/*ERK5*, extracellular signal-regulated kinase 5 (protein/*gene*); pVHL/*VHL*, von Hippel-Lindau protein/*gene*; CCRCC, clear cell renal cell carcinoma; HIF1a/*HIF1a*, hypoxia-inducible factor 1α (protein/*gene*); UPS, ubiquitin-proteasome system; DMOG, dimethylxalylglycine; PHDs, prolyl hydroxylase domain proteins. Address all correspondence to: Ricardo Sánchez-Prieto, PhD, Molecular Oncology Laboratory, CRIB/Parque Científico y Tecnológico de Albacete, University of Castilla-La Mancha, C/Almansa 14, Albacete 02006, Spain. E-mail: ricardo.sanchez@uclm.es

¹This work was supported by grants from Fundación Leticia Castillejo Castillo and Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2009-07329 and SAF2012-30862) and grant JCCM PPII10-0141-040 to R.S.P., grant FIS PI080432 and a grant from Fundación Para la Investigación en Urología to A.S.S.-S., grant FISCAM PI2007-38 to J.M.G.-B., and grant FIS PS09/00868 to A.E.-O. R.S.P. and A.P. Research Institutes and the work carried out in their laboratories receive support from the European Community through the Regional Development Funding Program (FEDER). The authors declare that there are no competing financial interests in relation to the work described.

²This article refers to supplementary materials, which are designated by Figures W1 to W7 and are available online at www.neoplasia.com.

³These authors contributed equally to this work.

Received 12 November 2012; Revised 20 March 2013; Accepted 24 March 2013

Copyright © 2013 Neoplasia Press, Inc. All rights reserved 1522-8002/13/\$25.00
DOI 10.1593/neo.121896

promotes a decrease in proliferation and migration, supporting the role of this MAPK in cellular transformation. Furthermore, in a short series of fresh samples from human clear cell renal cell carcinoma, high levels of ERK5 correlate with more aggressive and metastatic stages of the disease. Therefore, our results provide new biochemical data suggesting that ERK5 is a novel target of the tumor suppressor *VHL*, opening a new field of research on the role of ERK5 in renal carcinomas.

Neoplasia (2013) 15, 649–659

Introduction

Extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5), also known as big mitogen-activated protein kinase (MAPK) 1, is a member of the MAPK family that shows greatest similarity to the ERK1/2 family members, sharing 66% sequence identity in the amino-terminal half, as well as in the activation loop motif (Thr-Glu-Tyr), while the carboxy-terminal half of ERK5 is unique [1]. ERK5 is activated in response to cell stress and growth factors [2,3] through its selective phosphorylation by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MEK5) [4]. In contrast to the detailed knowledge about the regulation of its activity, the molecular mechanisms controlling ERK5 protein expression levels remain poorly understood. A recent report suggested a role for *c-Abl* in the regulation of ERK5 half-life, but the mechanism is still unclear [5].

ERK5 participates in several processes including proliferation, angiogenesis, and vasculature maintenance [6,7]. ERK5 is known to mediate the effects of different oncogenes [8,9], and its signaling has been found altered in several human tumors [10–12]. In particular, the role of ERK5 in angiogenesis and endothelial function has been clearly demonstrated in several experimental systems [13,14]. In this regard, several studies have shown that hypoxia-inducible factor 1, α subunit (HIF-1 α), a critical mediator in the cellular response to hypoxia and angiogenesis, is regulated by several MAPKs including ERK5 [15–17]. One of the proposed mechanisms involves ubiquitin-dependent degradation of HIF-1 α mediated by ERK5 [15]. Interestingly, gene profiling studies demonstrated that there is a large overlap between the gene expression patterns regulated by ERK5 and HIF-1 α , with 82% of the genes specifically regulated by ERK5 being modulated in response to hypoxia through HIF-1 α [18]. Under normoxia, HIF-1 α is efficiently hydroxylated at two proline residues by a family of dioxygenases [EGL nine homologs (EGLNs), also known as prolyl hydroxylase domain proteins (PHDs)] that require oxygen as co-substrate. This posttranslational modification labels HIF-1 α for proteasomal degradation, as the proline-hydroxylated form is recognized by an E3 ubiquitin ligase complex that contains the von Hippel-Lindau (pVHL) tumor suppressor protein. Thus, under normal oxygen tension, HIF-1 α half-life is extremely short and normoxic protein levels are very low [19]. Importantly, VHL is a key tumor suppressor in clear cell renal cell carcinoma (CCRCC), where up to 75% to 80% of the cases present a loss of function of the *VHL* [20].

Our results demonstrate that ERK5 is a novel target for the pVHL tumor suppressor that is labeled for ubiquitin-proteasome system (UPS)-mediated degradation upon proline hydroxylation. Moreover, there was a strong correlation between ERK5 expression and poor prognosis in human samples from CCRCC, suggesting that ERK5 deregulation could contribute to tumor progression and may repre-

sent a novel target for therapeutic intervention using drugs that block ERK5 activity.

Materials and Methods

Cell Lines and Plasmids

Cells were maintained in 5% CO₂ and 37°C. All culture reagents were provided by Lonza (Madrid, Spain). Cos7 cells were purchased from ATCC (LGC Promochem, Barcelona, Spain), and cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FBS and 1% glutamine plus antibiotics. 786-0 (ATCC), 769-P cells (ATCC), and Caki-2 (kindly provided by Dr A. Meseguer, Centre d'Investigació en Bioquímica i Biologia Molecular, Barcelona, Spain) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FBS, 1% glutamine plus antibiotics, and 1% non-essential amino acids (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). MCF7 cells have been previously described [21]. HMEC cells were kindly provided by Dr L. Alvarez-Vallina (Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain) and cultured in 95% EBM-2 plus bovine brain extract (BBE), epidermal growth factor, hydrocortisone, GA-1000 antibiotics, and 5% FBS. Plasmids encoding for green fluorescent protein (GFP), haemagglutinin (HA)-ERK5 wild type (WT), and MEK5 hyperactive (DD) in pCEFL were kindly provided by Dr S. Gutkind [Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD]. WT HA-ERK5 and mutants forms AEF and Δ 713 in pCDNA3 were generous gifts from Dr M. Buschbeck (Institut de Medicina Predictiva i Personalitzada del Cancer, Badalona, Spain). Flag-tagged pVHL was obtained by conventional polymerase chain reaction (PCR) procedures using as template a plasmid coding HA-pVHL kindly provided by Dr M. Ortiz de Landáuzuri (Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain). Briefly, the following primers were used: forward, 5'-ACAGGATCCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAAGCCCCGAGGGCGGAGAACTGG-3', which include a *Bam*HI site plus 3X Flag-tagged epitope between codons 1 and 2, and reverse, 5'-CACAGAATTCTCAATCTCCCATCCGTTGATGTGC-3' including an *Eco*RI site. PCR conditions were 95°C for 2 minutes for the first cycle and then 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 60°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute with a final extension of 72°C for 5 minutes. The PCR products were cloned in pCDNA3.1 (Invitrogen, Barcelona, Spain) vectors using the *Bam*HI/*Eco*RI sites. DNA was confirmed by automatic sequencing. HA-pVHL WT and C162F mutant form in pRc/CMV vector were kindly provided by Dr W. Kaelin through Addgene (Plasmid Nos 19999 and 22042; Cambridge, MA). Plasmids coding for Flag-tagged PHD-1 and PHD-3 were kindly provided

by Dr F. S. Lee (School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA).

Chemicals and Antibodies

Antibodies against VHL, ubiquitin, and hydroxylated HIF were purchased from Cell Signaling Technology (Izasa, Barcelona, Spain). Antibodies against ERK5 were produced in our laboratory [21] or from Cell Signaling Technology. HA antibody was purchased from Covance (Princeton, NJ). Antibodies against ERK2 and tubulin were from Santa Cruz Biotechnology (Quimigen, Madrid, Spain). Antibody against Flag, cycloheximide, dimethylxalylglycine (DMOG), and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were obtained from Sigma-Aldrich. MG-132 was purchased from Calbiochem (Bionova, Madrid, Spain).

Transfections

Cells were transiently transfected by using Lipofectamine (Invitrogen) following the manufacturer's instruction. The total amount of DNA was normalized using an empty vector. Transfected cells were used 36 to 48 hours after transfection for the different assays.

Western Blot Analysis, Immunoprecipitation, and Co-Immunoprecipitation Assays

Cells were collected in lysis buffer [100 mM Hepes (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 5 mM EDTA, and 0.125 M EGTA]. Protease and phosphatase inhibitors [0.2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml, aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 0.1 mM Na₃VO₄] were added before lysis. Indicated amounts of protein were loaded onto 6% to 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) filters, and blotted against different proteins using specific antibodies. In the case of human samples, tissues were disaggregated by using the POLYTRON Dispersing System PT 2100 (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) in lysis buffer and processed as in the rest of the cases. Protein quantification was performed using the BCA Protein Assay Kit (Pierce, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions. In the immunoprecipitation assays, extracts were precleared and soluble fractions were incubated with the indicated antibody. After 2 hours, extracts were incubated for 45 minutes in the presence of protein G (Gamma bind Sepharose; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and then washed three times in the same lysis buffer. Then, immunocomplexes were resuspended in loading buffer and loaded onto sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis gels. For the co-immunoprecipitation assays, 293T cells were transfected with 3 µg of indicated plasmid by using Lipofectamine and, 48 hours later, were lysated in HNTG buffer [22] and processed as in immunoprecipitation assays. Antibody detection was achieved by enhanced chemiluminescence (Amersham, GE Healthcare, Barcelona, Spain). Results show a representative blot of three with nearly identical results. Images were quantified by using ImageJ software (NIH).

Immunocytochemistry

Samples were processed as previously described [23]. In the case of exogenous protein, cells were grown onto glass coverslips and then transfected as described above. Samples were then incubated with the indicated antibody overnight and, after extensive wash, incubated 60 minutes with Alexa Fluor 488– or Alexa Fluor 546–

conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Invitrogen Molecular Probes). Then, samples were mounted with Fluorosave (Dako, Barcelona, Spain). Positive immunofluorescence was detected using a Zeiss LSM-710 confocal microscope. Images were acquired and processed using Zen 2009 Light Edition program.

Patient's Samples and Analysis

Fresh samples of 19 cases were obtained from patients diagnosed and surgically treated for CCRCC in the Urology Department of the University Complex of Albacete, under the supervision of the local ethical committee and the pathologist with the purpose of not interfering in the histologic evaluation. All cases were reviewed and diagnosed according to the criteria of the World Health Organization classification. Bivariate analysis was performed with the Pearson chi-squared test to evaluate the correlation between tumor stage and Fuhrman grade with the expression level of ERK5. Stage variable was recorded at low risk of disease progression (stages I and II) and high risk (stages III–IV) by using PASW Statistics 18 v.18.0.0 program.

RNA Isolation, Reverse Transcription, and Real-Time Quantitative PCR

Total RNA was obtained, and reverse transcription (RT) performed as previously described [23]. Changes in the mRNA expression of ERK5 and VHL were examined by real-time quantitative PCR using an ABI PRISM 7500 FAST Sequence Detection System (Applied Biosystems, Madrid, Spain). cDNA was amplified using SYBR1 Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) in the presence of specific oligonucleotides. The PCR conditions and quantification were performed as previously described [23]. Primers for all target sequences were designed using the computer Primer Express software program especially provided with the 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Chosen PCR primers were given as follows:

ERK5: sense, 5'-GGCCCTGAAAGAATAAACCC-3'; antisense, 5'-CGAAGGATGGCCAACTCAATC-3';
VHL: sense, 5'-GACCTGGAGCGGCTGACA-3'; antisense, 5'-TACCATCAAAGCTGAGATGAAACA-3';
GAPDH: sense, 5'-TCGTGGAAGGACTCATGACCA-3'; antisense, 5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGA-3'.

Interference Assays

siRNA for VHL was purchased from Dharmacon (Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA; ON-TARGETplus SMARTpool Human VHL, Catalog No. L-003936-00 and ON-TARGETplus CONTROL pool, Catalog No. D-001810-10-05) and used following the manufacturer's recommendations. For siRNA assays, cells were transfected by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

Stable knockdown of endogenous ERK5 in 769-P cells was performed by using lentiviral vectors containing shRNA for ERK5 from Sigma-Aldrich (Catalog No. NM_139034). Lentivirus production and infections were performed as previously described [23]. 769-P cells were selected with puromycin (3 µg/ml) and best performing shRNA was selected.

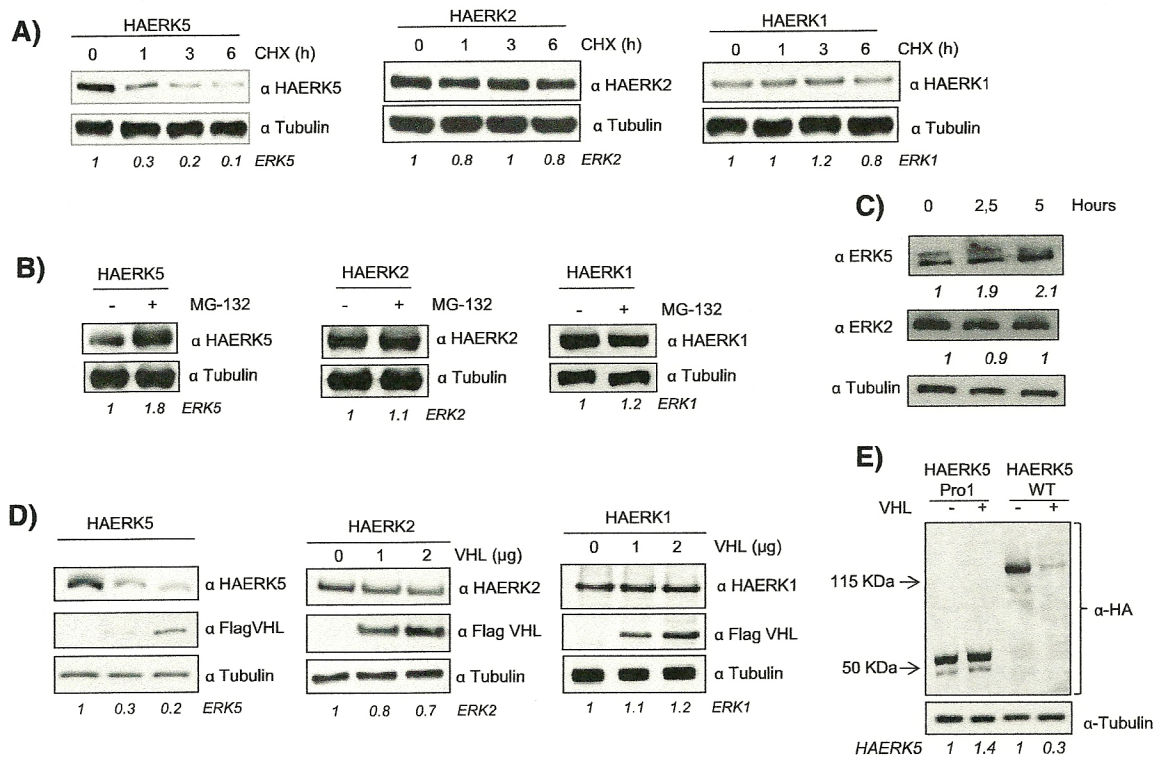


Figure 1. HA-ERK5 is degraded through the proteasome. (A) Cos7 cells were transfected with 0.5 μ g of HA-ERK5, HA-ERK2, and HA-ERK1 and, 36 hours later, treated with 100 μ M cycloheximide for the indicated times. Then, 30 μ g of total cell lysates (TCLs) were blotted against indicated antibodies. (B) Cos7 cells were transfected as in A and treated with 20 μ M MG132 for 5 hours. Then, 30 μ g of TCLs were blotted against HA and tubulin. (C) Cos7 cells were treated with 20 μ M MG132 for indicated times. Then, 60 μ g of TCLs were blotted against ERK5, ERK2, and tubulin. (D) Cos7 cells were transfected with 0.5 μ g of HA-ERK5, HA-ERK2, and HA-ERK1 plus increasing amounts of Flag-VHL. Thirty-six hours later, 30 μ g of TCLs were blotted against the indicated antibodies. (E) Western blot of Cos7 cells transfected with 0.5 μ g of HA-ERK5 Pro1 or HA-ERK5 WT in the presence or absence of 2 μ g of Flag-VHL. Lysates were blotted against HA and tubulin as loading control. Fold variation of these experiments for each MAPK is shown at the bottom of each panel.

