



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud (D420)

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES MEDIANTE  
TÉCNICAS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA PARA EL  
DIAGNÓSTICO Y EL PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE  
CÉLULAS RENALES

Tesis doctoral presentada por:

VÍCTOR DÍEZ NICOLÁS

Directores: Dr. F.J. Burgos Revilla, Dra. V. Gómez dos Santos y Dra. Ruppen Cañas

Alcalá de Henares, 2020

## **AGRADECIMIENTOS.**

La elaboración de una tesis doctoral exige tiempo y dedicación, horas de estudio y de trabajo. Pero además, es necesario contar con el aliento y el apoyo de las personas que te rodean. Por eso quiero dedicar esta tesis a mi mujer, Pilar. Sin su impulso, cariño y comprensión nunca la hubiera finalizado. Y a mis hijos: Victoria, Álvaro y Beltrán.

Los directores de esta tesis, el Dr. Burgos, la Dra. Gómez Dos Santos y la Dra. Ruppen, me han acompañado en este largo camino, animándome a no desfallecer, siendo comprensivos con los retrasos y tolerantes con los errores. Mi agradecimiento más sincero. Ha sido un privilegio contar con su tutela.

Quiero agradecer la colaboración de los miembros de la Unidad de Proteómica del CNIO, que junto con la Dra. Ruppen fueron fundamentales en el diseño y desarrollo de la fase experimental de este trabajo. Y a la Dra. Cristóbal, investigadora del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal, que realizó la conservación de las muestras.

Entre los agradecimientos no pueden faltar mis padres, Víctor y Celia, pues ellos pusieron las bases de mi formación espiritual, ética y académica. Siempre serán un referente en mi vida.

Y gracias a mis compañeros, de los que aprendo cada día.

## ABREVIATURAS.

### 2

2-DE  
Electroforesis en gel de 2 dimensiones

### A

ABC  
Área bajo la curva  
ACTH  
Hormona corticotropa hipofisiaria  
ADN  
Ácido desoxirribonucleico  
ANTI PD-1  
Anti proteína de la muerte programada celular  
ANTI PDL-1  
Anti ligando de la proteína de muerte programada celular  
ARG  
Arginina  
ARN  
Ácido ribonucleico

### B

BAG  
Biopsia con aguja gruesa  
BRCA1  
Gen del cáncer de mama 1  
BRP44L  
Proteína cerebral 44 o transportador de piruvato mitocondrial

### C

CAI  
Anhidrasa carbónica I  
CAIX  
Anhidrasa carbónica IX  
CCR  
Carcinoma de células renales  
CCRcc  
Carcinoma de células renales tipo células claras  
CCRcr  
Carcinoma de células renales tipo cromóforo  
CCRp  
Carcinoma de células renales tipo papilar  
CNIO  
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas  
CYS  
Cistina

### D

DAO  
D-aminoácido oxidasa  
DE  
Desviación estándar  
DIGE  
Difference gel electrophoresis  
DTT  
Ditiotreitol

### E

EAU  
Asociación Europea de Urología  
ECOG  
Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status  
EM  
Espectrometría de masas  
EMT  
Transición epitelio - mesenquimal  
ESI  
Electrospray ionization

### F

FABP1  
Fatty acid binding protein 1  
FABP7  
Fatty acid binding protein 7  
FDG  
Fluorodesoxiglucosa

### G

GAPDH  
gliceraldehid 3 – fosfato dehidrogenasa  
GLDC  
Glicin deshidrogenasa

### H

HC  
Historia Clínica  
HIF  
Factor inducible de hipoxia  
HIF1 $\alpha$   
Factor inducible de hipoxia 1  $\alpha$   
HIF2 $\alpha$   
Factor inducible de hipoxia 2 $\alpha$

HR  
Hazard ratio  
HTA  
Hipertensión arterial  
HURyC  
Hospital Universitario Ramón y Cajal

## I

IC  
Intervalo de confianza  
IC95%  
Intervalo de confianza al 95%  
IFN $\alpha$   
Interferón  $\alpha$   
IHQ  
Inmunohistoquímica  
IMC  
Índice de masa corporal  
IPA  
Ingenuity Pathway Analysis  
ISUP  
International Society of Urological Pathology  
ITIH4  
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4  
iTRAQ  
Isobaric tags for relative and absolute quantification

## L

LC  
Cromatografía de líquidos (liquid chromatography)  
LDH  
Lactato deshidrogenasa  
LYS  
Lisina

## M

MALDI/SELDI  
Matrix-assisted cad surface-enhanced laser  
desorption/ionization  
MFAP4  
Glicoproteína 4 asociada a microfibrillas  
miRNA  
Ácidos microrribonucleicos o microRNA  
MMP9  
Metaloproteasa 9  
mRNA  
ARN mensajero  
MSKCC  
Memorial Sloan Kettering Cancer Center  
mTOR  
Receptor de mamíferos de rapamicina

## N

NNMT  
Nicotinamide - N - methyltransferase

"NT"  
Tejido no tumoral de riñón con tumor

## O

OMS  
Organización Mundial de la Salud

## P

PAAF  
Punción aspiración con aguja fina  
PBRM1  
Proteína polibromo 1  
PCR  
Proteína C reactiva  
PDZK1  
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3  
PET  
Tomografía por emisión de positrones  
pg  
Picogramos  
PSM  
Asignación péptido-espectro (peptide-spectrum match)  
pVHL  
Proteína del gen de Von Hippel Lindau

## R

RMN  
Resonancia magnética nuclear  
RR  
Riesgo Relativo

## S

SCE  
Supervivencia Cáncer Específica  
SELDI/TOF  
Surface-enhanced laser desorption/ionization / Time of  
flight  
SG  
Supervivencia global  
SILAC  
stable isotope labelling by amino acids in cell culture  
SLP  
Supervivencia libre de progresión  
STAT3  
Selective signal transducer and activator of transcription

## T

TAC  
Tomografía axial computerizada  
TGF- $\alpha$   
Factor de crecimiento tumoral  $\alpha$   
TNF- $\beta$   
Factor de necrosis tumoral  $\beta$   
TNM



Tumour Node Metastasis Classification  
TOF  
Time of flight

## U

UH  
Unidades Housfield  
UISS  
University of California Los Angeles Ingegrated System  
UMPP  
Proteolisis mediada por ubiquitina  
Vía metabólica de la proteolisis mediada por ubiquitina

## V

VEGF  
Factor de crecimiento endotelial vascular  
VHL  
Von Hippel Lindau  
VPN  
Valor predictivo negativo  
VPP  
Valor predictivo positivo

## β

βHCG  
Gonadotropina coriónica humana



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Casos de CCR por 100.000 habitantes en el mundo. ....	15
Figura 2. Incidencia y mortalidad de CCR en Europa .....	16
Figura 3. Tendencia de prevalencia, incidencia y mortalidad por cáncer renal en España en hombres ....	17
Figura 4. Tendencia de prevalencia, incidencia y mortalidad por cáncer renal en España en mujeres .....	18
Figura 5. Imágenes histológicas de CCR papilar tipo 1, cromóforo y células claras.....	21
Figura 6. Estadificación del Carcinoma de Células Renales. ....	26
Figura 7. Inactivación de VHL en CCR. ....	28
Figura 8. Vías metabólicas y marcadores en carcinoma de células renales .....	29
Figura 9. Actividad de la PD-1 en la célula tumoral .....	46
Figura 10. Esquema de electroforesis 2D <sup>86</sup> . ....	48
Figura 11. Cromatografía líquida. <sup>87</sup> .....	49
Figura 12. Esquema de un espectrómetro de masas. ....	50
Figura 13: Zonificación previa a la implementación del Área Sanitaria única.....	64
Figura 14. Pirámide de población asignada al Hospital Universitario Ramón y Cajal.....	66
Figura 15. Rango dinámico de 199 proteínas plasmáticas. ....	67
Figura 16. Muestras incluidas en el estudio.....	68
Figura 17. Criotubo Nunc Roskilde 1.8ml .....	69
Figura 18. Criopreservador Bright Clinic Rapid Freezer .....	70
Figura 19. Arcón congelador Forma Scientific Modelo 926 .....	70
Figura 20. Esquema resumen de la metodología de trabajo .....	72
Figura 21. Precellys 24 Homogenizer (Bertin Instruments). ....	73
Figura 22. 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies).....	73
Figura 23. Eksigent nano LC system Ultra (Eksigent). ....	74
Figura 24. LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher). ....	74
Figura 25. Muestras incluidas en el estudio.....	75
Figura 26. Cuantificación y unificación de muestras en 4 grupos.....	79
Figura 27. Método FASP para la digestión de las proteínas en péptidos identificables. ....	80
Figura 28. Procesado y análisis de las muestras.....	82
Figura 29. Histograma de comparación de los ratios de expresión de CCRcc frente a “Control” .....	91
Figura 30. Dispersión de los ratios de expresión de las proteínas entre los grupos “NT” y “Control” .....	92
Figura 31. Rutas metabólicas más relevantes diferencialmente expresadas en “NT” frente a “Control”....	94
Figura 32. Vía metabólica de la cadena de Reacción de Fase Aguda .....	96
Figura 33. Histograma de comparación de los ratios de expresión de proteínas entre CCRcc y “Control”.99	
Figura 34. Dispersión de los ratios de expresión de las proteínas entre los grupos CCRcc y “Control”... 100	
Figura 35. Histograma de comparación de los ratios de expresión de CCRcc frente a “NT”.....	102

Figura 36. Dispersión de los ratios de expresión de las proteínas entre los grupos CCRcc y "NT".....	103
Figura 37. Dispersión de los ratios de expresión de CCRcc frente a "Control" y "NT" .....	106
Figura 38. Vías metabólicas más diferenciadas entre CCRcc y "Control" ..	107
Figura 39. Vía de la glicólisis .....	108
Figura 40. Histograma de los ratios de expresión de las proteínas de CCRcc frente a CCRcr .....	109
Figura 41. Dispersión de los ratios de expresión de las proteínas entre los grupos CCRcc y CCRcr .....	109
Figura 42. Vías metabólicas más diferenciadas entre CCRcc y CCRcr. ....	110