Cell Proliferation Measurements

Subconfluent monolayer cultures were trypsinized, and cells were plated in 24-well plates at a density of 10,000 cells per well. Cell proliferation was analyzed at 1, 2, 3, 4, and 5 days by an MTT-based assay. Briefly, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) at 0.5 mg/ml was added to the medium in each well and plates were returned to the incubator for 1 hour. The medium-MTT was then removed, 500 μ l of DMSO was added to each well, and the plate was kept in agitation for 5 minutes in the dark to dissolve the MTT-formazan crystals. The absorbance of the samples was then recorded at 570 nm. Four wells were analyzed for each condition, and wells containing medium plus MTT but no cells were used as blanks.

Migration Assays

To perform wound healing assays, cells were grown to confluence (>90%) in six-well dishes. A small area was then disrupted by scratching the monolayer with a 1000- μ l plastic pipette tip. Cells were inspected microscopically every 12 hours. The remaining wound area was calculated using ImageJ software (NIH), and the migration distance of the cells was estimated on the basis of that calculation.

Data Analysis

Results are represented as means \pm SD of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.00 software. Significance was determined using a *t* test. The statistical significance of differences was indicated in the figures by asterisks as follows: **P* < .05, ***P* < .01, and ****P* < .001.

Results

ERK5 Is Degraded through the UPS

To study the mechanism controlling ERK5 protein expression level, we transiently transfected Cos7 cells with an HA-tagged version of ERK5 and determined protein levels at different time points after inhibition of protein synthesis with cycloheximide. As shown in Figure 1A, the half-life of exogenous HA-ERK5 was much shorter than that of HA-ERK1/2. To investigate the participation of the proteasome in the degradation of these proteins, we used the well-established inhibitor MG132 [24]. This experiment revealed that ERK5, but not ERK1 or ERK2, accumulated upon proteasomal blockade (Figure 1B). Furthermore, similar result was obtained when endogenous ERK5 was analyzed in response to MG132 (Figure 1C).

In the proteasome-mediated degradation, proteins are labeled for degradation by covalent binding to the protein ubiquitin in a reaction that requires an E3 complex containing a specific substrate recognition subunit. In the case of HIF-1 α , the specificity of the E3 ligase complex is conferred by the protein pVHL [25]. Thus, given the functional similitude between ERK5 and HIF-1 α , we studied the role of pVHL as a putative E3 ubiquitin ligase for ERK5. To this end, HA-tagged versions of ERK5, ERK2, and ERK1 were transiently co-transfected with increasing amounts of a plasmid coding for Flag-tagged pVHL. As shown in Figure 1D, overexpression of pVHL results in a marked reduction of HA-ERK5 levels, whereas HA-ERK2 and HA-ERK1 remained largely unaffected. A mutant lacking C-terminal

region of ERK5 (HA-ERK5 Pro1), which renders a protein highly similar to ERK1/2 [4,26], was not affected by the overexpression of pVHL (Figure 1E).

To further confirm the role of VHL as a putative E3 ubiquitin ligase for ERK5, HA-ERK5 and Flag-VHL were co-transfected in Cos7 cells and their ubiquitination pattern was evaluated in the presence or absence of MG132. As expected (Figure 2A), overexpression of pVHL resulted in the accumulation of ubiquitinated forms of HA-ERK5. Indeed, the use of a mutant form of pVHL as C162F with impaired binding to Cul2 and elongins B and C [27] did not show a detectable effect onto HA-ERK5 compared to WT (Figure W1), supporting the role of pVHL as an E3 ubiquitin ligase for ERK5.

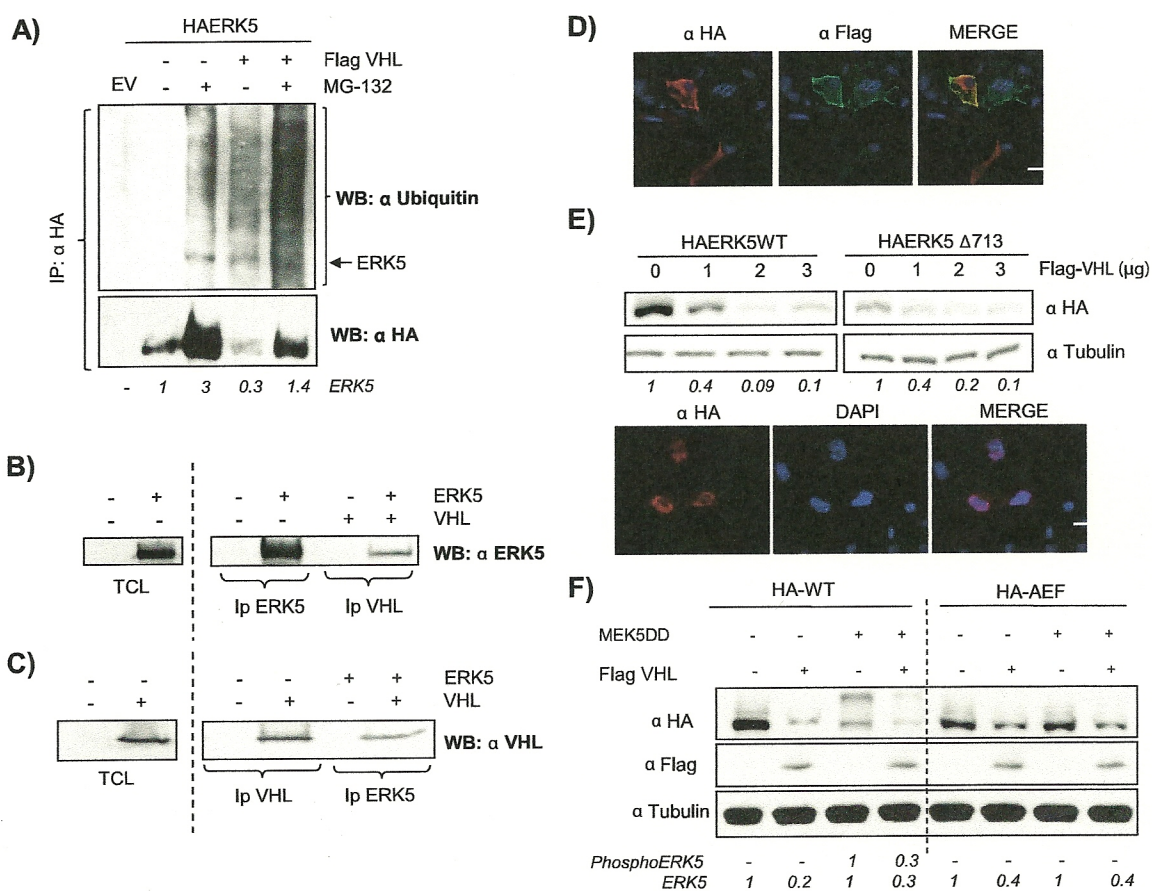


Figure 2. pVHL promotes ERK5 degradation. (A) Cos7 cells were transfected with 0.5 μ g of HA-ERK5 and with 3 μ g of Flag-VHL. Thirty-six hours after transfection, cells were incubated in the presence or absence of 20 μ M MG-132 for 5 hours. Cells were immunoprecipitated against HA and blotted against ubiquitin. Lower panel showed reblotting of the membrane against HA. HA-ERK5 fold variation observed in this experiment is shown at the bottom. (B) 293T cells were transfected with 5 μ g of HA-ERK5 and 5 μ g of Flag-VHL. Samples were immunoprecipitated and immunoblotted with indicated antibodies. As positive controls, TCLs overexpressing HA-ERK5 were blotted against HA. (C) Same as B. As positive controls, TCLs overexpressing Flag-VHL were blotted against Flag. (D) Cos7 cells were transfected with 0.25 μ g of HA-ERK5 and 0.25 μ g of Flag-VHL, and subcellular distributions of both proteins were evaluated by immunofluorescence. Image shows a representative field of five. The scale bar represents 10 μ m. (E) Upper panel: Cos7 cells were transfected with 0.5 μ g of HA-ERK5 WT or HA-ERK5 Δ 713 with increasing amounts of Flag-VHL. Thirty-six hours later, 30 μ g of TCLs were blotted against HA or tubulin. Fold variation of this experiment is shown at the bottom. Lower panel: Cos7 cells were transfected with 0.25 μ g of HA-ERK5 Δ 713 and processed as in D. (F) Cos7 cells were transfected with 0.5 μ g of HA-ERK5 or HA-ERK5-AEF, 1.5 μ g of MEK5DD, and 3 μ g of Flag-VHL at the indicated combinations. TCLs were processed as in E. Fold variation for both proteins in this experiment is shown at the bottom.

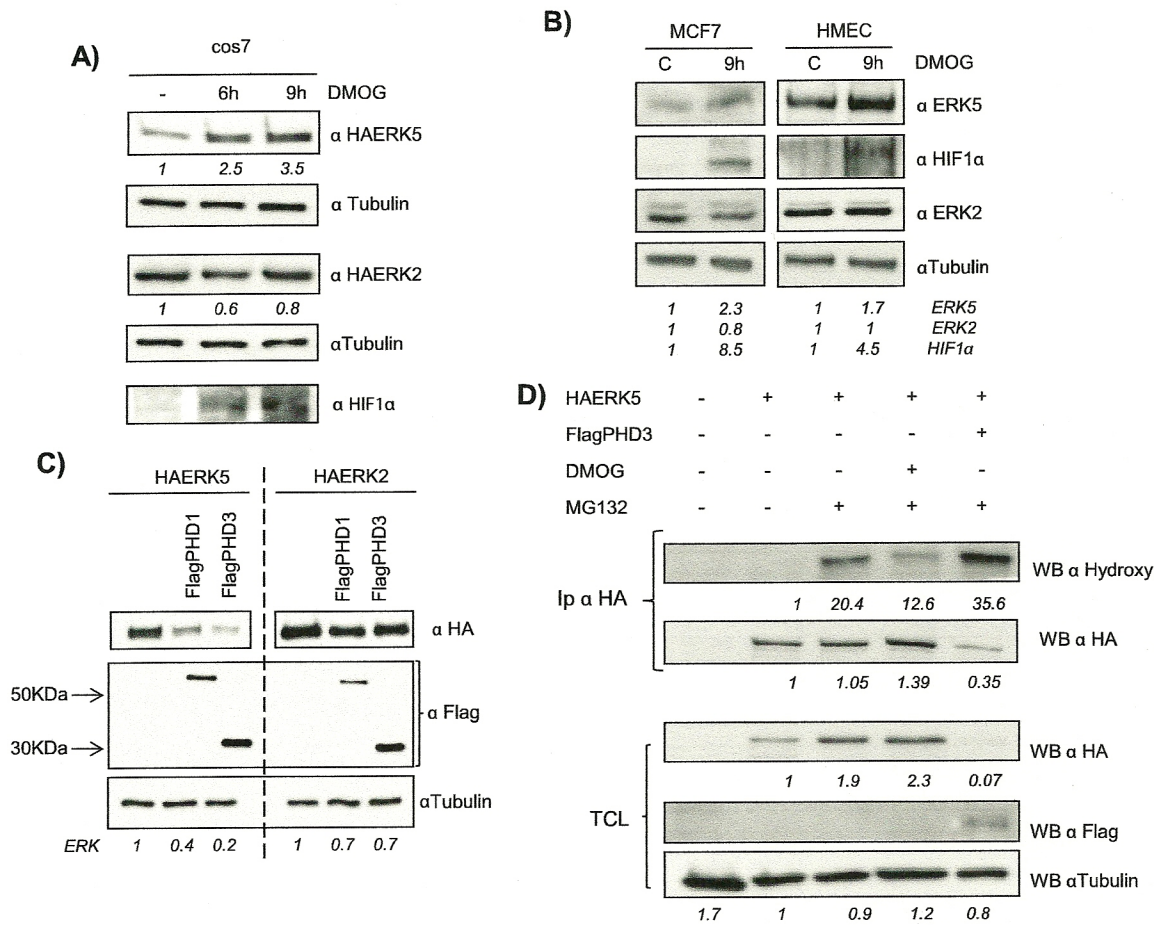


Figure 3. ERK5 levels are regulated through a prolyl hydroxylation mechanism. (A) Cos7 cells were transfected as in Figure 1A. Thirty-six hours later, cells were treated with 1.5 mM DMOG at indicated times. TCLs were blotted against HA, HIF-1 α , and tubulin. (B) Subconfluent cultures of MCF7 and HMEC cell lines were treated with 1.5 mM DMOG for 9 hours and endogenous levels of ERK5 (60 μ g), ERK2 (30 μ g), HIF-1 α (60 μ g), and tubulin (10 μ g) were detected by immunoblot analysis using TCL. (C) Cos7 cells were transfected with 0.5 μ g of HA-ERK5 or HA-ERK2 in the presence/absence of 2 μ g of FlagPHD-1 or FlagPHD-3 and processed as in Figure 1C. (D) Cos7 cells were transfected with 0.5 μ g of HA-ERK5 alone or with 2 μ g of FlagPHD-3. Thirty-six hours later, cells, except control, were treated with 20 μ M MG132 in the presence/absence of 1.5 mM DMOG for 12 hours. Then, extracts were collected and immunoprecipitated against HA and blotted with the indicated antibody and reblotted against HA. Thirty micrograms of TCL were blotted against HA, Flag, and tubulin. Fold variations for HA-tagged proteins or endogenous proteins in each experiment are indicated at the bottom of the panels.

Moreover, we observed physical interaction between HA-ERK5 and Flag-pVHL (Figure 2, B and C) as well as co-localization (Figure 2D). We next asked if the subcellular localization could influence the activity of pVHL on HA-ERK5. To this end, we transfected Cos7 cells with a truncated form of ERK5 (Δ 713) that preferentially localizes in the nucleus [28] and found that pVHL promoted ERK5 degradation regardless of its subcellular localization (Figure 2E).

Next, we evaluated if activation of ERK5 could be a determinant in the effect of pVHL onto ERK5. Cos7 cells were co-transfected with HA-ERK5 WT or a mutant resistant to activation (HA-AEF-ERK5) in the presence/absence of Flag-pVHL and a constitutively active form of MEK5 (MEK5-DD). As shown in Figure 2F, both the basal and activated forms of HA-ERK5 (achieved by the mobility shift) were affected by the presence of pVHL. Moreover, although to a lower extent, pVHL was able to mediate the degradation of the nonactivable

form of ERK5 (Figure 2F), which showed a similar binding to pVHL and subcellular distribution than the WT (Figure W2).

In summary, our results indicate that pVHL binds to ERK5, leading to its ubiquitination and proteasomal degradation regardless of its localization and activation status.

VHL Mediates ERK5 Degradation through Prolyl Hydroxylation-Dependent Mechanism

pVHL binding to HIF-1 α is critically dependent on the hydroxylation of specific proline residues within HIF-1 α proteins. This posttranslational modification is catalyzed by a family of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases termed EGLNs or PHDs [29,30]. Therefore, we next sought to investigate if a similar mechanism was applicable to ERK5. As a first approach, Cos7 cells were transiently transfected

with HA-ERK5 and then incubated in the presence/absence of DMOG, a specific inhibitor of prolyl hydroxylation, and found a marked increase in the expression levels of HA-ERK5 (Figure 3A). In contrast, exogenously expressed HA-ERK2 was not affected by DMOG treatment (Figure 3A), suggesting that the effect was specific for ERK5. Importantly, we also observed stabilization of endogenous ERK5, but not ERK2, in MCF7 and HMEC cells exposed to DMOG (Figure 3B), demonstrating that endogenous ERK5 could also be regulated through a prolyl hydroxylation mechanism. In agreement, overexpression of PHD-1 and PHD-3 promoted a marked reduction in HA-ERK5 levels with almost no effect on HA-ERK2 (Figure 3C). Next, we sought to investigate whether ERK5 was subjected to proline hydroxylation. To this end, we probed HA-ERK5 with antibodies raised against the hydroxyproline-containing epitopes within HIF-1 α and reasoned that they might detect other hydroxylated proteins when overexpressed. As shown in Figure 3D, a specific band was observed after immunoprecipitation of HA-ERK5 from MG132-treated samples. Furthermore, the band intensity was decreased in samples exposed to DMOG and increased upon overexpression of PHD-3 (Figure 3D).

To further explore the role of pVHL on ERK5 stability, we used a genetic approach based on RNAi. To this end, we chose two CCRCC-derived cell lines, Caki-2 and 769-P, showing normal or defective pVHL activity, respectively [31]. Caki-2 cells showed a lower level of ERK5 protein than 769-P cells (Figure 4A), but no differences were observed in mRNA levels (Figure 4B). To demonstrate the role of the different *VHL* status, both cell lines were transfected with siRNA against *VHL* or RNAi control. This treatment resulted in a marked reduction of VHL levels [$>90\%$, as assessed

by quantitative RT-PCR (qRT-PCR); Figure 4B] that correlated with an increase in ERK5 protein expression levels in Caki-2, while no effect was observed in the 769-P cell line (Figure 4, B and C). Furthermore, pVHL depletion affected ERK5 expression post-transcriptionally as mRNA levels were not affected by the interference of *VHL* (Figure 4B). Finally, DMOG treatment resulted in a marked increase in ERK5 protein in the *VHL* functional cell line—Caki-2—whereas it had no effect on 769-P ERK5 levels (Figure 4D). Altogether, these experiments strongly support the regulation of ERK5 protein levels by its interaction with VHL in a hydroxyproline-dependent manner.

ERK5 Is Implicated in Renal Cell Carcinoma

In light of our findings, we decided to investigate the role of ERK5 in CCRCC, a type of tumor in which loss of pVHL function is a hallmark [28]. To this end, we knocked down ERK5 expression in 769-P cells by infection with lentiviral particles encoding for shRNA against ERK5. The treatment resulted in effective knockdown of ERK5 at the mRNA and protein levels in selected pools (Figure 5A). Interestingly, low levels of ERK5 correlated with impaired cell growth under complete and low serum conditions (Figure 5B and data not shown) and in soft agar assays (Figure W3). In addition, ERK5 knockdown resulted in delayed migration in wound healing assays (Figure 5C), supporting a role for this MAPK in the growth and migration of 769-P cells. Similar results were obtained in other experimental models lacking VHL function, such as 786-O, underlying the importance of ERK5 for these processes in CCRCC cells (Figure W4).

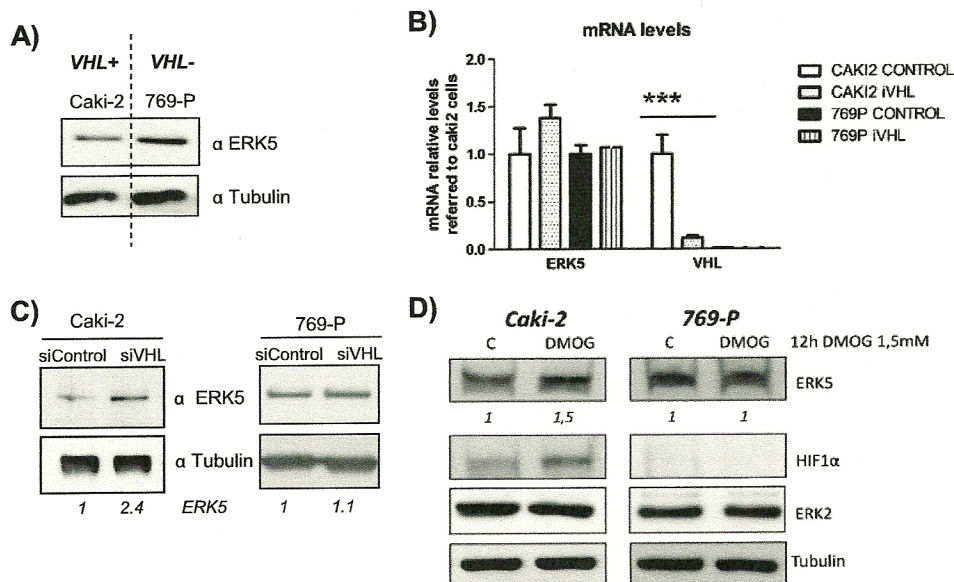


Figure 4. VHL mediates ERK5 expression level in renal carcinoma-derived cell lines. (A) Caki-2 and 769-P cell lines were tested for ERK5 (60 μ g) and tubulin (10 μ g) expression by Western blot by using lysates from subconfluent cultures. (B) Levels of RNA ERK5 were analyzed by qRT-PCR in Caki-2 and 769-P cells 48 hours after transfection of control or VHL siRNA cells. (C) Caki-2 and 769-P were transfected as in B, and 60 hours later, ERK5 protein levels were analyzed by using 60 μ g of cell lysates. Tubulin (10 μ g) was used as loading control. (D) Subconfluent cultures of Caki-2 and 769-P cell lines were treated with 1.5 mM DMOG for 9 hours. Then, TCLs were collected and 60 μ g were blotted against ERK5 and 10 μ g against tubulin. Fold variation of endogenous protein in each experiment is indicated at the bottom of the panels.

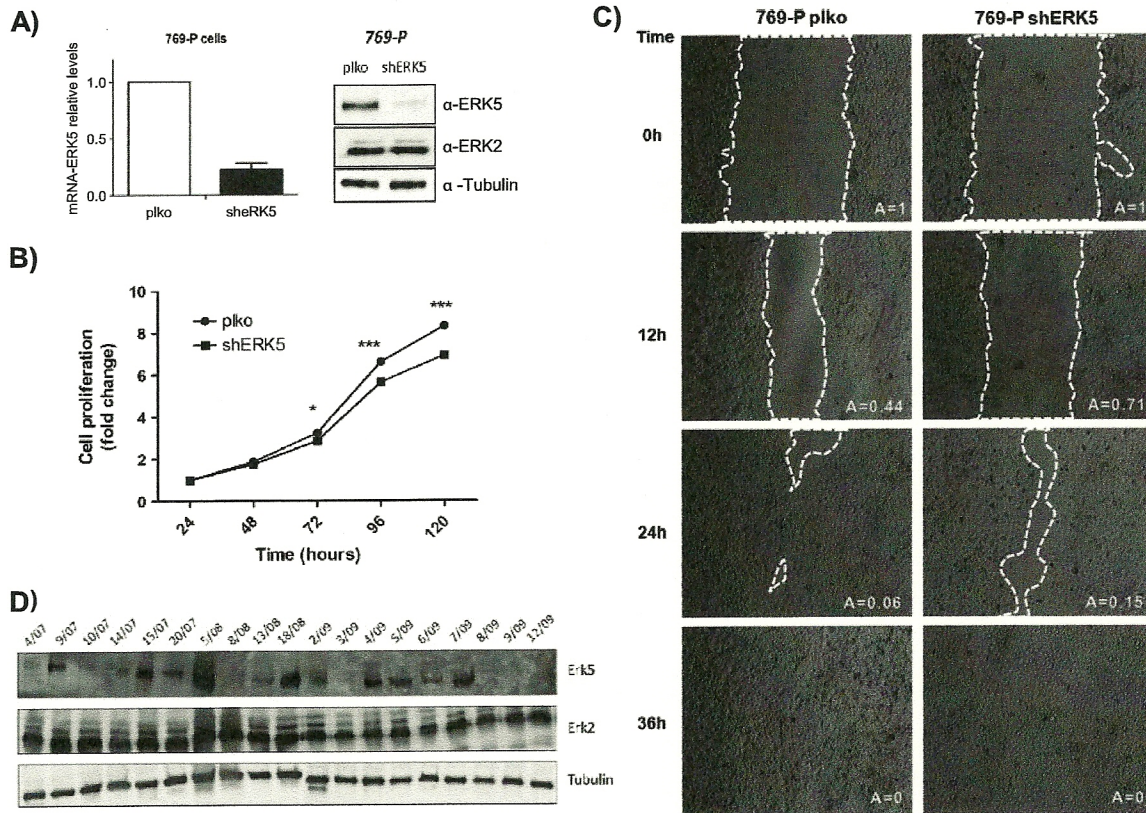


Figure 5. ERK5 is altered in renal cell carcinoma. (A) 769-P cells were infected with retroviral vector control (pLKO) or carrying shRNA against ERK5 (shERK5). Selected pools were evaluated by qRT-PCR (left panel) and Western blot analysis (right panel) by using the indicated antibodies. Image shows a representative experiment of three. (B) The results of proliferation assays are presented as the means ± SD. Values of OD at 570 nm at 24 hours were referred as 1. (C) Wound healing assays were performed in 769-P cells infected with empty vector (PLKO) or coding for shRNA against ERK5 (shERK5), and migration was evaluated at indicated time points. Images show a representative experiment of three independent experiments performed in duplicated cultures. (D) Western blot analysis against ERK5 (120 μg), ERK1/2 (60 μg), and tubulin (10 μg) in different tumors diagnosed as CCRCC.

Given the functional role of EKR5 in CCRCC cells, next we decided to study its role on CCRCC tumor progression. Although we could not test the effect of ERK5 interference in a xenograft model of 769-P cells due to the low tumorigenicity of the cell lines (Figure W5), we explored ERK5 expression levels in primary samples from 19 patients diagnosed with CCRCC (Figure W6). Clinicopathologic data from these patients are shown in Table 1. The mean age was 62.60 years (SD, 11.50; range, 39.08–79.08 years; Table 1). A marked positivity for ERK5 was observed in 9 cases (47.3%), while the remaining 10 cases showed middle to low positivity (15.7%) or not detectable ERK5 protein (36.8%; Table 1 and Figure 5D). ERK2 levels were also analyzed, showing a marked positivity in all the cases with almost no differences among them. A statistically significant ($P < .001$) correlation between ERK5 positivity and tumor stage at high risk (stages III and IV, in which four of them died or needed chemotherapy during the follow-up; Table 1) was found. Furthermore, tumors with high levels of ERK5 showed a tendency for metastases at the moment of diagnosis (5 of 9), while tumors negative or with low positivity for ERK5 did not show any metastases at the moment of diagnosis (10 of 10). This set of experiments suggests that ERK5 could be a novel biomarker in CCRCC.

Table 1. Clinicopathologic Data of Patients Studied.

Case	Age (Years)	Sex	Fuhrman	pT	pN	pM	TNM Stage	ERK5	Follow-Up (Months)	Others
04/07	48.48	♂	3	T1b	Nx	Mx	I	-	42.97	W/O treatment
09/07	50.16	♂	2	T1a	Nx	M1	IV	+	39.85	W/O treatment
10/07	65.56	♂	2	T1b	Nx	Mx	I	-	39.75	W/O treatment
14/07	76.71	♂	2	T2a	N0	Mx	II	+/-	36.37	W/O treatment
15/07	63.27	♂	4	T3b	N1	M1	IV	+	21.75	Exitus letalis
20/07	60.00	♂	2	T3a	Nx	Mx	III	+	33.38	W/O treatment
05/08	73.83	♀	4	T3a	Nx	Mx	III	+	29.86	W/O treatment
08/08	60.55	♂	1	T1a	Nx	Mx	I	-	27.79	W/O treatment
13/08	74.80	♀	2	T2a	N0	Mx	II	+/-	21.82	W/O treatment
18/08	64.15	♂	2	T4	Nx	M1	IV	+	28.94	Chemotherapy
02/09	79.88	♂	3	T2a	N0	Mx	II	-	26.68	Lost follow-up
03/09	42.96	♀	2	T2a	N0	Mx	II	-	17.05	W/O treatment
04/09	57.11	♂	2	T3a	Nx	Mx	III	+	17.28	W/O treatment
05/09	70.81	♂	3	T2b	Nx	Mx	III	+	18.37	W/O treatment
06/09	54.95	♂	4	T4	N1	M1	IV	+	5.02	Exitus letalis
07/09	66.86	♀	4	T1b	Nx	M1	IV	+	13.77	Chemotherapy
08/09	39.08	♂	2	T1a	Nx	Mx	I	-	13.86	W/O treatment
09/08	68.38	♀	1	T1b	Nx	Mx	I	-	14.00	W/O treatment
12/09	71.79	♀	1	T3a	Nx	Mx	II	-	10.18	W/O treatment

The above table summarizes demographic and pathologic data (sex, age, Fuhrman grade, and TNM stage) of the patients studied and their follow-up (end of the study; TNM means tumor-node-metastasis, W/O means without, + means strong positivity, +/- means low positivity, and - means negative).

Discussion

The first conclusion from the present study is that ERK5's expression is tightly regulated, at the protein level, through the UPS. It has been reported that ERK1/2 could be also ubiquitinated in stress conditions, through the PHD domain of mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEKK1) [32], but no effect has been proposed in nonstress conditions. The regulation of ERK5 by the proteasome fits with its proposed role in cellular processes, such as REDOX or hypoxia [2,33], that require a rapid response. Indeed, we have observed an increase in ERK5 protein levels when cell lines as MCF7 or Caki-2 were exposed to hypoxic conditions (Figure W7). Interestingly, ERK5 transcriptional activity has been shown to be affected by the SUMOylation machinery, through its mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) [34]. However, our data demonstrate a lack of involvement of MEK5 activity in the ubiquitination of ERK5. Therefore, ERK5 biologic levels and functions are probably regulated through complex mechanisms involving SUMOylation [35], ubiquitination (this report), and other processes such as autophosphorylation [36,37].