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nueva clasificación del cáncer renal según el grupo ISUP de Vancouver <sup>36</sup> .....	23
Tabla 2. Características de los subtipos más frecuentes de carcinoma de células renales .....	24
Tabla 3. Supervivencia cáncer específica (SCE) para pacientes tratados quirúrgicamente de CCR.....	24
Tabla 4. Clasificación de Fühman de alteraciones nucleares en CCR.....	25
Tabla 5. SCE según grado nuclear de Fühman.....	25
Tabla 6. Clasificación TNM actualizada.....	25
Tabla 7. Estadificación del CCR.....	26
Tabla 8. Síndromes hereditarios de Carcinoma de Células Renale. ....	31
Tabla 9. Síndromes paraneoplásicos del CCR.....	33
Tabla 10. Características y pronóstico de los subtipos de CCR.....	36
Tabla 11. Resumen de los nomogramas pronósticos para CCR.....	37
Tabla 12. Clasificación R.E.N.A.L. de complejidad quirúrgica en cirugía parcial de CCR.....	38
Tabla 13. Recomendaciones de la EAU para el tratamiento del CCR metastásico.....	40
Tabla 14. Biomarcadores diagnósticos en CCR.....	44
Tabla 15. Marcadores moleculares predictivos de respuesta a tratamiento en CCR.....	47
Tabla 16. Vías metabólicas implicadas en el CCR y proteínas de estas vías identificadas. ....	53
Tabla 17. Población asignada HURyC. ....	65
Tabla 18. Muestras de CCR células claras. Cantidad de proteína, concentración y volumen necesario para seleccionar 100µg.....	76
Tabla 19. Muestras de CCR cromóforo. Cantidad de proteínas, concentración y volumen necesario para seleccionar 100µg.....	77
Tabla 20. Muestras de tejido sano de riñón con CCR de células claras. Cantidad de proteína, concentración y volumen necesario para seleccionar 100µg.....	77
Tabla 21. Muestras de tejido renal sano de donante cadáver de riñón para trasplante. Cantidad de proteína, concentración y volumen necesario para seleccionar 100µg.....	78
Tabla 22. Muestras de los cuatro grupos del estudio. Cantidad de proteínas, concentración y volumen necesario para seleccionar 110µg.....	79
Tabla 23. Correspondencia de las etiquetas iTRAQ del estudio. ....	81
Tabla 24. Muestras de nefrectomía radical o parcial del estudio.....	86
Tabla 25. Datos antropométricos y anatomopatológicos de las muestras de nefrectomía radical y parcial del estudio. ....	87
Tabla 26. Datos antropométricos y anatomopatológicos de las muestras de control.....	89
Tabla 27. Listado de proteínas sobre-expresadas en “NT” frente a “Control”.....	94
Tabla 28. Listado de proteínas infra-expresadas en “NT” frente a “Control”.....	932

Tabla 29. Selección de proteínas sobre-expresadas en la comparación tejido CCRcc frente a “Control”.	101
Tabla 30. Selección de proteínas infra-expresadas en la comparación tejido CCRcc frente a “Control”.	102
Tabla 31. Listado de proteínas sobre-expresadas más relevantes en la comparación CCRcc vs “NT”	104
Tabla 32. Listado de proteínas infra-expresadas más relevantes en la comparación CCRcc vs “NT”	104
Tabla 33. Listado de proteínas sobre-expresadas entre los tejidos de sanos (“NT” y “Control”) y CCRcc.	105
Tabla 34. Listado de proteínas infra-expresadas entre los tejidos de sanos (“NT” y “Control”) y CCRcc.	106
Tabla 35. Listado de proteínas sobre-expresadas entre los tejidos CCRcc y CCRcr.	111
Tabla 36. Listado de proteínas infra-expresadas entre los tejidos CCRcc y CCRcr.	112
Tabla 37. Proteínas con potencial valor de biomarcador en CCR.	132

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	15
1.2. FACTORES DE RIESGO.....	18
1.3. PREVENCIÓN.....	19
1.4. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DEL CCR.....	20
1.4.1. Diferentes subtipos de CCR.....	20
1.4.2. Grado nuclear de Fühman.....	24
1.4.3. Clasificación TNM del CCR.....	25
1.5. ALTERACIONES GENÉTICAS DEL CCR.....	26
1.5.1. Mutaciones relacionadas con el CCR <sup>9</sup> .....	27
1.6. DIAGNÓSTICO.....	32
1.6.1. Síntomas clínicos del CCR.....	32
1.6.2. Exploración física.....	34
1.6.3. Datos analíticos.....	34
1.6.4. Estudios radiológicos.....	34
1.6.5. Biopsia renal.....	35
1.6.6. Cribado del CCR.....	35
1.7. PRONÓSTICO.....	36
1.7.1. Factores anatómicos.....	36
1.7.2. Factores histológicos.....	36
1.7.3. Factores clínicos.....	36
1.7.4. Factores moleculares.....	36
1.7.5. Nomogramas pronósticos.....	37
1.8. TRATAMIENTO.....	37
1.8.1. Tratamiento quirúrgico.....	37
1.8.2. Vigilancia activa de masas renales.....	39
1.8.3. Técnicas ablativas para el CCR.....	39
1.8.4. Tratamiento médico del CCR.....	39
1.9. BIOMARCADORES DE CCR.....	40
1.9.1. Fuente de las muestras para detección de biomarcadores de CCR.....	41
1.9.2. Tipos de biomarcadores de CCR.....	42
1.10. INTRODUCCIÓN A LA PROTEÓMICA.....	47

1.10.1. Técnicas analíticas en proteómica.....	48
1.10.2. Muestras biológicas analizadas.....	50
1.10.3. Metodologías del estudio proteómico.....	51
1.11. ANÁLISIS PROTEÓMICO EN TEJIDOS DE CCR.....	51
2. HIPÓTESIS.....	57
3. OBJETIVOS.....	59
3.1. Objetivos primarios.....	59
3.2. Objetivos secundarios.....	59
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
4.1. DISEÑO GENERAL DEL ESTUDIO.....	63
4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	63
4.2.1. Selección de pacientes y muestras.....	66
4.2.2. Tamaño de la muestra.....	67
4.3. PROTOCOLO DE TRABAJO.....	68
4.3.1. Selección de muestras y definición de los grupos del estudio.....	68
4.3.2. Técnica de obtención de muestras de tejido.....	68
4.3.3. Procesamiento de las muestras. Congelación.....	69
4.3.4. Conservación. Trazabilidad.....	70
4.3.5. Análisis histopatológico.....	70
4.3.6. Recogida de datos.....	71
4.3.7. Análisis proteómico de las muestras.....	71
4.3.8. Análisis estadístico.....	82
5. RESULTADOS.....	85
5.1. PACIENTES CON TUMOR INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.....	85
5.2. PACIENTES DONANTES CADÁVER PARA TRASPLANTE RENAL.....	88
5.3. RESULTADO DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO GLOBAL.....	90
5.4. COMPARACIÓN ENTRE TEJIDOS SIN TUMOR: TEJIDO SANO DE RIÑÓN CON TUMOR FRENTE A TEJIDO DE RIÑÓN DE DONACIÓN PARA TRASPLANTE.....	90
5.5. COMPARACIÓN ENTRE TEJIDOS SIN TUMOR (NT Y CONTROL) CON TEJIDO DE CCRcc.....	98
5.5.1. Tejido CCRcc frente a tejido "Control".....	98
5.5.2. Tejido CCRcc frente a tejido "NT".....	102
5.5.3. Tejido CCRcc frente a "Control" y "NT".....	105
5.6. COMPARACIÓN ENTRE DOS TUMORES: CCRcc FRENTE A CCRcr.....	108
6. DISCUSIÓN.....	115
7. CONCLUSIONES.....	135
7.1. Conclusiones respecto a los objetivos primarios.....	135



7.2. Conclusiones respecto a los objetivos secundarios. ....	135
8. ANEXOS. ....	139
8.1. Anexo 1. Consentimiento informado para la inclusión en el estudio. ....	139
8.2. Anexo 2. Aprobación del CEIC. ....	141
8.3. Anexo 3. Hoja para envío de muestras a Anatomía Patológica. ....	142
8.4. Anexo 4. Hoja de identificación de las muestras. Documento de trazabilidad. ....	142
8.5. Anexo 5. Beca de Investigación en Uro-oncología. Sociedad Urológica Madrileña. ....	132
9. BIBLIOGRAFÍA. ....	147



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN.

El carcinoma de células renales (CCR) es el conjunto de neoplasias malignas del parénquima renal. El CCR representa el 2-3% de todos los tumores sólidos<sup>1</sup>. Se origina en la corteza renal, y supone el 80-85% de todos los tumores renales, seguido del carcinoma urotelial (8%). El tumor de Wilms aparece en la edad infantil (5-6% del total de tumores renales). Otros tumores, como el oncocitoma, el de conductos colectores o los sarcomas renales son mucho más infrecuentes.

### 1.1. EPIDEMIOLOGÍA.

El CCR es el 9º cáncer más frecuente en varones, y el 14º en mujeres. Se estima que en 2012 hubo 338.000 casos incidentes de tumores renales en el mundo, un 90% de los cuales fueron CCR, que causaron 143.000 fallecidos<sup>2</sup>. Es la tercera neoplasia urológica más frecuente, después del cáncer de próstata y del tumor vesical, y la que mayor letalidad demuestra. La incidencia del CCR varía según las regiones y países<sup>2</sup>, siendo más frecuente en la República Checa y en Estados Unidos<sup>3</sup>. En Estados Unidos se calculan alrededor de 64.000 nuevos casos por año, y unos 14.000 muertos anuales<sup>4</sup>. En la Unión Europea los diagnósticos son alrededor de 84.000 al año, con 35.000 muertes debidas al CCR en el año 2012<sup>5</sup>. En España se registró una tasa en 2011 de 13,2 casos de CCR por cada 100.000 habitantes, esperando un aumento de su incidencia hasta aproximadamente 15 casos/100.000 habitante en 2022<sup>6</sup>, con una tendencia de ascenso de incidencia más acusada en mujeres. En 2015 la incidencia estimada de CCR en España fue de 5579 casos<sup>7</sup>. En cuanto a la mortalidad registrada en España, en el año 2015 fue de 10,58 por cada 100.000 habitantes en varones, y de 3,83/100.000 en mujeres<sup>8</sup>.