Our second conclusion is that pVHL is an ERK5 ubiquitin ligase and that ERK5 needs to be proline hydroxylated to be targeted for proteasomal degradation. This represents a novel and important finding in the ERK5 field and suggests that ERK5 is a novel member of the growing list of EGLN/PHD-regulated proteins [38–43]. It is noteworthy that ERK5 does not have an LXXLAP hydroxylation motif described for HIF-1 α [30,44]. However, it has been reported that the main sequence determinant for PHD activity is the presence of the proline hydroxy acceptor [45] and it has also been shown that positions -1, -2, and -5 relative to proline hydroxy acceptor can accept a large variety of substitutions [46,47]. In agreement, other well-characterized substrates of PHDs, such as ATF4, do not have an LXXLAP motif [40]. In this regard, the data obtained with the ERK5-Pro1 mutant form lacking the C-terminal region that includes the two specific proline-rich domains of ERK5, residues 434 to 485 and 578 to 701 with more than 60 proline residues, support the idea that proline(s) affected by PHD could lie in these regions.

Interestingly, previous observation showed that 82% of genes that seem to be specifically regulated by ERK5 under normoxic conditions are also targets of HIF-1 α in hypoxia [18]. Therefore, the control exerted by pVHL onto ERK5 and HIF-1 α at the same time could ensure that the shared target genes receive a coherent set of input signals and will allow the expression of target genes for HIF-1 α not only in hypoxic conditions. To this end, one possibility could be a different sensitivity for this pVHL–prolyl hydroxylase–dependent mechanism. In this model, HIF-1 α is extremely sensitive to this mechanism, while ERK5 could be less sensitive. In addition, our data strongly support a model in which VHL regulates ERK5 expression by affecting its degradation rather than at the RNA level, as has been reported for other proteins as insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) [48], in agreement with the mechanism described for HIF-1 α . Nonetheless, other possibilities in addition to VHL, such as c-Abl [5], should be considered to fully understand the molecular basis of ERK5 expression levels and function, especially in a tumoral context, where deregulation of tyrosine phosphorylation, protein degradation, and many other processes are well established. Therefore, further studies are necessary to fully clarify the molecular mechanism that controls ERK5 in CCRCC.

Third, the role of VHL as a tumor suppressor gene is in nice agreement with its inhibitory effect onto ERK5, a signaling molecule activated by oncogenes and cell proliferation and that contributes

to cancer [49]. Therefore, ERK5 could be considered as a novel target of the tumor suppressor pVHL, as has recently been proposed for phosphorylated JAK2 [50], although the latter does not require proline hydroxylation.

Finally, our findings demonstrate that high levels of ERK5 correlate with stages associated to a worse prognosis in CCRCC [51], suggesting that ERK5 could be considered a novel biomarker and a potential therapeutic target. In fact, our data provide a possible novel explanation for the characteristic vasculature of CCRCC [52]. For example, ERK5 exerts an inhibitory effect on thrombospondin-1 [53,54], known to mediate angiogenesis, proliferation, and tumor aggressiveness in CCRCC [55]. In our experimental system or in CCRCC samples, the lack of ERK5 results in decreased cell motility *in vitro* and seems to correlate with a low metastatic potential. Interestingly, in breast cancer, expression of ERK5 correlated with a worse prognosis [11]. Therefore, it is possible that ERK5 targeting may be therapeutically useful in CCRCC and probably in several solid tumors. However, in lung cancer, a recent report indicated that loss of ERK5 function may be linked to aggressiveness [56] and that ERK5 is also known to mediate the effect of antiangiogenic factors such as pigment epithelium-derived factor (PEDF) [57]. Therefore, studies with ERK5-specific inhibitors, such as XMD8-92 [58], and with other drugs that interfere with ERK5 activity, such as TG02 that is currently in a phase I clinical trial, will help to elucidate the value of ERK5 targeting in cancer.

In summary, this report presents a novel mechanism for the control of ERK5 protein level through the ubiquitin-proteasome machinery, in which pVHL acts as the E3 ubiquitin ligase through a prolyl hydroxylation-dependent mechanism. This new mechanism for controlling ERK5 expression could have potential implications in tumors, as CCRCC, in which VHL inactivation is a critical step.

Acknowledgments

We appreciate the technical help of Elena García. We also appreciate the comments and suggestions of J. Aragonés and I. Sánchez-Pérez.

References

- Nishimoto S and Nishida E (2006). MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* 7, 782–786.
- Abe J, Kusuhara M, Ulevitch RJ, Berk BC, and Lee JD (1996). Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* 271, 16586–16590.
- Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, and Lee JD (1998). Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* 395, 713–716.
- Zhou G, Bao ZQ, and Dixon JE (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270, 12665–12669.
- Buschbeck M, Hofbauer S, Di CL, Keri G, and Ullrich A (2005). Abl-kinase-sensitive levels of ERK5 and its intrinsic basal activity contribute to leukaemia cell survival. *EMBO Rep* 6, 63–69.
- Roberts OL, Holmes K, Muller J, Cross DA, and Cross MJ (2009). ERK5 and the regulation of endothelial cell function. *Biochem Soc Trans* 37, 1254–1259.
- Wang X and Tournier C (2006). Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal* 18, 753–760.
- Chiariello M, Marinissen MJ, and Gutkind JS (2000). Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncogene to the *c-jun* promoter and to cellular transformation. *Mol Cell Biol* 20, 1747–1758.
- English JM, Pearson G, Hockenberry T, Shivakumar L, White MA, and Cobb MH (1999). Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. *J Biol Chem* 274, 31588–31592.
- Mehta PB, Jenkins BL, McCarthy L, Thilak L, Robson CN, Neal DE, and Leung HY (2003). MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* 22, 1381–1389.

- [11] Montero JC, Ocana A, Abad M, Ortiz-Ruiz MJ, Pandiella A, and Esparis-Ogando A (2009). Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival identifies this kinase as a potential therapeutic target. *PLoS One* **4**, e5565.
- [12] Sticht C, Freier K, Knopfle K, Flechtenmacher C, Pungs S, Hofe C, Hahn M, Joos S, and Lichter P (2008). Activation of MAP kinase signaling through ERK5 but not ERK1 expression is associated with lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Neoplasia* **10**, 462–470.
- [13] Hayashi M, Tapping RJ, Chao TH, Lo JF, King CC, Yang Y, and Lee JD (2001). BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J Biol Chem* **276**, 8631–8634.
- [14] Hayashi M, Kim SW, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Abel ED, Eliceiri B, Yang Y, Ulevitch RJ, and Lee JD (2004). Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. *J Clin Invest* **113**, 1138–1148.
- [15] Pi X, Garin G, Xie L, Zheng Q, Wei H, Abe J, Yan C, and Berk BC (2005). BMK1/ERK5 is a novel regulator of angiogenesis by destabilizing hypoxia inducible factor 1 α . *Circ Res* **96**, 1145–1151.
- [16] Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, and Gutkind JS (2000). The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 α . *Cancer Res* **60**, 4873–4880.
- [17] Sutton KM, Hayat S, Chau NM, Cook S, Pouyssegur J, Ahmed A, Perusinghe N, Le FR, Yang J, and Ashcroft M (2007). Selective inhibition of MEK1/2 reveals a differential requirement for ERK1/2 signalling in the regulation of HIF-1 in response to hypoxia and IGF-1. *Oncogene* **26**, 3920–3929.
- [18] Schweppe RE, Cheung TH, and Ahn NG (2006). Global gene expression analysis of ERK5 and ERK1/2 signaling reveals a role for HIF-1 in ERK5-mediated responses. *J Biol Chem* **281**, 20993–21003.
- [19] Semenza GL (2007). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* **2007**, cm8.
- [20] Kaelin WG Jr (2007). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**, 680s–684s.
- [21] Borges J, Pandiella A, and Esparis-Ogando A (2007). Erk5 nuclear location is independent on dual phosphorylation, and favours resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Signal* **19**, 1473–1487.
- [22] Sanchez-Prieto R, Rojas JM, Taya Y, and Gutkind JS (2000). A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* **60**, 2464–2472.
- [23] de la Cruz-Morcillo MA, Valero ML, Callejas-Valera JL, Arias-Gonzalez L, Melgar-Rojas P, Galan-Moya EM, Garcia-Gil E, Garcia-Cano J, and Sanchez-Prieto R (2012). P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: implication in resistance. *Oncogene* **31**, 1073–1085.
- [24] Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, and Maniatis T (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* **78**, 773–785.
- [25] Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, and Conaway JW (2000). Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 10430–10435.
- [26] Lee JD, Ulevitch RJ, and Han J (1995). Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **213**, 715–724.
- [27] Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, Kamura T, Conaway RC, Conaway JW, and Kaelin WG Jr (1998). Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol* **18**, 732–741.
- [28] Buschbeck M and Ullrich A (2005). The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem* **280**, 2659–2667.
- [29] Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiano J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, and Kaelin WG Jr (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464–468.
- [30] Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, et al. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468–472.
- [31] Shinjima T, Oya M, Takayanagi A, Mizuno R, Shimizu N, and 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**, 529–536.
- [32] Lu Z, Xu S, Joazeiro C, Cobb MH, and Hunter T (2002). The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol Cell* **9**, 945–956.
- [33] Sohn SJ, Sarvis BK, Cado D, and Winoto A (2002). ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* **277**, 43344–43351.
- [34] Shishido T, Woo CH, Ding B, McClain C, Molina CA, Yan C, Yang J, and Abe J (2008). Effects of MEK5/ERK5 association on small ubiquitin-related modification of ERK5: implications for diabetic ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Circ Res* **102**, 1416–1425.
- [35] Woo CH, Shishido T, McClain C, Lim JH, Li JD, Yang J, Yan C, and Abe J (2008). Extracellular signal-regulated kinase 5 SUMOylation antagonizes shear stress-induced antiinflammatory response and endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Circ Res* **102**, 538–545.
- [36] Diaz-Rodriguez E and Pandiella A (2010). Multisite phosphorylation of Erk5 in mitosis. *J Cell Sci* **123**, 3146–3156.
- [37] Inesta-Vaquera FA, Campbell DG, Tourmier C, Gomez N, Lizcano JM, and Cuenda A (2010). Alternative ERK5 regulation by phosphorylation during the cell cycle. *Cell Signal* **22**, 1829–1837.
- [38] Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, et al. (2006). Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 18154–18159.
- [39] Fu J, Menzies K, Freeman RS, and Taubman MB (2007). EGLN3 prolyl hydroxylase regulates skeletal muscle differentiation and myogenin protein stability. *J Biol Chem* **282**, 12410–12418.
- [40] Koditz J, Nesper J, Wottawa M, Stiehl DP, Camenisch G, Franke C, Myllyharju J, Wenger RH, and Katschinski DM (2007). Oxygen-dependent ATF-4 stability is mediated by the PHD3 oxygen sensor. *Blood* **110**, 3610–3617.
- [41] Lee S, Nakamura E, Yang H, Wei W, Linggi MS, Sajan MP, Farese RV, Freeman RS, Carter BD, Kaelin WG Jr, et al. (2005). Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer Cell* **8**, 155–167.
- [42] Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, Cole RN, Pandey A, and Semenza GL (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **145**, 732–744.
- [43] Mikhaylova O, Ignacak ML, Barankiewicz TJ, Harbaugh SV, Yi Y, Maxwell PH, Schneider M, Van GK, Carmeliet P, Revelo MP, et al. (2008). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and Egl-9-type proline hydroxylases regulate the large subunit of RNA polymerase II in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* **28**, 2701–2717.
- [44] Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, and Ratcliffe PJ (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* **20**, 5197–5206.
- [45] Huang J, Zhao Q, Mooney SM, and Lee FS (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* **277**, 39792–39800.
- [46] Landazuri MO, Vara-Vega A, Viton M, Cuevas Y, and Del PL (2006). Analysis of HIF-prolyl hydroxylases binding to substrates. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 313–320.
- [47] Li D, Hirsila M, Koivunen P, Brenner MC, Xu L, Yang C, Kivirikko KI, and Myllyharju J (2004). Many amino acid substitutions in a hypoxia-inducible transcription factor (HIF)-1 α -like peptide cause only minor changes in its hydroxylation by the HIF prolyl 4-hydroxylases: substitution of 3,4-dehydroproline or azetidine-2-carboxylic acid for the proline leads to a high rate of uncoupled 2-oxoglutarate decarboxylation. *J Biol Chem* **279**, 55051–55059.
- [48] Yuen JS, Cockman ME, Sullivan M, Protheroe A, Turner GD, Roberts IS, Pugh CW, Werner H, and Macaulay VM (2007). The VHL tumor suppressor inhibits expression of the IGF1R and its loss induces IGF1R upregulation in human clear cell renal carcinoma. *Oncogene* **26**, 6499–6508.
- [49] Drew BA, Burrow ME, and Beckman BS (2011). MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years. *Biochim Biophys Acta* **1825**, 37–48.
- [50] Russell RC, Sufan RI, Zhou B, Heir P, Bunda S, Sybingco SS, Greer SN, Roche O, Heathcote SA, Chow VW, et al. (2011). Loss of JAK2 regulation via a heterodimeric VHL-SOCS1 E3 ubiquitin ligase underlies Chuvash polycythemia. *Nat Med* **17**, 845–853.
- [51] Klatte T, Lam JS, Shuch B, Beldegrun AS, and Pantuck AJ (2008). Surveillance for renal cell carcinoma: why and how? When and how often? *Urol Oncol* **26**, 550–554.
- [52] Qian CN, Huang D, Wondergem B, and Teh BT (2009). Complexity of tumor vasculature in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* **115**, 2282–2289.

- [53] Doebele RC, Schulze-Hoepfner FT, Hong J, Chlenski A, Zeitlin BD, Goel K, Gomes S, Liu Y, Abe MK, Nor JE, et al. (2009). A novel interplay between Epac/Rap1 and mitogen-activated protein kinase kinase 5/extracellular signal-regulated kinase 5 (MEK5/ERK5) regulates thrombospondin to control angiogenesis. *Blood* **114**, 4592–4600.
- [54] Tan BK, Adya R, Chen J, Farhatullah S, Heutling D, Mitchell D, Lehnert H, and Randeve HS (2009). Metformin decreases angiogenesis via NF- κ B and Erk1/2/Erk5 pathways by increasing the antiangiogenic thrombospondin-1. *Cardiovasc Res* **83**, 566–574.
- [55] Zubac DP, Bostad L, Kihl B, Seidal T, Wentzel-Larsen T, and Haukaas SA (2009). The expression of thrombospondin-1 and p53 in clear cell renal cell carcinoma: its relationship to angiogenesis, cell proliferation and cancer specific survival. *J Urol* **182**, 2144–2149.
- [56] Chen R, Yang Q, and Lee JD (2012). BMK1 kinase suppresses epithelial-mesenchymal transition through the Akt/GSK3 β signaling pathway. *Cancer Res* **72**, 1579–1587.
- [57] Biyashev D, Veliceasa D, Kwiatek A, Sutanto MM, Cohen RN, and Volpert OV (2010). Natural angiogenesis inhibitor signals through Erk5 activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem* **285**, 13517–13524.
- [58] Yang Q, Deng X, Lu B, Cameron M, Fearn C, Patricelli MP, Yates JR III, Gray NS, and Lee JD (2010). Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through promyelocytic leukemia protein. *Cancer Cell* **18**, 258–267.

Supplemental Reference

- [1] Guerrero C, Martín-Encabo S, Fernández-Medarde A, and Santos E (2004). C3G-mediated suppression of oncogene-induced focus formation in fibroblasts involves inhibition of ERK activation, cyclin A expression and alterations of anchorage-independent growth. *Oncogene* 23, 4885–4893.