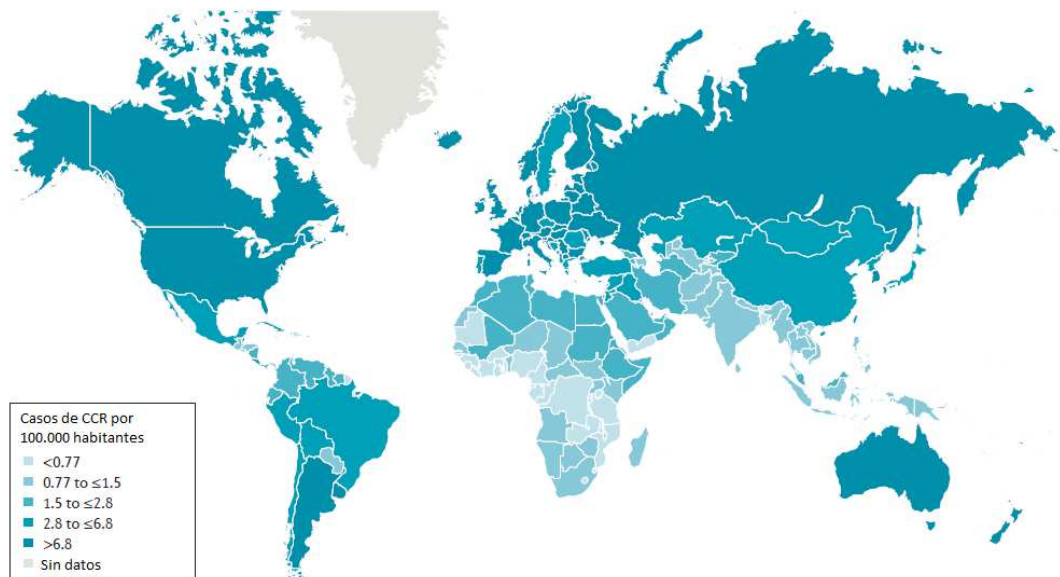


Figura 1. Casos de CCR por 100.000 habitantes en el mundo (adaptado de Hsieh y cols.<sup>9</sup>).

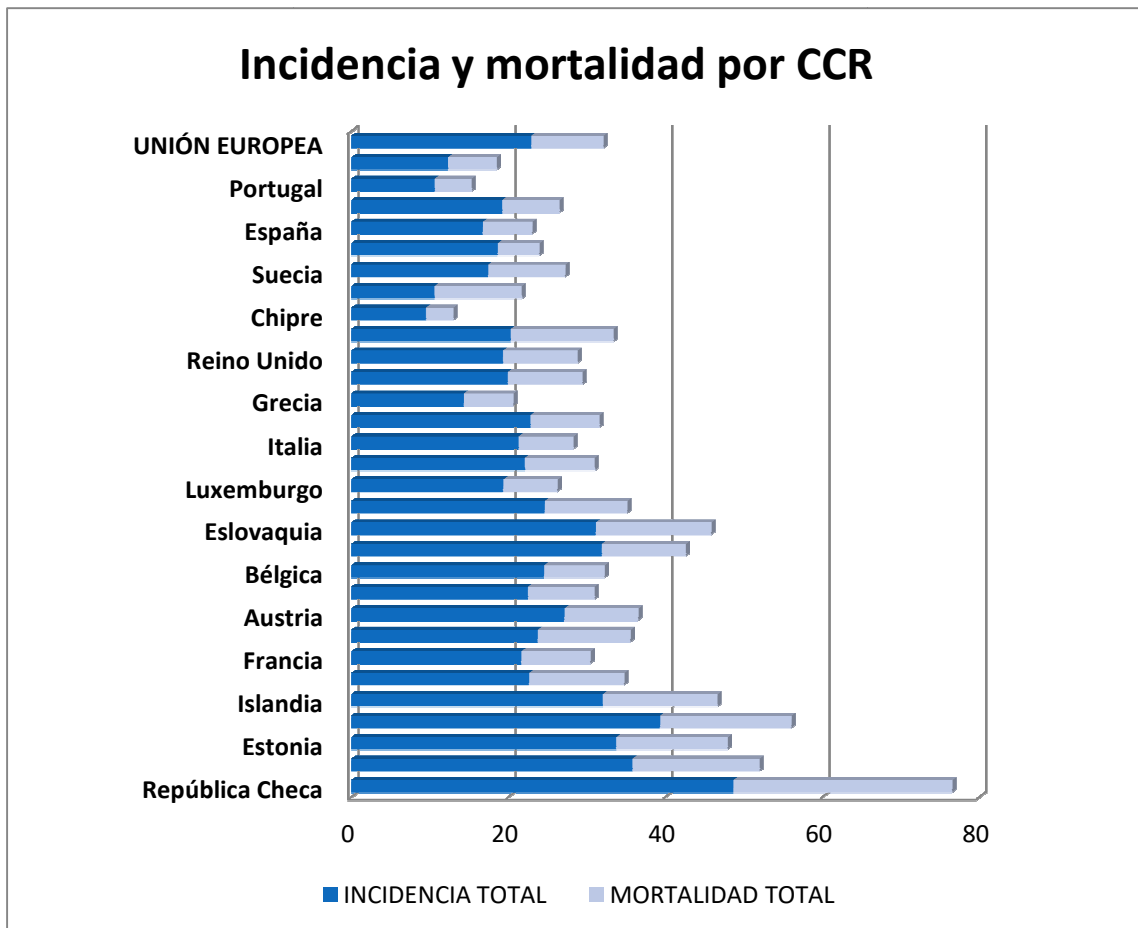


Figura 2. Incidencia y mortalidad de CCR en Europa (adaptado de Ljungberg, et al.)<sup>10</sup>.

**1.1.1. Incidencia.** La incidencia de CCR parece aumentar progresivamente a lo largo de los años, lo que no parece sólo atribuible al aumento del diagnóstico incidental; esto se evidencia en que también aumenta la incidencia en países con medios-bajos recursos sanitarios (v.g. en Iberoamérica)<sup>11</sup>. Este aumento de incidencia es más marcado en hombres que en mujeres. Dado que existe una conocida asociación entre CCR y el tabaquismo, la obesidad, la hipertensión y el estatus socioeconómico, estos factores pueden estar influyendo en este cambio de incidencia<sup>12</sup>. En cuanto a la incidencia según sexo, el CCR se presenta en hombres con una proporción 2:1 con respecto a mujeres<sup>13</sup>.

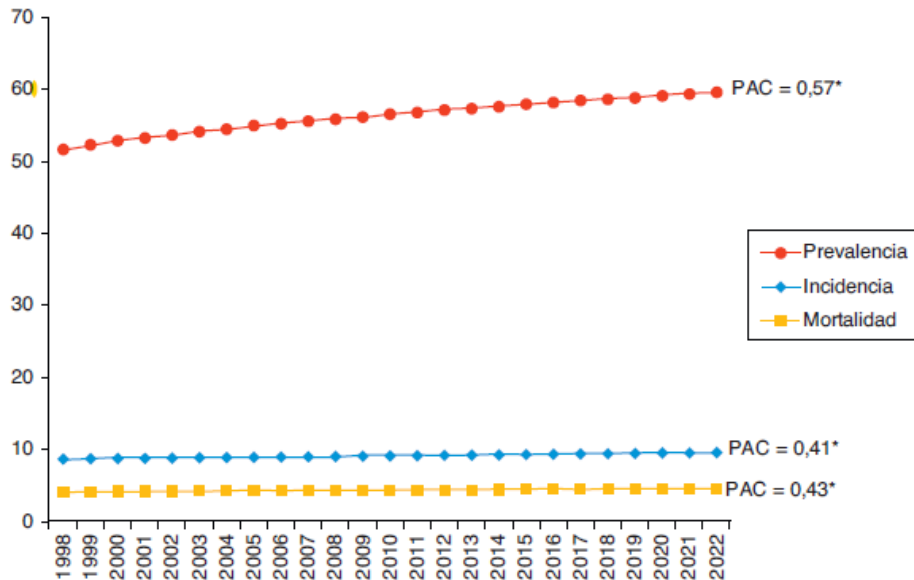
El rango de edad más probable para el desarrollo de un CCR es entre la sexta y octava décadas de la vida, con una edad media en torno a los 64 años<sup>14</sup>. Es extremadamente inusual en pacientes por debajo de 40 años<sup>15</sup>.

**1.1.2. Mortalidad.** En cuanto a la mortalidad, la supervivencia a los 5 años del diagnóstico de un CCR se ha duplicado en los últimos 50 años, desde un 34% en 1954 hasta un 73% en 2011<sup>16</sup>. No obstante, la incidencia de CCR ha aumentado tres veces más que la mortalidad<sup>17</sup>, lo que parece indicar una mejora de la supervivencia global, bien por el diagnóstico precoz, bien por un aumento de los casos incidentales, bien por una mejora en los tratamientos sistémicos.

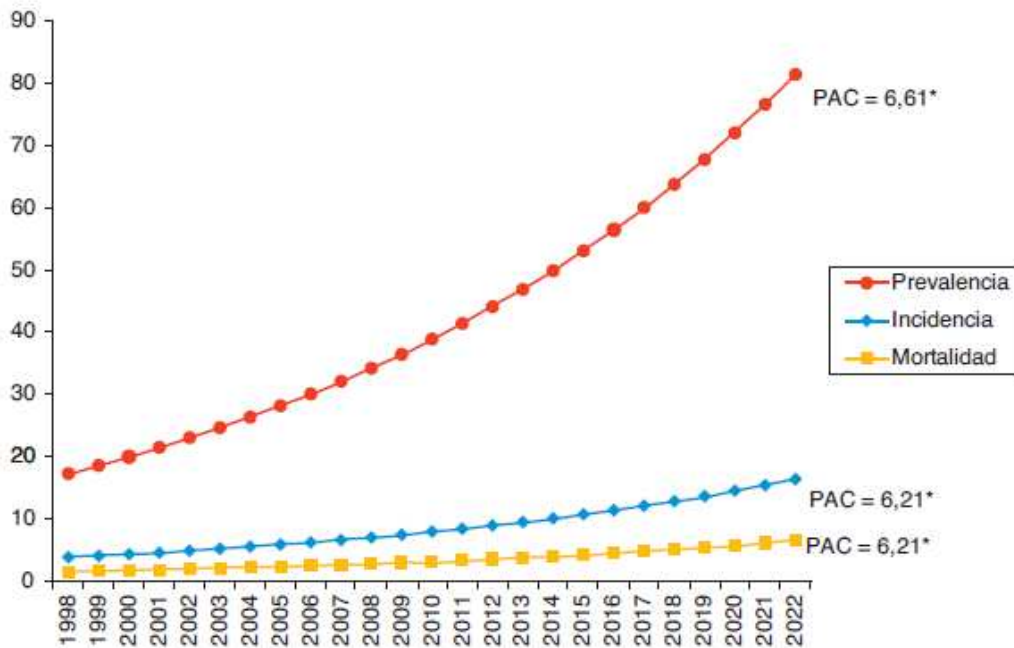
El pronóstico parece peor en hombres (con un riesgo de muerte cáncer específica 3 veces mayor que las mujeres)<sup>18</sup>.

En Europa, la tasa de mortalidad aumentó hasta los años 90 de forma paulatina, pero desde entonces se ha estabilizado<sup>1</sup>. Se ha comprobado que el desarrollo socioeconómico tiene un impacto en la mortalidad por CCR, y en los países escandinavos ésta se redujo ya desde los 80, siendo algo más tardía la disminución en Francia, Alemania, Austria, Holanda, Italia y España<sup>1</sup>. Y de forma coherente con lo anterior, aún algunos países como Croacia, Estonia, Irlanda, Grecia y Eslovaquia siguen teniendo tasas de mortalidad en aumento hoy en día<sup>19</sup>.

La mejora de las tasas de supervivencia en los países más desarrollados parece consecuencia de una serie de factores distintos: por un lado, la detección más precoz de estos tumores, habitualmente con tamaños inferiores a 4cm, que permite en la mayoría de los casos un tratamiento con intención curativa<sup>11</sup>. Por otro, los tratamientos para el CCR en fase diseminada han cambiado la expectativa de vida de los pacientes de forma reciente, aunque el acceso a estos fármacos supone una inversión considerable. De esta forma, la supervivencia cáncer específica en Europa a 5 años del diagnóstico ha pasado del 60,6% entre 2000 y 2007 a un 72,4% en 2010<sup>20</sup>.



**Figura 3.** Tendencia de prevalencia, incidencia y mortalidad por cáncer renal en España en hombres (Souza DLB, et.al.)<sup>6</sup>.



**Figura 4.** Tendencia de prevalencia, incidencia y mortalidad por cáncer renal en España en mujeres (Souza DLB, et.al.)<sup>6</sup>.

**1.1.3. Presentación.** Al diagnóstico, el CCR se puede presentar en diferentes situaciones clínicas<sup>21</sup>. Hasta el 65% de los casos son detectados en fase localizada de la enfermedad. De forma complementaria, sólo el 16% de los casos son diagnosticados con diseminación ganglionar, y otro 16% en fase metastásica.

A lo largo de los años se ha detectado una disminución del tamaño de los tumores en el momento del diagnóstico<sup>21</sup>, gracias al aumento del diagnóstico incidental del CCR mediante pruebas de imagen. Esto se tradujo en una disminución desde una media de 4,1cm en 1993 a 3,6cm en 2003.

De esta forma, y tal y como se ha comentado previamente, a lo largo de los últimos años se ha comprobado un aumento del número de casos diagnosticados debido tanto a un diagnóstico incidental cada vez mayor como a un probable aumento de la incidencia real del CCR. Este aumento de la incidencia se ha acompañado de una disminución del tamaño medio de los tumores diagnosticados. Por el contrario, tanto la probabilidad de desarrollar metástasis (30%) como la mortalidad (30%-35%) se han mantenido estables.

## 1.2. FACTORES DE RIESGO.

Se han asociado varios factores con el desarrollo del CCR, aunque se considera que el factor más relevante es el genético. A continuación, se describen los factores de riesgo establecidos para el CCR:



**1.2.1. Tabaquismo.** Se asocia no sólo a un aumento de su incidencia<sup>22</sup>, sino también a enfermedad más avanzada en el momento del diagnóstico<sup>23</sup>. Se estima que el tabaquismo aumenta un 50% el riesgo de padecer un CCR en varones, y un 20% en mujeres<sup>24</sup>.

**1.2.2. Hipertensión.** No se conoce claramente el mecanismo, pero se ha demostrado una fuerte asociación entre HTA y desarrollo de CCR<sup>25</sup>.

**1.2.3. Obesidad.** El riesgo relativo de desarrollo de CCR se incrementa progresivamente en función del incremento del índice de masa corporal<sup>26</sup>. Se estima que aumenta el riesgo de padecer un CCR un 24% en varones y un 34% en mujeres<sup>27</sup>.

**1.2.4. Enfermedad quística adquirida.** Se calcula que los pacientes en diálisis con enfermedad quística adquirida tienen hasta 30 veces más riesgo de padecer un CCR que la población general<sup>28</sup>.

**1.2.5. Exposición tóxica.** Se conoce asociación entre CCR y algún tóxico ambiental o profesional como el cadmio, el asbesto y los productos derivados del petróleo. No obstante los estudios de exposición ocupacional están limitados por la falta de datos sobre la propia exposición.

**1.2.6. Factores genéticos.** La mayor parte de los CCR son esporádicos; no obstante algunos síndromes han sido asociados al CCR hereditario: poliquistosis renal autosómica dominante, enfermedad de Von Hippel Lindau (VHL) y otros síndromes hereditarios que se tratarán de forma específica más adelante.

**1.2.7. Otros factores de riesgo.** La litiasis renal, la diabetes mellitus, el alcohol y el tratamiento con quimioterápicos han sido relacionados con el desarrollo de CCR.

### 1.3. PREVENCIÓN.

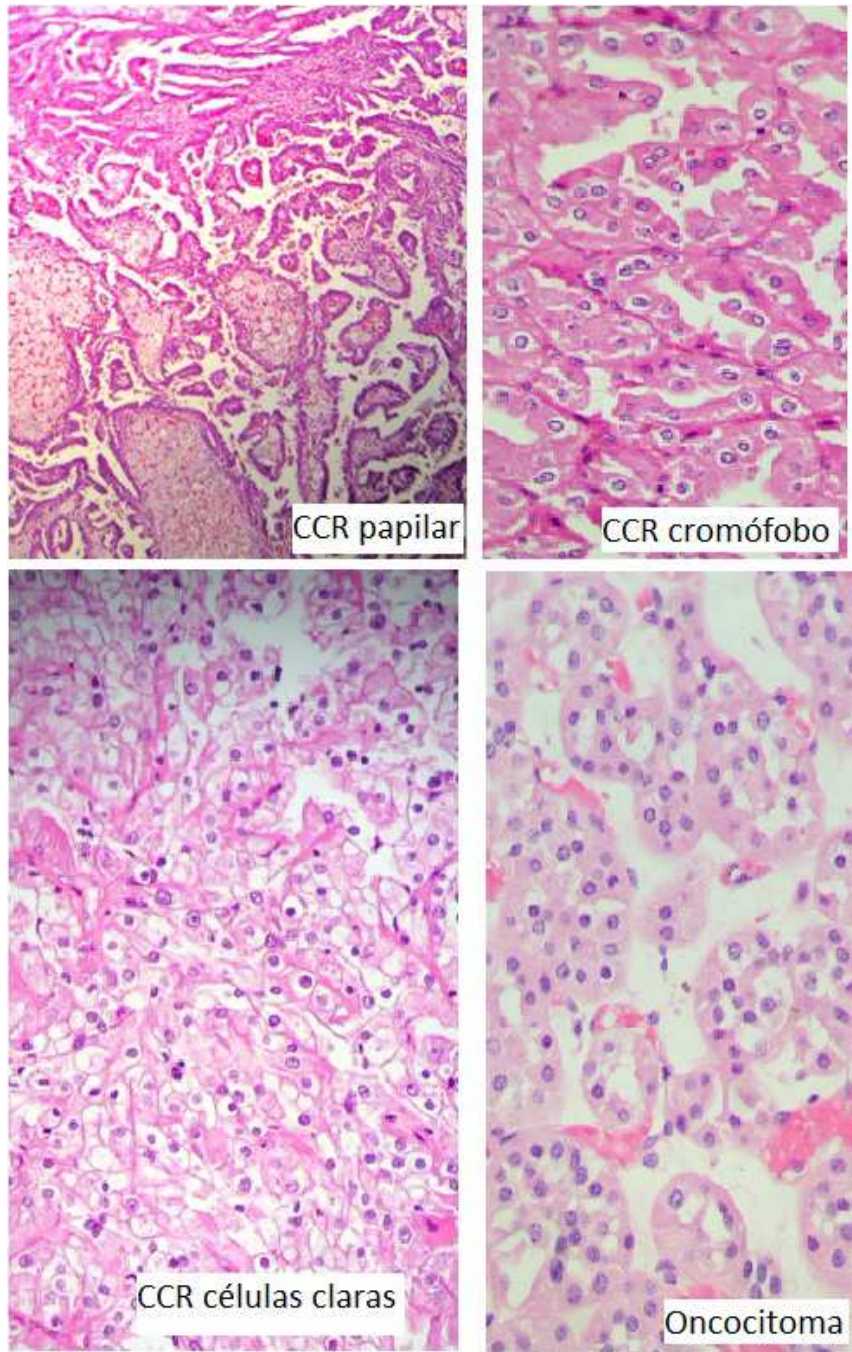
Con anterioridad se han reflejado los factores de riesgo más importantes del CCR, y la prevención se basa en evitar estos factores descritos:

- **Tabaquismo.** Con un RR de 1.38, el tabaco se asocia al CCR de forma dosis dependiente<sup>29</sup>. El riesgo disminuye a cifras normales tras 10 años sin fumar.
- **Obesidad.** El elevado IMC no sólo aumenta la incidencia de CCR, sino que empeora su pronóstico<sup>27</sup>: aumenta la tasa de metástasis, y en los pacientes metastásicos en tratamiento con terapias dirigidas empeora la supervivencia de 25.6 meses a 17.1 meses<sup>30</sup>
- **Medicamentos asociados.** Las estatinas<sup>9</sup> han demostrado disminuir el riesgo de desarrollo de CCR, así como el ácido acetil salicílico parece aumentarlo. En cualquier caso, de forma poco significativa y sin implicaciones clínicas de momento.

### 1.4. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DEL CCR.

Las lesiones sólidas renales suelen tratarse de carcinomas, aunque no puede descartarse radiológicamente que se trate de entidades benignas. Sólo el estudio anatomopatológico de la lesión puede descartar la posibilidad de un tumor maligno. En el estudio anatomopatológico consideraremos: los diferentes subtipos de CCR descritos, la clasificación TNM del mismo y la clasificación de Fühman de las alteraciones nucleares.