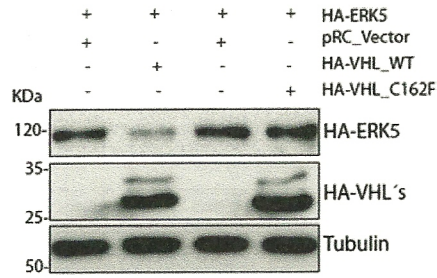


Figure W1. Effects of VHL mutant C162F onto HA-ERK5. Cos7 cells were transfected with HA-ERK5 WT alone or in the presence of pRC/CMV HA-pVHL WT or C162F mutant and processed as in Figure 1B. TCLs (50 μ g) were blotted against the indicated antibodies.

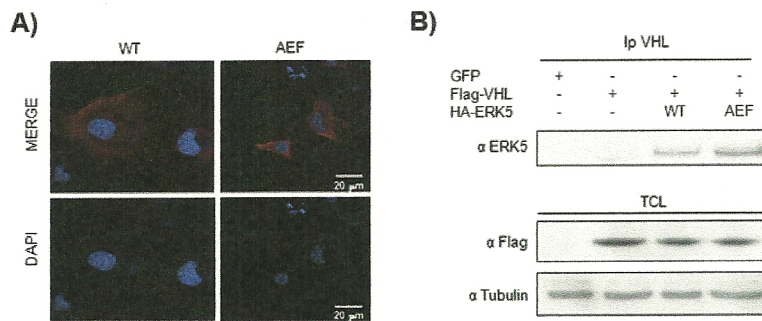


Figure W2. Subcellular distribution and binding to pVHL of HA-ERK5-AEF. (A) Cos7 cells were transfected with HA-ERK5-WT or HA-ERK5-AEF and processed as in Figure 2D. (B) 293T cells were transfected (5 μ g of HA-ERK5-WT or HA-ERK5-AEF plus 5 μ g of Flag-VHL) and processed as in Figure 2B. TCLs were blotted against Flag or tubulin.

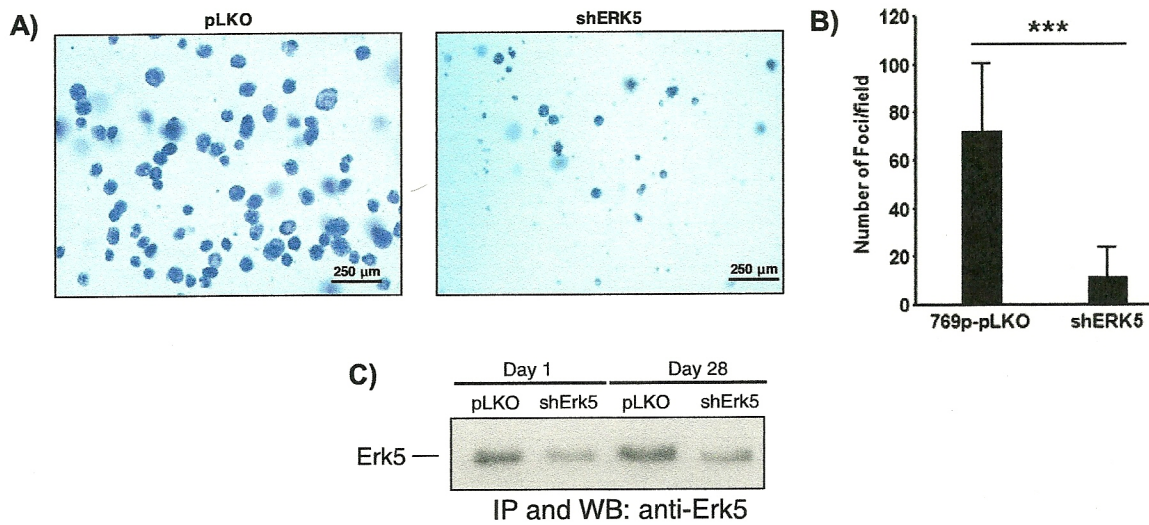


Figure W3. (A) Representative fields of 769-P pLKO and shERK5 cells at 28 days. Soft agar assay was performed according to Guerrero et al. [1]. (B) Histogram representing the mean \pm SD of 12 different fields. Statistical comparison of differences from the means was performed by the Student's *t* test; ****P* = .004. (C) Western blot analysis of ERK5 in parallel cultures of cells at the indicated time points of the soft agar assay.

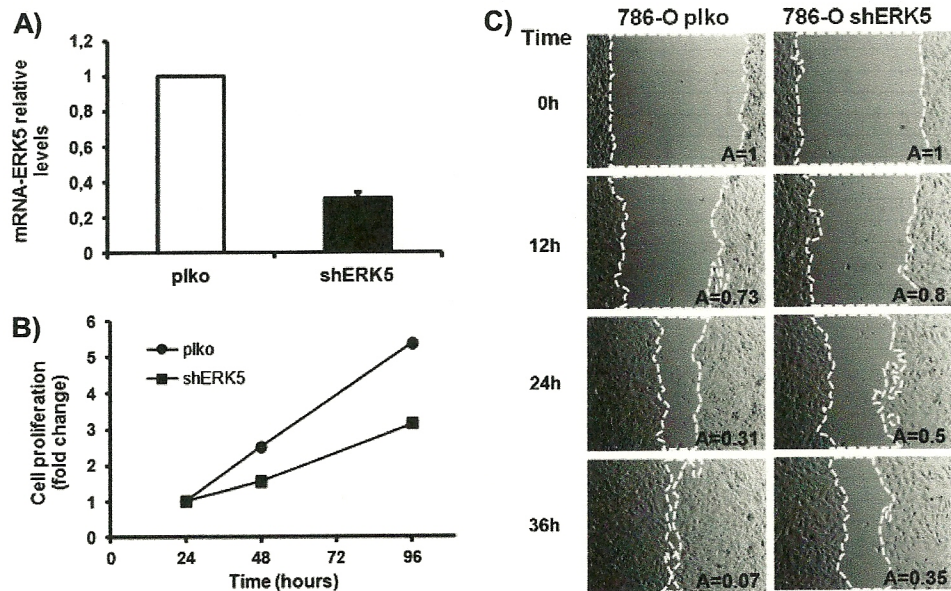


Figure W4. (A) 786-O cells were infected with control vector (pLKO) or carrying shRNA against ERK5 (shERK5). Selected pools were evaluated by qRT-PCR. (B) Proliferation assays in 786-O cells. Values of OD at 570 nm at 24 hours were referred as 1. Image shows a representative experiment performed in triplicate cultures of three. (C) Wound healing assays was performed in 786-O cells. Images show a representative experiment of two independent experiments performed in duplicated cultures.

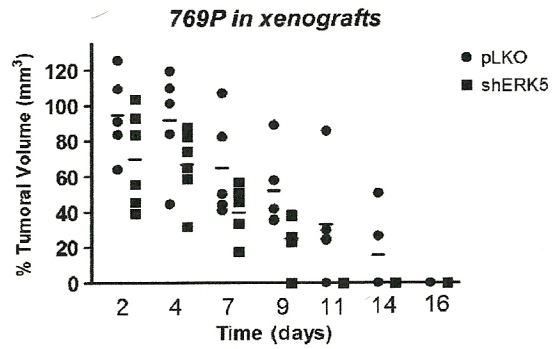


Figure W5. Xenograft model using 769-P cells. pLKO ($n = 5$) or shERK5 769-P ($n = 6$) cells were injected subcutaneously (6×10^6 cells) in nude mice (BALB/c), and volumes were evaluated every 2 days until apparent tumor mass regresses. Mice were kept alive until day 45 with no observable tumors.

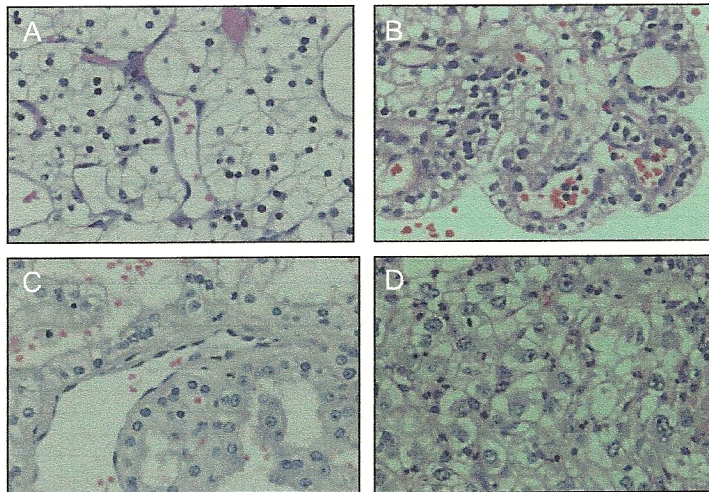


Figure W6. Histologic features of diagnosed cases of CCRCC. Four representative images (40 \times) of different Fuhrman grades observed. (A) Grade I (case 12/09). (B) Grade II (case 08/09). (C) Grade III (case 02/09). (D) Grade IV (case 06/09).

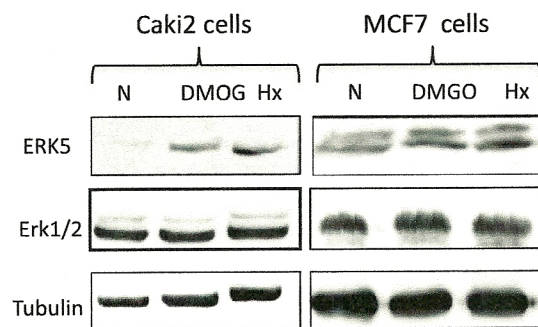


Figure W7. Effect of hypoxia onto ERK5 in Caki-2 and MCF7 cells. For hypoxia treatments, cells were grown at 37°C in sealed chambers and flushed with 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ gas mixture for 9 hours. As a positive control, cells were treated with DMOG (1.5 mM) for 9 hours.

ORIGINAL ARTICLE

Carbonic anhydrase IX as a specific biomarker for clear cell renal cell carcinoma: comparative study of Western blot and immunohistochemistry and implications for diagnosis

JOSÉ M. GIMÉNEZ-BACHS¹, ANTONIO S. SALINAS-SÁNCHEZ¹,
LETICIA SERRANO-OVIEDO², SYONG H. NAM-CHA³,
ANTONIO RUBIO-DEL CAMPO² & RICARDO SÁNCHEZ-PRIETO⁴

¹Urology Department, ²Investigation Department, ³Anatomical Pathology Department, Hospital and University Complex of Albacete, Spain, and ⁴Molecular Oncology Laboratory, Regional Centre for Biomedical Research, Science and Technology Park, University of Castilla-La Mancha, Albacete, Spain

Abstract

Objective. This study aimed to evaluate the usefulness of carbonic anhydrase IX (CA-IX) expression in clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) using two different techniques to detect protein expression. **Material and methods.** An experimental, cross-sectional, analytical study was conducted to analyse proteins in renal tumour and healthy tissue specimens from 38 consecutive patients who underwent nephrectomy for renal cancer. CA-IX protein expression was measured by immunohistochemistry and Western blot analysis and quantified. Statistical analysis was performed with the positive and negative specific agreements and kappa coefficient. The sensitivity and specificity of both techniques were assessed. Statistical tests were conducted to analyse the association between CA-IX expression quantitation and normal prognosis factors (TNM stage and Fuhrman nuclear grade), only in CCRCC. **Results.** The mean patient age was 65 years, 78.9% of patients were men and 57.9% of tumours were CCRCC. CA-IX protein expression was positive in 63.2% of tumours by immunohistochemistry and in 60.5% by Western blot. Both techniques detected CA-IX expression only in CCRCC and unclassifiable tumours. High concordance indices were observed for CCRCC diagnosis. Western blot and immunohistochemistry had a sensitivity of 95.5% and 100%, respectively; the specificity was 100% in both techniques. CA-IX expression quantitation did not correlate with tumour stage or Fuhrman nuclear grade. **Conclusions.** Immunohistochemistry and Western blot techniques can be used to detect abnormal CA-IX protein expression in CCRCC and to support morphology-based diagnostic techniques.

Key Words: CA-IX protein, clear cell renal cell carcinoma, diagnosis, immunohistochemistry, western blot

Introduction

Renal tumours account for approximately 3% of all tumours, and renal cell carcinoma (RCC) is the most common malignancy in the adult kidney. The incidence of RCC has gradually risen in the past few decades, mainly because of the increased use of imaging techniques. Mortality is also higher, however, and incidental findings alone do not fully explain the

increase. Environmental, dietary, genetic and other factors are also apparently implicated in the increased diagnosis of this type of tumour [1].

In recent years, molecular characterization of renal tumours has shown that certain genetic and epigenetic abnormalities are common in each cell subtype. Sporadic clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) is one of the most common cancers and is characterized by abnormalities on the short arm of

chromosome 3 (3p) [2], where the *VHL* (tumour suppressor) gene is located. This gene is altered in both von Hippel-Lindau disease and sporadic renal tumours [3]. *VHL* mutations have been described in sporadic CCRCC in 22–57% of cases [4], DNA methylation in 19% and general abnormalities affecting *VHL* function in more than 90% [5].

Part of the *VHL* suppressor function lies in its capacity, under normal conditions, to degrade HIF1- α protein, a transcription factor involved in the transactivation of certain genes with a protein product (e.g. VEGF, PDGF, EPO) that increases oxygen availability or regulates metabolic adaptation when environmental oxygen is limited. In the presence of normal *VHL* activity and under normal ambient oxygen conditions, HIF1- α is degraded and does not fulfil its function [6].

HIF1- α also regulates other genes, including a group that produces transmembrane proteins, known as carbonic anhydrases (CAs), to regulate intracellular and extracellular pH. Of these, CA-IX appears to be involved in the development of certain tumours. It is essentially expressed in tumour tissue, including renal carcinoma tumours, and is induced under hypoxic conditions and regulated by HIF1- α [7,8]. Expression appears to be characteristic of the clear cell subtype, and tumours of other cell subtypes exhibit little to no expression or have a clear cell component [9,10].

Several studies have observed that CA-IX is implicated in the prognosis of CCRCC in terms of survival and response to certain immunomodulatory therapies, mainly in tumours that present distant metastasis [11–13]. This is not entirely clear, however, and there is some debate regarding the use of CA-IX as a tumour marker and its usefulness in predicting prognosis.

To characterize renal tumours more accurately, the current histological classification is aided by the cytogenetic and molecular peculiarities of the tumour cells. The histological architecture of tumour specimens may be hard to recognize by microscopy techniques alone because of sarcomatoid differentiation, different patterns observed in the tumour, or small specimen size in the case of fine-needle biopsies. Hence, other techniques should be used to support the diagnoses and define the tumour type and potential tumour behaviour [14–16].

This study evaluated the usefulness of CA-IX expression in CCRCC diagnosis using two techniques to detect protein expression, and analysed which of the two was more suitable for this purpose. The usefulness of CA-IX expression in CCRCC was also assessed by comparing it with common prognostic factors observed in clinical practice.

Material and methods

The present study used an experimental, cross-sectional and analytical design in 38 patients diagnosed with and surgically treated for RCC. Once informed consent had been obtained, renal tumour tissue and healthy renal tissue specimens were collected and then stored and frozen at -80°C for subsequent analyses. Sociodemographic and clinicopathological data related to the disease were also collected from the patients.