**1.4.1. Diferentes subtipos de CCR.** Se han descrito varios tipos de CCR según la clasificación anatomopatológica más reciente realizada por la OMS<sup>31</sup>. Menos del 5% de los CCR se consideran inclasificables<sup>9</sup>.



**Figura 5.** Imágenes histológicas de CCR papilar tipo 1, cromófono y células claras. Imagen histológica de oncocitoma. Cortesía del Dr. C. Varona Crespo.

**1.4.1.1. CCR tipo células claras.** Representa el 70-75% de los CCR. Típicamente presenta una delección del cromosoma 3p, y se origina en el epitelio del túbulo proximal<sup>32</sup>. Están asociados específicamente a la enfermedad de VHL. La mayor parte del CCRcc consta principalmente de células que contienen un citoplasma claro, aunque en algunas células predomina un citoplasma eosinófilo. El patrón de crecimiento puede ser tubular, sólido y quístico.

**1.4.1.2. CCR papilar o cromofílico (CCRp).** Representa el 10-15% de la totalidad de los CCR. Se divide a su vez en tipo 1 y tipo 2 según diferencias histopatológicas. Tienen ambos subtipos además diferencias clínicas y genéticas. La mayor parte de los CCRp contienen células pequeñas con un citoplasma escaso, pero también con características baófilas, eosinófilas o de tinción pálida. Predomina un patrón de crecimiento papilar, aunque puede haber disposiciones papilares tubulares y sólidas. Las zonas necróticas son frecuentes.

- **Tipo 1:** tienen característicamente mejor pronóstico que el resto de CCR, y se asocia con más frecuencia a carcinomas hereditarios, pese a que la mayoría siguen siendo esporádicos. Este subtipo de CCRp presenta células pequeñas y citoplasma pálido.
- **Tipo 2:** a diferencia del tipo 1, se asocia característicamente con formas más agresivas de CCR. El CCRp tipo 2 presenta células grandes y citoplasma eosinófilo.

**1.4.1.3. CCR cromófono (CCRcr).** Representa el 5-10% de la totalidad de los CCR. Se desarrolla en las células del sistema colector, y no presentan el característico aumento de lípidos y glicógeno de otros CCR<sup>33</sup>. Este subtipo de CCR suele tener también un comportamiento menos agresivo comparado con los CCRcc, con una mortalidad cáncer específica del 6% en una serie de 392 pacientes con seguimiento a 33 meses<sup>34</sup>. Habitualmente, el CCRcr presenta células grandes de contorno poliédrico, con citoplasma granular o claro.

**1.4.1.4. Oncocitoma.** Representa el 3-7% del total. Pese a que en ocasiones diferenciar un oncocitoma de un CCR por su histología es una tarea difícil, este tipo de lesiones tiene un comportamiento benigno. Habitualmente presenta un citoplasma intensamente eosinófilo y granular.

**1.4.1.5. Carcinoma de conductos colectores o de Bellini.** 1%. Es un tumor de agresividad especialmente elevada, y aparece en edades más tempranas<sup>35</sup>.

**1.4.1.6. Otros CCR<sup>36</sup>.** Según las últimas recomendaciones de la ISUP de 2012, se han añadido 5 entidades patológicas en el CCR: el CCR tubuloquístico, el CCR asociado a la enfermedad poliquística adquirida, el CCR de células claras papilar, el CCR familiar asociado a la traslocación del factor de la microftalmia familiar y el CCR asociado a la leiomiomatosis hereditaria. De forma paralela se han considerado 3 entidades emergentes: el CCR folicular thyroidlike, el CCR asociado a la deficiencia de succinato deshidrogenasa B y el CCR asociado a la traslocación del anaplastic lymphoma kinase. Todas estas entidades se han establecido para que la OMS reconozca estos subtipos como entidades independientes dentro del cáncer renal, por sus características histológicas, inmunohistoquímicas y biológicas.

## INTRODUCCIÓN

CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES		OTROS TUMORES NO CCR
BENIGNOS	MALIGNOS	OTROS TUMORES
Adenoma papilar	Carcinoma de células claras Variante de carcinoma de células claras multilocular de bajo potencial de malignidad	Tumores metanéfricos
Oncocitoma	Carcinoma papilar (tipo I y II)	Tumores nefroblásticos
	Carcinoma cromóforo Variante de tumor cromóforo híbrido	Tumores mesenquimales
	Carcinoma de conductos de Bellini	Tumores mixtos mesenquimales – epiteliales
	Carcinoma medular renal	Tumores neuroendocrinos
	Carcinomas familiares por traslocación Traslocación Xp11 Carcinoma renal t (6;11)	Tumores hematopoyéticos
	Carcinoma mucinoso tubular con células fusiformes	Tumores de células germinales
	Carcinoma renal túbulo-quístico	
	Carcinoma renal asociado a enfermedad quística adquirida	
	Carcinoma papilar de células claras	
	Carcinoma renal no clasificable	

**Tabla 1.** Nueva clasificación del cáncer renal según el grupo ISUP de Vancouver<sup>36</sup>.

TIPO HISTOLÓGICO	FACTORES GENÉTICOS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	PARTICULARIDADES
<b>CCR de células claras</b>	VHL Deleciones 3p Pérdida cromosomas 8p, 9, 14q PBRM1 BAP1	Bien delimitado Amarillento Necrosis y hemorragia Afectación venosa Degeneración quística	Hipervascularización Nidos de células claras IHQ: citoqueratinas, CA-IX, vimentina, EMA	Agresivo Túbulo contorneado proximal
<b>CCR papilar</b>	Tipo 1: HPRCC Tipo 2: HLRCC c-MET Trisomía 7 y 17	Tumor carnoso con pseudocápsula Necrosis y hemorragias	Hipovascularización Estructuras papilares IHQ: CK7	Origen en túbulo contorneado proximal Multicéntrico con frecuencia Tipo 1 relativamente benigno Tipo 2 agresivo
<b>CCR cromóforo</b>	Mutación 1q Pérdida de cromosomas:	Bien delimitado Superficie marrón	Vesículas intracitoplasmáticas IHQ: CK7	Origen en células intercalares de conductos colectores

## INTRODUCCIÓN

1,2,6,10,13,17				Buen pronóstico
<b>CCR de conductos colectores (Bellini)</b>	Pérdida de cromosomas: 1,6,8,11,18,Y	Bordes infiltrantes Color gris claro	Alto grado nuclear Mitosis Infiltrante	Mal pronóstico

**Tabla 2.** Características de los subtipos más frecuentes de carcinoma de células renales (adaptada de Palacín, A).<sup>37</sup>

VHL: Von Hippel Lindau. PBRM1: proteína polibromo 1. BAP1: proteína asociada a BRCA1. HPRCC: carcinoma de células renales tipo papilar hereditario. HLRCC: leiomiomatosis hereditaria a carcinoma de células renales. c-MET: receptor del factor de crecimiento hepatocitos. IHQ: inmunohistoquímica. CAIX: anhidrasa carbónica IX.

Existen diferencias clínicas y en pronóstico en cuanto a los distintos subtipos de CCR, y se considera que dentro de los más habituales, el de peor pronóstico es el CCRcc<sup>38</sup>.

SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA	5 AÑOS (% IC 95%)	10 AÑOS (% IC 95%)	15 AÑOS (% IC 95%)	20 AÑOS (% IC 95%)
<b>CCR cc</b>	71 (69-73)	62 (60-64)	56 (53-58)	52 (49-55)
<b>CCR p</b>	91 (88-94)	86 (82-89)	85 (81-89)	83 (78-88)
<b>CCR cr</b>	88 (83-94)	86 (80-92)	84 (77-91)	81 (72-90)

**Tabla 3.** Supervivencia cáncer específica (SCE) para pacientes tratados quirúrgicamente de CCR, en función del subtipo histológico (adaptado de Leibovich, et. al.)<sup>38</sup>

**1.4.2. GRADO NUCLEAR DE FÜHRMAN.** Las características nucleares de las células tumorales del CCR han demostrado ser un factor pronóstico independiente para el CCR, en particular para el CCRcc<sup>39</sup>. La clasificación de Fühman es una valoración basada en el tamaño y forma del núcleo y en la prominencia del nucleolo. No obstante, es poco fiable para los tumores cromóforos, y según algunos autores también para los papilares<sup>40</sup>. No obstante, las últimas recomendaciones de la ISUP sugieren que se utilice en los papilares, pero no en los cromóforos.<sup>36</sup>

GRADO	TAMAÑO NUCLEAR	FORMA NUCLEAR	NUCLEOLOS
1	10mm	Redonda y uniforme	Ausentes o poco claros
2	15mm	Irregular	Pequeños
3	20mm	Irregular	Prominentes
4	≥20mm	Atípica y multilobulada	Prominentes, con grumos gruesos de cromatina



**Tabla 4.** Clasificación de Fühman de alteraciones nucleares en CCR (adaptada de Palacín, A)<sup>37</sup>.

El grado nuclear de Fühman es un factor pronóstico independiente de supervivencia en el CCR, y por tanto está relacionado con mayor agresividad tumoral, con mayor capacidad metastásica<sup>41</sup>.

GRADO NUCLEAR DE FÜHRMAN	HR (IC 95%)
Grado 1	Referencia
Grado 2	1.16 (0.94-1.42)
Grado 3	1.97 (1.6-2.43)
Grado 4	2.82 (2.08-3.31)

**Tabla 5.** SCE según grado nuclear de Fühman (adaptado de Keegan et.al.)<sup>41</sup>.

**1.4.3. Clasificación TNM del CCR.** La estadificación del CCR se realiza en función de su tamaño, invasión extrarrenal, afectación ganglionar y de la presencia de metástasis. La clasificación TNM (*Tumour Node Metastasis*) es una herramienta muy eficaz en la predicción de la supervivencia cáncer específica (SCE), y desde su publicación ha sido actualizada repetidas veces, la última en 2017. Se ha validado también mediante estudios multicéntricos<sup>42</sup>, y se recomienda su uso en las Guías Clínicas de la EAU<sup>1</sup>, así como del resto de guías clínicas publicadas.