Immunohistochemistry analysis

All cases were reviewed and diagnosed by the pathology department of the Hospital and University Complex of Albacete, Spain, in accordance with the World Health Organization (WHO) classification [17].

Paraffin blocks were available in all cases. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections of $4\ \mu\text{m}$ were cut, deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded series of ethanol. The endogenous peroxidase was blocked with 3% H_2O_2 for 5 minutes. Slides were treated with heat-induced epitope retrieval and immunostained with the polyclonal rabbit antibody CA-IX (Abcam, Cambridge, MA, USA) (Ab 150686), in a 1:1500 dilution, and detected using the EnVision-HRP system (Dako, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer's instructions. Normal gastric mucosa was used as a positive control.

Immunohistochemical staining was done by a single pathologist blinded to the clinicopathological variables. Tumour cells were scored as positive or negative for CA-IX expression, and the extent of staining was recorded as a percentage of the tumour tissue specimen that had positive CA-IX expression.

Western blot analysis

Samples were lysed using a Polytron PT2100 (Kinematica, Fisher Scientific, Spain) in lysis buffer pH 8 (100 mM HEPES, 50 mM NaCl, 5 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.125 mM EGTA, 0.1% Triton X-100), adding protease and phosphatase inhibitors (50 mM NaPPi, 50 mM NaF, β -glycerol, DDT, leupeptin, aprotinin, 50 μM PMSF, and 100 μM Na_3VO_4). The samples were clarified by centrifugation for 15 minutes, and the total protein content was determined by spectrophotometry at 562 nm using a BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Proteins were then separated using 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a nitrocellulose membrane, blocked in 5% non-fat dry milk in T-TBS (Tween 20 0.5%–Tris-buffered saline) for 1 hour. The membranes were washed extensively

Table I. Clinicopathological characteristics of operated patients with renal cell carcinoma.

	n	%
Gender		
Male	30	78.8
Female	8	21.1
Tumour type		
Clear cell	22	57.9
Papillary	3	7.9
Chromophobe	7	18.4
Oncocytoma	3	7.9
Mixed - unclassifiable	2	5.3
Ducts	1	2.6
Nuclear grade (Fuhrman)		
1	2	5.3
2	15	39.5
3	11	28.9
4	6	15.8
NA	4	10.5
T stage		
T1	21	55.2
T2	9	23.7
T3	8	21.1
T4	0	0.0
N stage		
N0	20	52.6
Nx	16	42.1
N1	2	5.3
M stage		
M0	32	84.2
M1	6	15.8

NA = not assessed.

and incubated with the appropriate primary antibodies. CA-IX (clone H-120) and antitubulin (DM1A) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Sc25599) and diluted in incubation buffer (0.5% bovine serum albumin in T-TBS) at 1:1000 and 1:3000, respectively, and incubated overnight at 4°C. Then, membranes were extensively washed in T-TBS for 20 minutes, incubated with appropriate secondary antibody for 1 hour and extensively washed for 20 minutes. Antibody detection was achieved by enhanced chemiluminescence (General Electric, Spain). Confluent cultures of HeLa cells were used as a positive control for CA-IX in Western blotting [18].

CA-IX expression in clear cell tumours was quantitated to analyse any relationship between expression and prognosis, using Image J v.1.42q software. CA-wIX bands were compared to the respective tubulins to ensure uniform, equivalent quantitation.

Statistical analysis

A descriptive analysis was performed for all variables collected in the study. A separate concordance analysis was carried out for the immunohistochemistry and Western blot techniques, assuming that CA-IX expression is persistently observed in CCRCC, to obtain positive- and negative-specific agreements and the kappa coefficient to correct findings for chance agreements. Likewise, the study compared the two tests to each other. A sensitivity and specificity study was also carried out for both techniques.

Subsequently, the association between CA-IX expression quantitation was analysed only in the CCRCCs, using Western blot and the normal prognosis factors [tumour, node, metastasis (TNM) tumour stage, Fuhrman nuclear grade]. Analysis of variance (ANOVA) test, Student's *t* test and chi-squared test were carried out according to variable type, and non-parametric testing was applied when the conditions for application were not met.

Results

The mean patient age was 65 years (SD 12.4; range 31.9–83.9 years); 30 patients (78.9%) were men.

Clear cell tumours were most common (57.9%), followed by chromophobe and papillary carcinoma. Only one of the tumours displayed sarcomatoid differentiation and was diagnosed as unclassifiable. Fuhrman nuclear grade 2 (39.5%) was the most common when this was analysed. Most tumours were low stage (55.2% T1, 23.7% T2); no T4 tumours were detected. Distant metastasis was observed in six cases, malignant lymph nodes were found in two cases, and 16 cases (42.1%) were classified as Nx according to the TNM classification. Table I summarizes the clinical characteristics of the tumours.

When CA-IX expression was determined by immunohistochemical techniques, 24 tumour specimens (63.2%) were positive for this protein, whereas CA-IX expression assessed by Western blot showed overexpression of this protein in 23 specimens (60.5%). When tumour expression was analysed in CCRCC or non-CCRCC, CA-IX-positive distribution (Table II) was statistically significant ($p < 0.005$) for both immunohistochemistry and Western blot. Neither technique detected CA-IX overexpression in any healthy renal tissue specimens. Figure 1 shows the immunohistochemical images for CA-IX; reference expression was detected by Western blot according to tumour histology. In fact, both immunohistochemistry and Western blot detected expression only in clear cell tumours and unclassifiable

Table II. Comparison of carbonic anhydrase IX (CA-IX) expression detection by immunohistochemistry and Western blot for clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) and non-clear cell renal cell carcinoma.

		Histopathology		Total
		CCRCC	Non-CCRCC	
IHC	Negative	0	14	11
	Positive	22	2	24
	Total	22	16	38
WB	Negative	1	14	15
	Positive	21	2	23
	Total	22	16	38

IHC = immunohistochemistry; WB = Western blot.

tumour. When tubulin was used as the reference, expression was stronger in CCRCC; immunohistochemistry showed brightly stained areas, but not over the entire preparation.

Table III lists the results for the concordance study using the kappa coefficient and specific agreements. These data were obtained by comparing immunohistochemistry or Western blot results with histological findings (CCRCC vs non-CCRCC) and comparing the two techniques with each other. High concordance indices were observed for clear cell tumour diagnoses, and a high concordance index was also observed between the two techniques.

The percentages of positives and negatives for the two tests (according to whether tumours were clear cell or not) revealed that Western blot had a sensitivity of 95.5% and a specificity of 87.5%, compared with a sensitivity of 100% and an equal specificity of 87.5% for the immunohistochemical technique.

CA-IX expression quantitation in CCRCCs differed from one tumour to another (Figure 2). The correlation of this quantitation with tumour stage or Fuhrman nuclear grade was not statistically significant, although positive lymph nodes and tumours

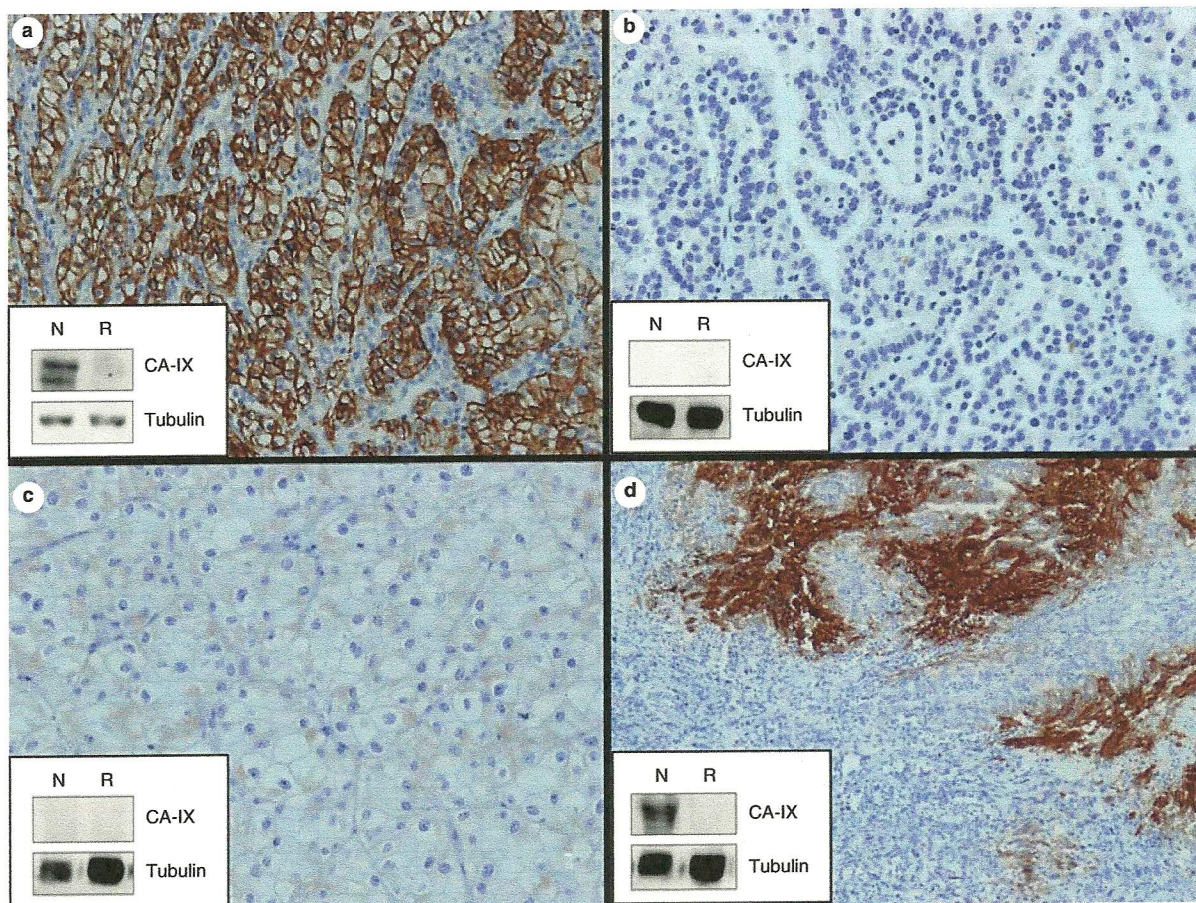


Figure 1. Images of carbonic anhydrase IX (CA-IX) expression detection by immunohistochemistry compared to Western blot detection in various renal cell carcinoma subtypes: (a) clear cell; (b) papillary; (c) chromophobe; (d) unclassifiable. N = tumour specimen; R = healthy renal tissue.

Table III. Diagnostic power of the techniques used to detect carbonic anhydrase IX (CA-IX) expression.

	Negative specific agreement (%)	Positive specific agreement (%)	Overall agreement (%)	Kappa coefficient	<i>p</i>
IHC	93.3 (78.7–98.2)	95.7 (85.5–98.8)	94.7 (82.7–98.5)	0.89 (0.74–1)	< 0.005
WB	90.3 (75.1–96.7)	93.3 (82.1–97.7)	92.1 (79.2–97.3)	0.84 (0.65–1)	< 0.005
IHC–WB	96.6 (82.8–99.4)	97.9 (88.9–99.6)	97.4 (86.5–99.5)	0.94 (0.83–1)	< 0.005

IHC = immunohistochemistry; WB = Western blot.

with higher Fuhrman nuclear grades (3 and 4 versus 1 and 2) were more likely to exhibit higher expression. The reverse trend was also observed: tumours with distant metastasis showed lower expression.

Discussion

Although gastric mucosa was originally described as the only normal tissue in which CA-IX is expressed [19], more recent studies have shown that CA-IX may be present to a lesser extent in other normal tissues. Expression is mainly present in tumours, however. In any case, CA-IX is not found in healthy renal tissue but is obviously expressed in RCC, almost exclusively in clear cell subtype. Expression has rarely been observed in other renal tumours and, therefore, it is thought that these are false positives [20,21].

The pathological diagnosis of tumours has changed in general and in renal tumours in particular, and microscopic criteria alone are no longer used [22]. The classification most commonly used at present to catalogue renal tumours, as published by the WHO in 2004 [17], separates tumours according to

histological morphology, clinical behaviour and underlying genetic alterations.

Different techniques are currently used to support the classic histopathological diagnosis, usually based on the variable expression of specific genes or proteins according to histological origin (e.g. quantitative polymerase chain reaction, microarrays, Western blot). It is known that genes related to angiogenesis are over-expressed in CCRCC and, therefore, the differing manifestations of these genes are the basis for some antiangiogenic therapies used at present or in different clinical trial phases [15].

In view of these aspects and the persistent observation of CA-IX overexpression in CCRCC, this expression could be used in diagnosis. Although CA-IX expression has been reported in subtypes other than clear cell tumours but never in chromophobe carcinoma, when expressed in non-CCRCC it is found at a much lower percentage and with less intensity [16,23–25]. There have been reports of tumours with predominantly papillary architecture, but considerable extension of cells with clear cytoplasm (considered unclassifiable in the histological classification), and some molecular studies show

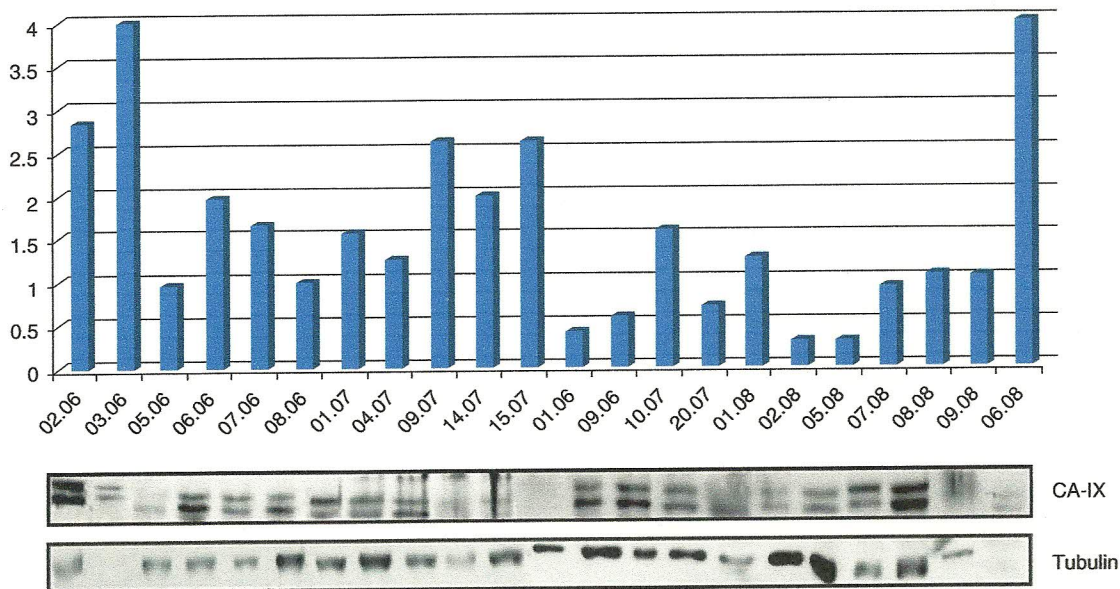


Figure 2. Quantitation of carbonic anhydrase IX (CA-IX) expression in 22 clear cell renal cell carcinomas, compared with tubulin quantity.

characteristics of clear cell tumours (e.g. *VHL* inactivation, loss of heterozygosity in the short arm of chromosome 3) that may explain CA-IX overexpression [26]. This may also be true for tumours with extensive sarcomatoid differentiation in which the cell origin is hard to categorize owing to morphological characteristics.

This study assessed the validity of two different methods for detecting CA-IX expression. Immunohistochemistry is the classic method used by pathologists and depends on their subjective assessments. Western blot is a more objective, less generalized diagnostic technique based on clinical presentation and pathology that is less subjective and produces fewer errors [27]. The present results showed high percentages of positive, negative and overall specific agreement, considering that CCRCC persistently showed CA-IX expression. A comparison of the techniques showed that both can detect CA-IX expression (kappa coefficients >0.8 in all cases). Nevertheless, slightly better results were obtained with immunohistochemistry because of one false negative detected by Western blot, a result possibly explained by the use of different CA-IX antibodies in each technique. This is due to better technical performance for each antibody with the respective detection method. Both techniques yielded the same number of false positives (one each), but both cases involved unclassifiable tumours, which can be explained by a clear cell origin or transformation, as mentioned above. Immunohistochemistry was more sensitive than Western blot, although both tests showed high sensitivity and specificity percentages. Although the limited sample used in the study does not allow these results to be generalized to use in routine practice, they are useful as a diagnostic approach.

Regarding the use of the different antibodies for Western blot and for immunohistochemistry, the authors decided to use different antibodies based on a preliminary experiment (data not shown). The antibody selected for Western blot showed a more specific and clear pattern for CA-IX, as the use of positive controls indicated, compared with the one used for immunohistochemistry. However, this antibody showed a weak signal in immunohistochemistry. Therefore, a decision was made to use the best antibody for Western blot or immunohistochemistry in order to evaluate in the best possible scenario by each technique.

Based on these findings, both techniques for CA-IX detection can be considered valid for CCRCC diagnosis, particularly in cases in which the morphological criteria are insufficient. The techniques can also occasionally be used to predict the clinical behaviour of the tumours and to consider new emerging alternative therapies in renal cancer, given that

CA-IX may be a prognostic marker that depends on expression and response to certain therapeutic agents [28,29].

The usefulness of CA-IX as a prognostic factor is controversial, although lower expression of this protein obviously entails a poorer prognosis, and a clear relationship has not been found between CA-IX expression and TNM stage or nuclear grade except in terms of survival [28,30,31]. This investigation also failed to find this relationship with prognostic factors, although Western blot testing may be more objective and the metastatic tumours presented lower expression, an apparently logical finding in keeping with the fatal prognosis. The limited sample may not allow more conclusive results, but CA-IX detection and assay by Western blot is less subjective than immunohistochemistry.

In conclusion, immunohistochemistry and Western blot techniques for detecting abnormal CA-IX protein expression in CCRCC can be used to support diagnostic techniques based on tumour morphology. In fact, abnormal expression of the protein may offer some clues about disturbances in the pathological *VHL* pathway, with down-regulation of the factors involved in angiogenesis. In this study, Western blot was not superior to the diagnostic capacity of immunohistochemical techniques, but did allow more objective assay. No direct relationship appears to exist between CA-IX expression levels and prognostic factors such as stage and nuclear grade. However, studies with more samples are required to find a firm conclusion on this point.

Acknowledgements

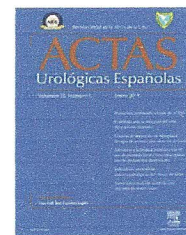
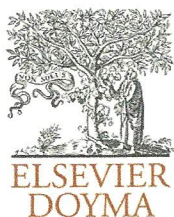
This study was supported by a grant from the Fund of Sanitary Investigation of Castilla-La Mancha (FIS-CAM) (ref. PI:2007-38) to JMGB and by a grant from the Fund of Sanitary Investigation (FIS) of the Instituto de Salud Carlos III (ref. PI080432) to ASS.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- [1] Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni JF Jr. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* 1999;281:1628-31.
- [2] Morita R, Ishikawa J, Tsutsumi M, Hikiji K, Tsukada Y, Kamidono S, et al. Allelotype of renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1991;51:820-3.
- [3] Bérout C, Joly D, Gallou C, Staroz F, Orfanelli MT, Junien C. Software and database for the analysis of mutations in the *VHL* gene. *Nucleic Acids Res* 1998;26:256-8.

- [4] Giménez Bachs JM, Salinas Sánchez AS, Sánchez Sánchez F, Lorenzo Romero JG, Donate Moreno MJ, Pastor Navarro H, et al. Determination of *vhl* gene mutations in sporadic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2006;49:1051-7.
- [5] Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9700-4.
- [6] Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet* 2009;373:1119-32.
- [7] Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000;60:7075-83.
- [8] Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, Pack S, Geil L, Johnson BE, et al. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:12596-601.
- [9] Murakami Y, Kanda K, Tsuji M, Kanayama H, Kagawa H. MN/CA9 gene expression as a potential biomarker in renal cell carcinoma. *BJU Int* 1999;83:743-7.
- [10] Liao SY, Aurelio ON, Jan K, Zavada J, Stanbridge EJ. Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* 1997;57:2827-31.
- [11] Ljungberg B. Prognostic markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* 2007;17:303-8.
- [12] Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui M, Yu H, et al. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5464-71.
- [13] Panelli MC, Wang E, Marincola FM. The pathway to biomarker discovery: carbonic anhydrase IX and the prediction of immune responsiveness. *Clin Cancer Res* 2005;11:3601-3.
- [14] Nese N, Paner GP, Mallin K, Ritchey J, Stewart A, Amin MB. Renal cell carcinoma: assessment of key pathologic prognostic parameters and patient characteristics in 47,909 cases using the National Cancer Data Base. *Ann Diagn Pathol* 2009;13:1-8.
- [15] Young AN, Master VA, Paner GP, Wang MD, Amin MB. Renal epithelial neoplasms: diagnostic applications of gene expression profiling. *Adv Anat Pathol* 2008;15:28-38.
- [16] Barocas DA, Rohan SM, Kao J, Guverich RD, Del Pizzo JJ, Vaughan ED, et al. Diagnosis of renal tumors on needle biopsy specimens by histological and molecular analysis. *J Urol* 2006;176:1957-62.
- [17] Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC Press; 2004.
- [18] Kaluz S, Kaluzová M, Stanbridge EJ. The role of extracellular signal-regulated protein kinase in transcriptional regulation of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX. *J Cell Biochem* 2006;97:207-16.
- [19] Opavsky R, Pastorekova S, Zelnik V, Gibadulinova A, Stanbridge EJ, Zavada J, et al. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* 1996;33:480-7.
- [20] Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001;158:905-19.
- [21] Gilbert SM, Whitson JM, Mansukhani M, Buttyan R, Benson MC, Olsson CA, et al. Detection of carbonic anhydrase-9 gene expression in peripheral blood cells predicts risk of disease recurrence in patients with renal cortical tumors. *Urology* 2006;67:942-5.
- [22] Young AN, Dale J, Yin-Goen Q, Harris WB, Petros JA, Datta MW, et al. Current trends in molecular classification of adult renal tumors. *Urology* 2006;67:873-80.
- [23] Leppert JT, Lam JS, Pantuck AJ, Figlin RA, Belldregrun AS. Carbonic anhydrase IX and the future of molecular markers in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2005;96:281-5.
- [24] Said J. Biomarker discovery in urogenital cancer. *Biomarkers* 2005;10(Suppl 1):S83-6.
- [25] Ficarra V, Galfano A, Novara G, Iafrate M, Brunelli M, Secco S, et al. Risk stratification and prognostication of renal cell carcinoma. *World J Urol* 2008;26:115-25.
- [26] Salama ME, Worsham MJ, DePeralta-Venturina M. Malignant papillary renal tumors with extensive clear cell change: a molecular analysis by microsatellite analysis and fluorescence in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:1176-81.
- [27] Rubio Briones J, Algaba Arrea F, Almenar S, Solsona Narbon E. Inmunohistoquímica aplicada en Urología. *Actas Urol Esp* 1999;23:819-34.
- [28] Sandlund J, Oosterwijk E, Grankvist K, Oosterwijk-Wakka J, Ljungberg B, Rasmuson T. Prognostic impact of carbonic anhydrase IX expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int* 2007;100:556-60.
- [29] Atkins M, Regan M, McDermott D, Mier J, Stanbridge EJ, Youmans A, et al. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:3714-21.
- [30] Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:802-11.
- [31] Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM, Thompson RH, Chevide JC, Zavada J, et al. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2007;25:4757-64.



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Papel de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en el carcinoma de células renales esporádico

A.S. Salinas-Sánchez^{a,*}, J.M. Giménez-Bachs^a, L. Serrano-Oviedo^b, S. Nam Cha^c
y R. Sánchez-Prieto^d

^a Servicio de Urología, Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Albacete, España

^b Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Albacete, España

^c Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Albacete, España

^d Laboratorio de Oncología Molecular, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Facultad de Medicina de la UCLM, Albacete, España

Recibido el 24 de julio de 2011; aceptado el 26 de julio de 2011

Accesible en línea el 28 de setiembre de 2011

PALABRAS CLAVE

VHL;
Anhidrasa carbónica IX;
Proteínas quinasas activadas por mitógenos;
Factor inducible por hipoxia 1 alfa;
Carcinoma renal;
Pronóstico;
Tratamiento

Resumen

Contexto: Últimamente, basándose en la implicación del gen supresor *vhl* en los casos de carcinoma de células renales (CCR), se ha evaluado la implicación de la ruta de señalización entre pVHL y el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α), ante la necesidad de encontrar nuevos marcadores diagnósticos, pronósticos y de respuesta a fármacos.

Síntesis de evidencia: La sobreexpresión de HIF-1 α confiere mejor pronóstico en pacientes afectos de CCR de tipo células claras (ccRCC). Además HIF-1 α regula otros genes, concretamente el de la anhidrasa carbónica IX (CA-IX), cuya sobreexpresión es prácticamente exclusiva de los ccRCC y su determinación útil para el diagnóstico de este subtipo. Sin embargo, no se ha demostrado la implicación de CA-IX ni en el pronóstico ni en la respuesta a inmunomoduladores o antiangiogénicos. Ello hace necesario la evaluación global de toda esta ruta: pVHL \rightarrow HIF-1 α \rightarrow CA-IX, e incluso el análisis de otras proteínas y vías de señalización que también controlan la actividad de HIF-1 α . En este último caso, las MAPK, son críticas en la activación de HIF-1 α , existiendo evidencias a nivel experimental del control sobre su actividad, aunque no se ha establecido su papel clínico como biomarcador. Si bien está demostrado el papel de las MAPK en los fenómenos de resistencia a quimio y radioterapia convencional, no lo está en la respuesta a sorafenib, dato llamativo si tenemos en cuenta que es inhibidor de varias proteínas quinasas. Recientemente se ha observado que las MAPK pueden estar implicadas en la respuesta a distintas terapias, incluidas las basadas en inhibidores de tirosín quinasa.

Conclusiones: La confirmación de estos datos supondrá una explicación a la variación observada entre pacientes, que con una misma alteración funcional del gen *vhl* presentan un distinto comportamiento biológico y clínico, y a una mejor selección de terapias no quirúrgicas.

© 2011 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: asalinas@pulso.com (A.S. Salinas-Sánchez).

KEYWORDS

VHL;
Carbon anhydrase IX;
Mitogen-activated
protein kinase;
Hypoxia inducible
factor 1 alpha;
Renal carcinoma;
Prognosis;
Treatment

Role of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) in the Sporadic Renal Cell Carcinoma**Abstract**

Context: Only on the basis of the involvement of the *vhl* suppressor gene in the cases of renal cell carcinomas (RCC), the involvement of the signaling pathway between the pVHL and the Hypoxia inducible factor 1, alpha (HIF-1 α) has been evaluated because of the need to find new diagnostic and prognostic and response to drugs markers.

Evidence synthesis: The overexpression of HIF-1 α confers better prognosis in clear cell type RCC (ccRCC). Furthermore, HIF-1 α regulates other genes, specifically that of the carbon anhydrase IX (CA-IX), whose overexpression is practically only of the ccRCC and its determination is useful for this subtype. However, the involvement of the CA-IX has not been demonstrated in the prognosis or in the response to immunomodulators or antiangiogenics. Therefore, it is necessary to make a global evaluation of all this pathway: pVHL \rightarrow HIF-1 α \rightarrow CA-IX, and even the analysis of other proteins and signaling pathways that also control the HIF-1 α activity. In the latter case, the MAPK are critical in the HIF-1 α activation, there being evidence on the experimental level of the control on its activity. although its clinical role as a biomarkers has not been established. Although the role of the MAPK in the phenomena of resistance to conventional chemotherapy and radiotherapy has been demonstrated, it has not been demonstrated in response to sorafenib, an important piece of information if we consider that it is an inhibitor of several protein kinases. Recently, it has been observed that the MAPK may be involved in the responses to different therapies, included those based on tyrosine kinase inhibitors.

Conclusions: The confirmation of these data would suppose an explanation of the variation observed between patients who, with the same functional alteration of the *vhl* gene, have a different biological, clinical behavior and better selection of non-surgical therapies.

© 2011 AEU. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Contexto

Los tumores renales suponen aproximadamente el 3% de todas las neoplasias, siendo el carcinoma de células renales (CCR) el tumor maligno más frecuente en el riñón del adulto.

Tanto a nivel general como en nuestro medio, la incidencia del CCR ha aumentado alrededor del 126% desde 1950, produciéndose un incremento anual progresivo en las tasas de incidencia del 2,3 al 4,3%, fundamentalmente debido al mayor uso de técnicas de imagen. Sin embargo, paralelamente la mortalidad se ha incrementado en un 36,5% anual, por lo que la detección incidental por sí sola no explica del todo este aumento en la incidencia, lo que nos lleva a pensar que otros factores, como los ambientales, dietéticos o genéticos, parecen estar también implicados en el creciente diagnóstico de este tumor¹. Dentro de los CCR el más frecuente es el carcinoma de células claras (ccRCC), que representa alrededor del 70%.

Los CCR pueden aparecer en el contexto de enfermedades hereditarias o de manera esporádica, clasificándose así en tumores renales familiares y tumores esporádicos. La forma esporádica representa el 96% de los casos, de ahí el gran interés en conocer los mecanismos moleculares que inician su formación. Dentro de las formas hereditarias la mejor caracterizada es la asociada al síndrome Von Hippel Lindau, el cual se caracteriza porque los individuos afectados presentan riesgo de desarrollar tumores en diferentes órganos, incluyendo los riñones, el cerebelo, la espina dorsal, el oído interno, las glándulas adrenales y el páncreas. En este síndrome se han encontrado alteraciones genéticas que afectan sobre todo al cromosoma 3. Concretamente, en los últimos años se ha identificado el gen *vhl*, localizado en

el brazo corto de cromosoma 3 (3p), catalogándose como gen supresor tumoral y estableciéndose una relación muy estrecha entre este gen y el síndrome de Von Hippel Lindau, de forma que este se encuentra alterado en más del 70% de los casos². Sin embargo, también se ha constatado la implicación de dicho gen en la aparición de casos de CCR esporádico, encontrándose una destacable relación entre alteraciones en el gen *vhl* con el CCR, fundamentalmente de tipo células claras³, aspecto también refrendado por estudios previos de nuestro grupo⁴.