CLASIFICACIÓN TNM CCR 2017	
<b>TUMOR PRIMARIO</b>	
Tx	No se puede establecer el tumor local
T1	Tumor localizado en riñón, de menos de 7cm
T1a	<= 4cm
T1b	>4cm pero <= a 7cm
T2	Tumor localizado en riñón pero de más de 7cm
T2a	>7cm pero <= 10cm
T2b	>10cm
T3	Tumor extendido en sistema venoso, grasa perirrenal o seno renal
T3a	Extendido en vena renal, grasa perirrenal o grasa del seno.
T3b	Extendido en vena cava por debajo del diafragma
T3c	Extendido en vena cava por encima del diafragma, o con invasión de pared de vena cava
T4	Invasión de Gerota y/o de la glándula adrenal ipsilateral
<b>EXTENSIÓN LINFÁTICA</b>	
Nx	Desconocida
N0	No existe afectación ganglionar
N1	Afectación ganglionar
<b>METÁSTASIS</b>	
M0	No existen metástasis
M1	Presencia de metástasis

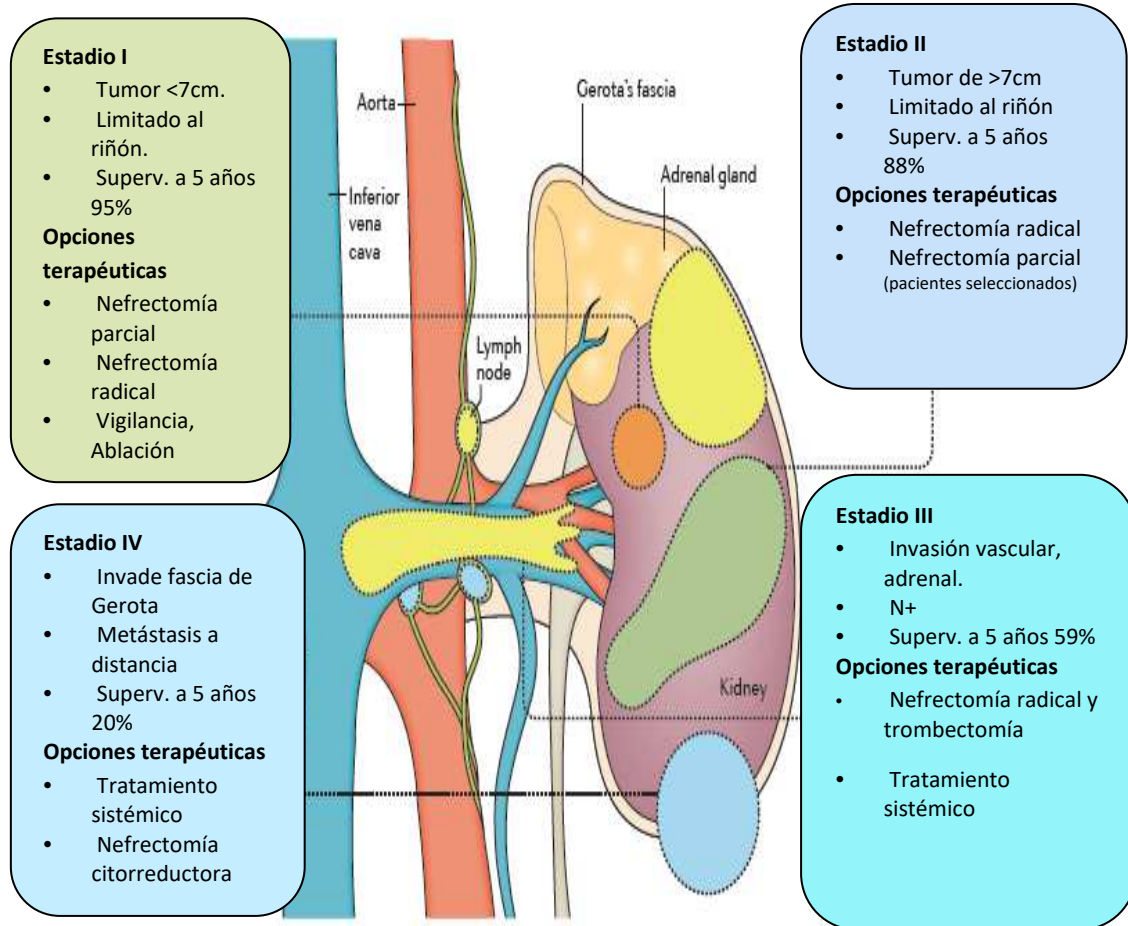
**Tabla 6.** Clasificación TNM actualizada (adaptada de las Guías Clínicas de la EAU)<sup>1</sup>.

ESTADIO	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1-2	N1	M0

## INTRODUCCIÓN

	T3	N0/N1	M0
IV	T4	N0/N1	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1

**Tabla 7.** Estadificación del CCR (adaptado de las guías clínicas de la EAU)<sup>1</sup>.



**Figura 6.** Estadificación del Carcinoma de Células Renales (adaptado de Hsieh et.al. <sup>9</sup>).

### 1.5. ALTERACIONES GENÉTICAS DEL CCR.

El CCR es habitualmente esporádico, pero son identificables alteraciones genéticas que colaboran en el desarrollo de la enfermedad. No obstante se estima que el 5% de los CCR se asocia a algún síndrome hereditario, con su propia alteración genética característica y su evolución clínica particular. En este apartado se van a tratar las mutaciones más importantes relacionadas con el CCR, así como las que específicamente se encuentran con más frecuencia en los diferentes subtipos del mismo. Además, se hablará de los síndromes hereditarios relacionados con CCR y de sus mutaciones características.

El CCR presenta característicamente una alta heterogeneidad tumoral. Es un aspecto conocido del CCR que no todas las células presentan las mismas mutaciones, y que pueden aparecer subpoblaciones con clonaciones diferentes y desarrollar en las mismas distintos cambios genéticos<sup>43</sup>.



**1.5.1. Mutaciones relacionadas con el CCR<sup>9</sup>:** se han detectado varios genes claramente relacionados con el CCR de origen familiar. El más importante es la inactivación del gen pVHL, que condiciona un aumento de la expresión de HIF1 $\alpha$ . A continuación se describen las alteraciones más destacadas desde el punto de vista genético del CCR.

**1.5.1.1. Gen VHL.** La pérdida de VHL, a través de mecanismos genéticos o epigenéticos, induce el desarrollo de CCR. Es un elemento necesario pero no suficiente para inducirlo tal y como se ha demostrado en estudios animales; otras alteraciones genéticas deben estar presentes. La proteína del gen VHL induce la degradación de los factores HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ , mediante la ubiquitinización de los mismos, lo que induce una degradación mediada por proteosomas.

La ausencia de función de la pVHL produce una acumulación de las proteínas del complejo HIF pese a tener una adecuada oxigenación. Esta acumulación de HIF induce un aumento de la angiogénesis y de la glicólisis, lo que explica que los tejidos del CCR sean ricos en lípidos y glicógenos (con la excepción de los CCRcr).

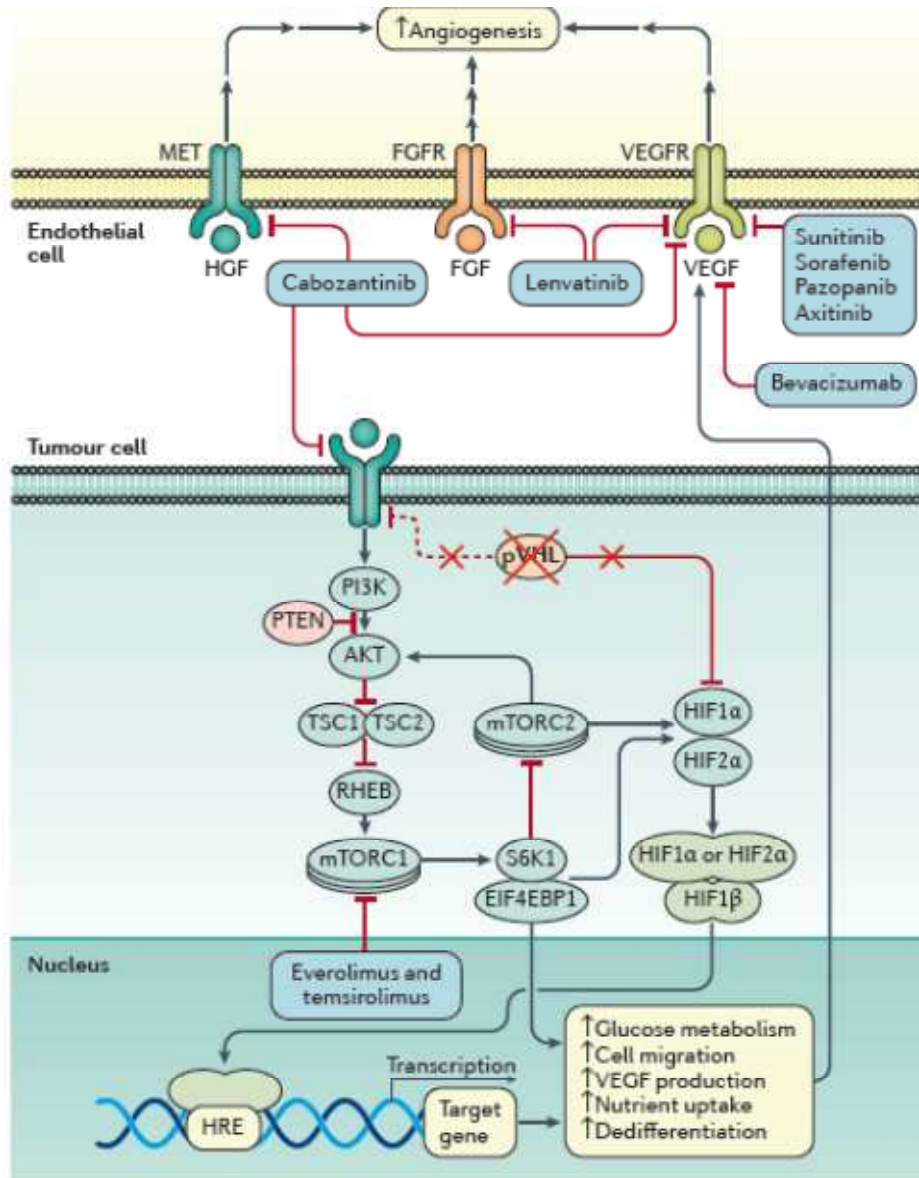
Aparentemente el primer paso en el desarrollo del CCR es la inactivación o pérdida del gen supresor tumoral VHL, presente en el cromosoma 3p. En el brazo de este cromosoma se encuentra el gen VHL. Esta delección se aprecia en el 94% de los CCRcc, y parece tener una importancia fundamental en los CCR esporádicos.<sup>44</sup>

Se cree que la pérdida de función del gen VHL del cromosoma 3p es la primera alteración por los siguientes hechos:

- Es responsable de los casos de CCR hereditario.
- Es la mutación más frecuente en todos los casos de CCR.
- Está presente incluso en los tumores de menor tamaño (que probablemente sean incipientes).
- En los casos no hereditarios, en 2 de cada 3 pacientes se presenta una inactivación bialélica<sup>45</sup>.