Durante los últimos años, y a la vista de que los criterios diagnósticos basados únicamente en la arquitectura histológica son insuficientes, se está intentando realizar una caracterización molecular del CCR para determinar nuevos marcadores tumorales útiles tanto en el diagnóstico histológico, como en la predicción pronóstica y de respuesta a los fármacos que están desarrollándose actualmente. En este sentido, y basándose en la ya mencionada implicación del gen supresor *vhl* en los casos de CCR esporádico, se ha evaluado la implicación de la ruta de señalización entre VHL y el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) en el CCR.

Síntesis de evidencia

VíapVHL \rightarrow HIF-1 α \rightarrow CA-IX

El gen *vhl* codifica una proteína (pVHL) que se une a HIF-1 α en condiciones de normoxia, favoreciendo su degradación, mediada por ubiquitinización y por un mecanismo dependiente de prolina hidroxilasas (hidroxilación de prolina 402 y 564). Es aquí donde radica parte de la función supresora del gen *vhl*. La ausencia de una función normal de pVHL (bien por mutación bien por hipermetilación

del gen) genera una situación parecida a la hipoxia, por lo que HIF-1 α no se degrada, originando niveles altos de HIF-1 α que son característicos en el CCR⁵. Además, HIF-1 α es también un factor de transcripción que induce la activación de ciertos genes, cuyo producto proteico aumenta la disponibilidad de oxígeno mediante activación de factores angiogénicos (fundamentalmente VEGF, PDGF y eritropoyetina) o regula la adaptación metabólica cuando el oxígeno ambiental es limitado. Por el contrario, en presencia de una actividad normal de pVHL y con condiciones ambientales normales de oxígeno, HIF-1 α se degrada no ejerciendo su función. La sobreproducción de factores angiogénicos debida al aumento de HIF-1 α puede explicar la naturaleza hipervasculada del CCR y el posible estímulo al desarrollo y crecimiento tumoral⁶⁻¹⁰. Según lo descrito en otros trabajos, la sobreexpresión de HIF-1 α pudiera conferir mejor pronóstico en los pacientes afectados de ccRCC^{8,9}.

Además HIF-1 α también regula otros genes entre los que tienen especial interés las anhidrasas carbónicas (CA), en concreto el gen productor de la proteína CA-IX. Esta, a excepción de en la mucosa gástrica, se expresa fundamentalmente en tejidos tumorales, entre ellos el CCR, y es inducida también por condiciones de hipoxia^{11,12}. La sobreexpresión de CA-IX es prácticamente exclusiva de los ccRCC¹³, por lo que su determinación es útil en el diagnóstico de este subtipo celular. Cuando aparece sobreexpresada en otros subtipos surge la posibilidad de que se trate de falsos positivos o CCR con componente mixto. La expresión de CA-IX puede ser determinada por inmunohistoquímica (IHQ) o métodos directos como Western blot (WB). Los estudios hasta el momento no han demostrado la implicación de CA-IX en el pronóstico del CCR —en términos de supervivencia o progresión tumoral— ni en la respuesta a ciertas terapias inmunomoduladoras o antiangiogénicas, objetivándose únicamente en casos de CCR metastásicos¹⁴⁻¹⁷, estando la utilidad de CA-IX más dirigida al diagnóstico diferencial de los subtipos histológicos del CCR¹⁶. Por todo ello, son necesarios otros estudios que impliquen una evaluación global de toda esta ruta de señalización pVHL \rightarrow HIF-1 α \rightarrow CA-IX, e incluso el análisis de otras proteínas y vías de señalización que, como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) o ATM, controlan la actividad de HIF-1 α .

Papel de las proteínas quinasas activadas por mitógenos en el cáncer renal

Junto al mecanismo basado en la prolina hidroxilasa-VHL, la funcionalidad completa de HIF-1 α está controlada por distintos mecanismos que implican la acetilación, como se ha descrito con el de la lisina 532¹⁸ y la fosforilación. En este último caso las MAPK parecen ser críticas en la activación de HIF-1 α . Así, se ha descrito que ERK1/2 o p38 MAPK son capaces de fosforilar *in vitro* a HIF-1 α ^{19,20} y cómo la inhibición de estas dos MAPK es capaz de bloquear la expresión de genes reporteros de la actividad HIF-1 α ²¹. De hecho, es conocido cómo la reestabilización de HIF-1 α , por óxido nítrico o cromo, está mediada por MAPK²². Incluso se ha descrito cómo otra MAPK, la ERK5, puede controlar los niveles de expresión de HIF-1 α al menos en células endoteliales, promoviendo su degradación²³. Recientemente se ha demostrado también cómo la inhibición de distintas MAPK bloquea

el crecimiento de modelos celulares derivados de ccRCC²⁴. En resumen, existen notorias evidencias que sugieren que la ruta de señalización de MAPK puede ser crítica en los efectos biológicos de HIF-1 α .

Las MAPK constituyen una familia de serín/treonín quinasas activadas por factores de crecimiento y estrés. Estas proteínas desempeñan un papel clave en la transducción intracelular de señales, permitiendo a la célula integrar diferentes estímulos extracelulares. Así, las MAPK regulan procesos como mitosis, cambios en los patrones de expresión génica, movimiento, metabolismo, muerte celular programada permitiendo a las células sobrevivir, proliferar, inducir apoptosis, interactuar con múltiples tipos celulares, etc. Todos estos procesos están implicados en el correcto desarrollo del organismo, así como en su homeostasis, con implicaciones en cáncer y su terapia²⁵. Desde el punto de vista filogenético las MAPK forman parte del grupo CMGC de proteínas quinasas, del que también forman parte las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), glucógeno sintasa quinasas y quinasas CDK-like²⁶. Cada subfamilia de MAPK está compuesta por un módulo de señalización de tres quinasas evolutivamente conservadas que se activan de forma secuencial. Así, la MAPK quinasa quinasa (MAPKKK o MEKK) activa a la MAPK quinasa (MAPKK o MEK), que a su vez activa a la MAPK por fosforilación. Las MAPKKK son proteínas a menudo activadas por fosforilación o por interacción directa con proteínas de unión a GTP (como la familia Ras/Rho) en respuesta a estímulos extracelulares²⁷. La activación de dichas MAPKKK provoca la activación en residuos de serina o treonina de las MAPKK y su activación, a su vez estimula la fosforilación y activación de las MAPK mediante la fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina (motivo Thr-X-Tyr) localizados en el *loop* de activación del subdominio quinasa VIII²⁸. Una vez activas fosforilan a sus sustratos en residuos de serina o treonina adyacentes a prolina. La fidelidad en la transmisión de la señal va a venir determinada por la activación secuencial de estas proteínas mediante la participación de proteínas adaptadoras específicas, cuya función es organizar las proteínas de la ruta permitiendo una activación coordinada. La duración y la intensidad con la que se activa la ruta va a depender de la compartimentalización subcelular de las distintas moléculas implicadas en la ruta (como ejemplo PEA-15 que retiene a ERK1/2 en el citoplasma) y de la activación de fosfatasa que silencian la ruta cuando es necesario. En respuesta a estos estímulos pueden activarse tres subfamilias de proteínas MAPK: ERK, SAPK/JNK y p38 MAPK.

Por todo lo comentado anteriormente, parece lógico pensar que, además de la funcionalidad de pVHL, que es sin duda alguna la pieza clave en el proceso de transformación del ccRCC, las MAPK puedan tener un papel relevante. En este sentido es importante destacar que en el año 1995 Oka et al²⁹ describieron cómo en una serie corta de pacientes con ccRCC se detectaba una activación constitutiva de ERK1/2. No obstante, este estudio está basado en una metodología compleja (ensayos quinasa *in vitro*) y susceptible de múltiples artefactos. Más recientemente se ha propuesto el uso de p38 como un potencial biomarcador de ccRCC que se correlaciona además con el grado de Fuhrman³⁰. Otros estudios han evidenciado una expresión significativamente alta de MAPKK1 y ERK2 en el ccRCC en relación con controles, sugiriendo que esta vía pueda tener valor terapéutico contra

el ccRCC²⁴. Para probar esta hipótesis se utilizó la toxina letal del ántrax (LeTx) como un inhibidor de las múltiples vías de señalización MAPK. LeTx es una exotoxina que, en parte, se une al NH₂-terminal de MKK1, MKK2, MKK3, MKK4, MKK6 y MKK7, pero no MKK5, resultando en una pérdida de la función quinasa de las MKK²⁴.

Conclusiones

Aunque existen una gran cantidad de evidencias a nivel experimental sobre el papel de la señalización mediada por MAPK en el control de la actividad de HIF-1 α , no se ha establecido su papel clínico como biomarcador en ccRCC. Además, si bien está demostrado el papel de las MAPK en los fenómenos de resistencia a quimio³¹ y radioterapia³² convencional, no lo está en la resistencia a sorafenib, tratamiento que actualmente tiene al CCR como una de sus indicaciones³³. Este dato es llamativo si tenemos en cuenta que sorafenib, aunque es un inhibidor de varias proteínas quinasa, fue considerado inicialmente como inhibidor de Raf³⁴, que es la MAPKKK de la ruta de señalización de ERK1/2. Además, recientemente se ha observado que las MAPK pueden estar implicadas en la respuesta a distintas terapias de cáncer, incluidas las basadas en inhibidores de tirosin quinasa como en el caso de imatinib mesilato^{35,36}.

La confirmación de todos estos datos podría suponer una nueva explicación a la variación observada entre pacientes que, con una misma alteración funcional del gen *vhl*, presentan un distinto comportamiento biológico y clínico. Además, el poder determinar su relación con la respuesta a los nuevos fármacos, como sorafenib, contribuirá a una mejor selección de las terapias no quirúrgicas a administrar a estos pacientes.

Financiación

FIS (expediente: PI080432), FISCAM (expediente: PI2007/38) y FIU (2011).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Giménez Bachs JM, Donate Moreno MJ, Salinas Sánchez AS, Lorenzo Romero JG, Segura Martín M, Hernández Millán IR, et al. Incidencia creciente en el carcinoma de células renales. *Actas Urol Esp*. 2006;30:295–300.
- Akcaglar S, Yavascaoglu I, Yuruskan H, Oktay B. Genetic evaluation of von Hippel-Lindau disease for early diagnosis and improved prognosis. *Int Urol Nephrol*. 2008;40:615–20.
- Hamano K, Esumi M, Igarashi H, Chino K, Mochida J, Ishida H, et al. Biallelic inactivation of the Von Hippel Lindau tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma. *J Urol*. 2002;167:713–7.
- Giménez-Bachs JM, Salinas-Sánchez AS, Sánchez-Sánchez F, Lorenzo-Romero JG, Donate-Moreno MJ, Pastor-Navarro H, et al. Determination of *vhl* gene mutations in sporadic renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2006;49:1051–7.
- Fraga A, Ribeiro R, Medeiros R. Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urol Esp*. 2009;33:941–51.
- Stebbins CE, Kaelin Jr WG, Pavletich NP. Structure of the VHL-Elongin C-Elongin B complex: Implications for VHL tumor suppressor function. *Science*. 1999;284:455–61.
- George DJ, Kaelin Jr WG. The von Hippel-Lindau protein, vascular endothelial growth factor, and kidney cancer. *N Engl J Med*. 2003;349:419–21.
- Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J, Ljungberg B. The expression of Hypoxia-Inducible Factor 1A is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1129–35.
- Lam JS, Klatte T, Kim HL, Patard JJ, Breda A, Zisman A, et al. Prognostic factors and selection for clinical studies of patients with kidney cancer. *Clin Rev Oncol Hematol*. 2008;65:235–62.
- Ljungberg B. Prognostic markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol*. 2007;17:303–8.
- Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, Pack S, Geil L, Johnson BE, et al. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:12596–601.
- Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res*. 2000;60:7075–83.
- Liao SY, Aurelio ON, Jan K, Zavada J, Stanbridge EJ. Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res*. 1997;57:2827–31.
- Panelli MC, Wang E, Marincola FM. The pathway to biomarker discovery: carbonic anhydrase IX and the prediction of immune responsiveness. *Clin Cancer Res*. 2005;11:3601–3.
- Kim HL, Cassone M, Otvos Jr L, Vogiatzi P. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5464–71.
- Rubio-Briones J, Calatrava A, Fernández-Serra A, Ramos Ruiz R, Iborra I, García-Casado Z, et al. Expresión inmunohistoquímica de la densidad microvascular y de la anhidrasa carbónica IX en carcinoma renal. Relación con el tipo histológico y con la progresión tumoral. *Actas Urol Esp*. 2011;35:80–6.
- Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM, Thompson RH, Chevillat JC, Zavada J, et al. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:4757–64.
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 2002;111:709–20.
- Richard DE, Berra E, Gothié E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*. 1999;274:32631–7.
- Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, et al. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 α . *Cancer Res*. 2000;60:4873–80.
- Hur E, Chang KY, Lee E, Lee SK, Park H. Mitogen-activated protein kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Pharmacol*. 2001;59:1216–24.
- Gao N, Nester RA, Sarkar MA. 4-Hydroxy estradiol but not 2-hydroxy estradiol induces expression of hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor A through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/FRAP pathway in OVCAR-3 and A2780-CP70 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;196:124–35.

23. Pi X, Garin G, Xie L, Zheng Q, Wei H, Abe J, et al. BMK1/ERK5 is a novel regulator of angiogenesis by destabilizing hypoxia inducible factor 1 α . *Circ Res.* 2005;96:1145-55.
24. Huang D, Ding Y, Luo WM, Bender S, Qian CN, Kort E, et al. Inhibition of MAPK kinase signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 2008;68:81-8.
25. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 2007;26:3291-310.
26. Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773:1376-87.
27. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 2000;351 Pt 2:289-305.
28. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:320-44.
29. Oka H, Chatani Y, Hoshino R, Ogawa O, Kakehi Y, Terachi T, et al. Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1995;55:4182-7.
30. Samaras V, Tsopanomichalou M, Stamatelli A, Arnaoutoglou C, Samaras E, Arnaoutoglou M, et al. Is there any potential link among caspase-8, p-p38 MAPK and bcl-2 in clear cell renal cell carcinomas? A comparative immunohistochemical analysis with clinical connotations. *Diagn Pathol.* 2009;4:7.
31. Perona R, Sánchez-Pérez I. Signalling pathways involved in clinical responses to chemotherapy. *Clin Transl Oncol.* 2007;9:625-33.
32. Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S, et al. Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Mol Cancer Ther.* 2007;6:789-801.
33. Sciarra A, Cattarino S, Salciccia S, Alfarone A, Gentilucci A, Parente U, et al. The emerging role of targeted therapy in renal cell carcinoma (RCC): Is it time for a neoadjuvant or an adjuvant approach? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.02.003.
34. Lyons JF, Wilhelm S, Hibner B, Bollag G. Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocr Relat Cancer.* 2001;8:219-25.
35. Aceves-Luquero CI, Agarwal A, Callejas-Valera JL, Arias-González L, Esparís-Ogando A, del Peso Ovalle L, et al. ERK2, but not ERK1, mediates acquired and de novo resistance to imatinib mesylate: implication for CML therapy. *PLoS One.* 2009;4:e6124.
36. Salinas AS. Comentario a: Expresión inmunohistoquímica de la densidad microvascular y de la anhidrasa carbónica IX en carcinoma renal. Relación con el tipo histológico y con la progresión tumoral. *Actas Urol Esp.* 2011;35:87-8.