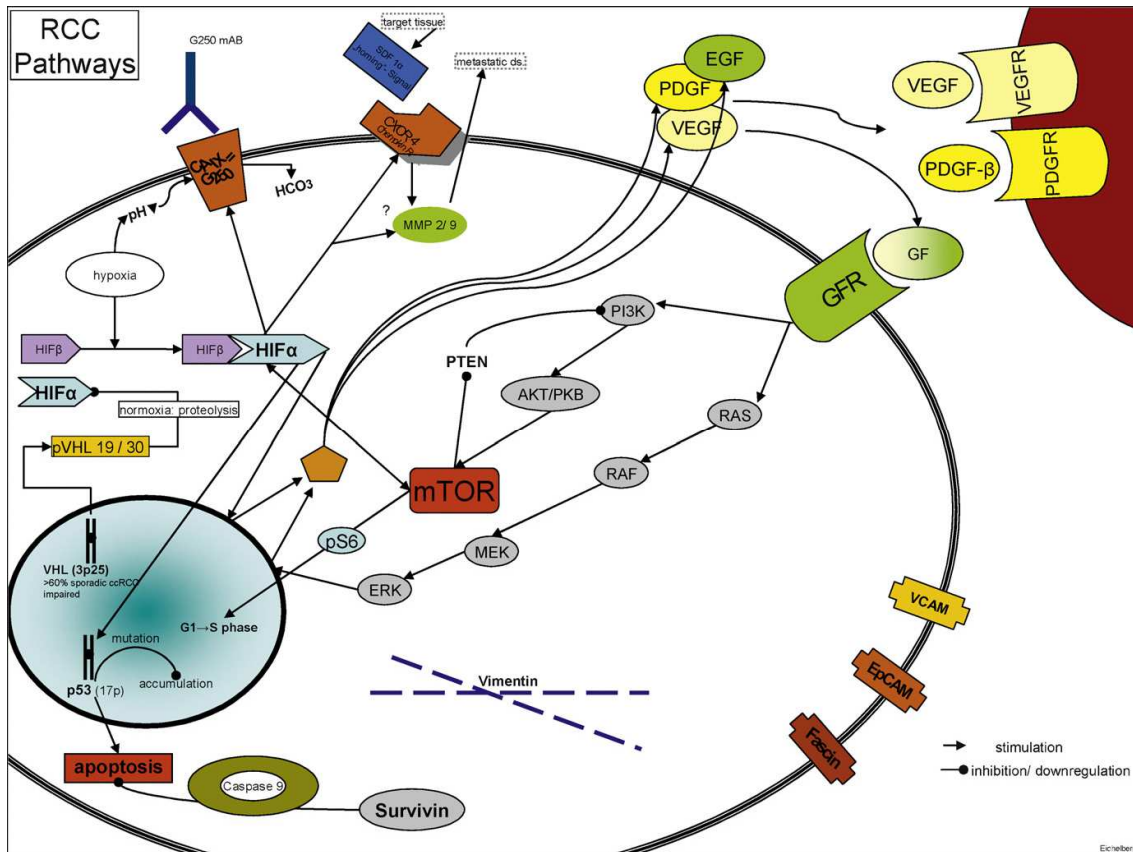
La inactivación de este gen conduce a una producción de isoformas anómalas de las proteínas pVHL19 y pVHL30, lo que conlleva una identificación de un microambiente normal como uno bajo en oxígeno, de forma que se activa la vía de la hipoxia en condiciones normales de oxigenación (ver siguiente figura). Esta vía desencadena múltiples procesos que conducen a la angiogénesis, con aumento de factores como el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF<sup>46</sup>.

De todas formas, la vía VHL, controlada por las proteínas pVHL, va más allá de la hipoxia. Está implicada también en la regulación de la paralización del ciclo celular vía p53, y en los depósitos de matriz extracelular, estrechamente vinculados a la neoangiogénesis y a la invasión tisular<sup>45</sup>.



**Figura 7.** Inactivación de VHL en CCR (adaptado de Hsieh et.al.<sup>9</sup>). La pérdida de VHL (que codifica la proteína pVHL) aumenta la producción de HIF-1 $\alpha$ . Esto conduce a un aumento de la angiogénesis, de forma simultánea a un aumento del factor de crecimiento endotelial en el microambiente tumoral, así como del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). En la imagen también se muestran las terapias dirigidas contra estos cambios patológicos.

MET: receptor del factor de crecimiento de hepatocitos. HGF: factor de crecimiento de hepatocitos. FGFR: receptor de FGF. FGF: factor de crecimiento de fibroblastos. VEGFR: receptor de VEGF. VEGF: factor de crecimiento vasculoendotelial. PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.



**Figura 8.** Vías metabólicas y marcadores en carcinoma de células renales (de Eichelberg<sup>45</sup>). La activación del gen VHL permite que se acumule HIF1 $\alpha$  en presencia de un medio con oxigenación normal. Se activa su función estimulando el gen p53 y de forma secundaria la liberación de factores de crecimiento tales como VEGF, PDGF y EGF, induciendo la neovascularización. Este ciclo está íntimamente relacionado con el complejo mTOR.

pTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; HIF: factor inducible de hipoxia; VHL: Von Hippel Lindau; MMP: metaloproteasa; mTOR: receptor de mamíferos de rapamicina; Cascada MAPK - proteína quinasa activada por mitógenos: incluye RAS, RAF, MEK y ERK); PI3k: fosfoinositol 3-quinasa; VCAM: proteína celular de adhesión vascular; EpCAM: molécula de adhesión epitelial; GFR: receptor de factor de crecimiento; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; EGF: factor de crecimiento endotelial; VEGF: factor de crecimiento vascular.

**1.5.1.2. Vía de la proteólisis mediada por ubiquitina (UMPP):** es una vía metabólica importante relacionada con la degradación proteica en el proteasoma, es decir en el complejo proteico encargado de la degradación de proteínas. Incluye múltiples genes, incluido el VHL. Parece por tanto que el gen del VHL forma parte de una alteración superior en el CCR, que está vinculada a varios genes, todos relacionados en última instancia con HIF1 $\alpha$ .

Guo et al<sup>47</sup>. encontraron alteraciones de este complejo en el 50% de su trabajo, con 98 CCRcc. Estas alteraciones genéticas incluyen, además del gen VHL, el gen BAP1, cuya alteración está presente en el 6-10% de los CCR, aunque esta mutación es más frecuente en los tipos CCRcc (hasta el 15%).

Las alteraciones genéticas en la vía de la UMPP incluyen otros genes de importancia, como PBRM1 y BRCA1<sup>48</sup>.

**1.5.1.3. Otras mutaciones en CCR.** A continuación se detallan otras mutaciones frecuentes en el CCR.

- **PBRM1:** presente en el 29-41% de los CCR, la presencia de esta mutación está asociada con estadios más avanzados (T3) incluso en masas de pequeño tamaño. Es específica del CCRcc, lo que tiene interés en el diagnóstico diferencial de los subtipos de tumor. Está ubicado en el cromosoma 3p y es un gen supresor<sup>49</sup> que codifica una proteína del complejo remodelador de cromatina.
- **Inactivación de los genes modificadores de histonas.** La inactivación de dos genes codificadores de enzimas relacionadas con la modificación de la histona, especialmente la proteína SETD2 (alteración presente en el 8-12% de los CCR) y la JARID1C, están relacionadas en la patogénesis del CCR, especialmente de los CCRcc.<sup>50</sup>
- **Anomalías en la división celular.** El desarrollo de CCR también conlleva anomalías en la división celular. Incluye específicamente genes del complejo p53 (represor tumoral) y de la familia Ras. Pese a que las mutaciones del p53 son raras en los CCR, sí que se encuentra habitualmente sobre-expresada en la mitad de los casos<sup>51</sup>.
- **KDM5C.** Presente en el 4-7% de los CCR. Es un gen que codifica una proteína relacionada con la regulación de la transcripción y la remodelación de cromatina. La vía metabólica de la cromatina también se ve alterada por la modificación de otros genes relacionados con el CCR, como PRBM1<sup>52</sup>.
- **MTOR:** presente en el 5-6% de los tumores. Tiene interés pues se ha demostrado un papel de los inhibidores del complejo mTOR en el tratamiento de los CCR diseminados<sup>1</sup>.
- **Alteraciones del complejo MET.** El complejo MET se encuentra en el cromosoma 7. La alteración de este gen es característica del CCRp tipo 1. En estos tipos de CCR se suele apreciar un aumento del número de copias del cromosoma 7, con un aumento de la actividad significativo del complejo MET<sup>53</sup>.
- **Activación del complejo Fumarato hidratasa.** Esta alteración es característica de los CCRp tipo 2. Se asocia así mismo con la activación del complejo NRF2-ARE<sup>53</sup>.
- **Sobreexpresión del gen KIT.** Los CCRcr no presentan habitualmente la delección del cromosoma 3p. En cambio, suele encontrarse sobreexpresada la función del gen KIT<sup>54</sup>.

**1.5.1.4. CCR asociado a enfermedades genéticas.** Además de los CCR esporádicos, con sus alteraciones genéticas características ya comentadas, existen CCR asociados a síndromes hereditarios y genéticos, que tienen sus propias alteraciones. Estos síndromes hereditarios habitualmente están acompañados de otros tipos de tumores, además del CCR, y la expresión de CCR en los pacientes que tienen estos síndromes es variable. En la siguiente tabla (tabla 8), se resumen los principales síndromes genéticos asociados al CCR, con el gen responsable, la proteína alterada, la penetrancia de CCR en esos pacientes y los otros tipos de tumor que pueden presentar.

## INTRODUCCIÓN

	SÍNDROME	GEN	PROTEÍNA	INCIDENCIA DE CCR	OTRAS EXPRESIONES CLÍNICAS
CCR células claras	<b>Von Hippel - Lindau</b>	VHL (3p)	pVHL	25-45%	Hemangioblastoma Tumores neuroendocrinos Feocromocitoma
	<b>Mutación BAP1</b>	BAP1 (3p)	BAP1 <i>BRCA-associated protein 1</i>	---	Cáncer de mama Melanoma
	<b>CCR asociado a SDH</b>	SDHB (1p) SDHC (1q) SDHD (11q)	Succinato deshidrogenasa	5-15%	Paraganglioma Tumor carotídeo
CCR papilar	<b>Leiomatosis hereditaria y CCR</b>	FH(1q)	Fumarato hidratasa	2-21%	Leiomiomas uterino Cáncer de mama
	<b>CCR papilar hereditario</b>	MET (7q)	HGFR <i>Hepatocyte growth factor receptor</i>	---	Exclusivamente CCR
Tumores múltiples	<b>Birt-Hogg-Dubé</b>	FLCN (17p)	Foliculina	34%	Fibrofoliculomas Quistes pulmonares
	<b>Esclerosis tuberosa</b>	TSC1 (9q)	Hamartina Tuberina	2-4%	Astrocitomas subependimarios Angiomolipomas Quistes renales
	<b>Síndrome de Cowden</b> <i>Síndrome de hamartoma múltiple</i>	PTEN (10q)	Fosfatasa Tensina homóloga	34%	Cáncer de mama Cáncer de endometrio Cáncer tiroideo Cáncer de próstata
	<b>HPT-JT</b> <i>Hyperparathyroidism jaw tumour syndrome</i>	HRPT2 (1q)	Parafibromina	---	Cáncer de paratiroides Carcinoma uterino Quistes renales

**Tabla 8.** Síndromes hereditarios de Carcinoma de Células Renales (adaptado de Hsieh et.al<sup>9</sup>).

### 1.6. DIAGNÓSTICO.

Las manifestaciones clínicas clásicas del CCR (dolor en flanco, masa palpable y hematuria) son infrecuentes. En la actualidad más del 50% de los diagnósticos se hacen de forma incidental, en el contexto de pruebas diagnósticas no dirigidas a esta patología<sup>1</sup>, debido al aumento exponencial de la realización de pruebas no invasivas en los países desarrollados.

Es conocida la posibilidad de desarrollar un síndrome paraneoplásico secundario al CCR<sup>9</sup>, que puede cursar con hipercalcemia, fiebre y eritrocitosis.

El diagnóstico de CCR es básicamente radiológico, con confirmación histológica tras el tratamiento en la mayor parte de los casos.

#### 1.6.1. Síntomas clínicos del CCR.

Como se ha comentado anteriormente, la mayor parte de las masas renales son asintomáticas, y no palpables, hasta las fases finales de la enfermedad. Las manifestaciones clínicas clásicas son infrecuentes, de forma que pocos pacientes consultan por dolor, masa palpable o hematuria.

En cuanto a los pacientes sintomáticos, se identifica un síndrome paraneoplásico en el 30% de ellos<sup>55</sup>. En la siguiente tabla (tabla 9) se resumen los principales síndromes paraneoplásicos más frecuentes del CCR.

## INTRODUCCIÓN

FORMA PARANEOPLÁSICA	ÓRGANO	MEDIADOR	SÍNTOMA	
ENDOCRINOLÓGICA	CENTRAL	ACTH	Sd. Cushing	
		Prolactina	Hiperprolactinemia	
	PERIFÉRICO	βHCG	Ginecomastia	
		PTHrP	Hipercalcemia	
		Glucagon	Diabetes	
		Insulina	Hipoglucemia	
		Serotonina	Carcinoide	
		EPO	Policitemia	
		IL-6 G-CSF	Neutrofilia / Leucocitosis	
		Ferritina	Anemia	
NO ENDOCRINOLÓGICA	MUCOCUTÁNEO	TGF-α	Acanthosis nigricans	
			Enf. Stills	
			Vasculitis	
			Ictiosis	
			Sd. Wells	
			Eritrodermia	
			Penfigoide	
			Amiloidosis	
			Dermatomiositis	
			Artritis idiopática	
		SISTEMA CENTRAL	ANNA-1	Encefalitis límbica
			Anti-MA2	
			Anti-PCA-2	Ataxia cerebral
			Anti-VGKC	
			GAB	Sd. Stiff
			Antianfifisina	Esclerosis lateral (ELA)
		CORAZÓN		Insuficiencia cardiaca
		HÍGADO	IL-6	
			Hepatotoxina	Sd. Stauffer
			Enzimas lisosomales	
		SD. CONSTITUCIONAL	IL-1	Sd. constitucional
			IL-6	
			TNF-β	

**Tabla 9.** Síndromes paraneoplásicos del CCR (adaptado de Hegemann y cols)<sup>55</sup>.

ACTH: hormona corticotropa.

βHCG: gonadotropina coriónica humana.

PTHrP: proteína relacionada con la hormona paratiroidea.

EPO: eritropoyetina.

IL-6: interleukina 6.

G-CSF: factor estimulante de granulocitos.

TGF-α: factor de necrosis tumoral α.

ANNA-1: anticuerpo nuclear antineuronal 1.

Anti-MA2: anticuerpo neuronal nuclear.

Anti-PCA-2: proteína 2 antidegeneración cerebelar.

Anti-VGKC: anticuerpo anticanales iónicos de potasio.

GAB: IL-6: IL-1: interleukina 1.

TNF-β: factor de necrosis tumoral β



### 1.6.2. Exploración física.

La exploración física sólo tiene una utilidad limitada en el diagnóstico del CCR. Sin embargo, los hallazgos siguientes deberían desencadenar la práctica de exploraciones radiológicas:

- masa abdominal palpable
- adenopatía cervical palpable
- varicocele que no se reduce
- edema bilateral en las extremidades inferiores, indicativo de afectación venosa.

### 1.6.3. Datos analíticos.

Los parámetros analíticos que deben evaluarse en un paciente con diagnóstico de masa renal sospechosa de CCR son:

- Creatinina sérica.
- Filtrado glomerular (FG).
- Hemoglobina.
- Velocidad de sedimentación globular.
- Fosfatasa alcalina.
- LDH.
- Calcemia corregida.

La función renal diferenciada (función de cada riñón de forma individualizada) debe calcularse en casos de tumor bilateral, función renal comprometida y en pacientes con trastornos coexistentes que favorezcan una insuficiencia renal futura, tales como la poliquistosis renal o la enfermedad vasculorrenal<sup>1</sup>.

### 1.6.4. Estudios radiológicos.

La herramienta fundamental del diagnóstico del CCR es el estudio mediante pruebas de imagen. De hecho, la información que ofrecen es tan precisa que la biopsia de la masa renal no es habitual en el proceso diagnóstico. Existen multitud de estudios que pueden aportar información en el CCR, pero los más importantes son los siguientes:

**1.6.4.1. Ecografía renal.** La mayor parte de las masas renales se diagnostican en contexto de una ecografía indicada por otro motivo. Se identifica en esta exploración una lesión sólida en el parénquima renal. En ocasiones se identifica un quiste complicado Bosniak III o IV. En estos casos, la ecografía renal con contraste intravenoso ofrece una información adecuada para el diagnóstico diferencial de quiste complejo y CCR<sup>56</sup>.

**1.6.4.2. TAC con contraste.** Incluye de forma sistemática el tórax, abdomen y pelvis, y la utilización de contraste yodado tras una fase sin contraste<sup>1</sup>. Es capaz de evaluar adecuadamente el tamaño, la extensión local y afectación vascular y la presencia de metástasis. El realce de las masas renales se determina comparando los valores de Unidades Hounsfield (UH) obtenidos antes y después de la administración de contraste. Una variación en más de 20UH es un dato sólido de realce que apoya el diagnóstico de CCR. A fin de optimizar el diagnóstico diferencial, se deben incluir imágenes de la fase nefrográfica, que permite la representación óptima de las masas renales<sup>57</sup>. El TAC ofrece información sobre la función y morfología del riñón contralateral, la extensión del tumor primario, la afectación venosa, la afectación adenopática, el estado de glándulas suprarrenales y la presencia de metástasis. Se



recomienda realizar una reconstrucción coronal abdominal para valorar la infiltración de estructuras adyacentes, y para caracterizar mejor la presencia de invasión venosa<sup>57</sup>.

**1.6.4.3. Resonancia nuclear magnética (RMN).** Aporta poca información añadida al TAC con contraste, aunque algunos estudios sugieren una mejor estadificación de la invasión vascular con esta técnica. Es necesario de igual modo un estudio dinámico, con fase basal y fase con contraste.

**1.6.4.4. Otras pruebas radiológicas no sistemáticas.** No son habituales en el diagnóstico del CCR, pero en ocasiones tienen un papel las siguientes pruebas: gammagrafía ósea, TAC craneal y PET-TAC con 16-FDG. Por otro lado, la arteriografía y cavografía han ido perdiendo utilidad a lo largo de los años, siendo en la actualidad pruebas de utilización marginal.

**1.6.4.4.1. Arteriografía renal:** el papel de esta prueba, invasiva y con posibles complicaciones, ha quedado relegado con las pruebas de imagen rutinarias actuales. Es excepcional que deba solicitarse<sup>1</sup>.

**1.6.4.4.2. Renograma isotópico diurético y gammagrafía renal:** su función queda relegada en la actualidad a casos de tumor bilateral, o de tumor unilateral con uno de los riñones de menor tamaño que el contralateral.

**1.6.4.4.3. Gammagrafía ósea:** existe un amplio consenso respecto a que la inmensa mayoría de las metástasis óseas en CCR son sintomáticas al diagnóstico, de forma que es un estudio que se reserva a casos sintomáticos<sup>1</sup>.

**1.6.4.4.4. TAC craneal:** de la misma forma que la gammagrafía ósea, se reserva a casos sintomáticos o a pacientes con múltiples metástasis viscerales.

**1.6.4.4.5. PET-TAC con 16-FDG:** no ofrece mejor tasa de diagnóstico que las pruebas convencionales, así que no tiene de momento indicación en el CCR<sup>1 58</sup>.

### **1.6.5. Biopsia renal.**

Dentro de las pruebas de estudio histopatológico de las masas renales se encuentran la punción aspiración con aguja fina (PAAF) y la biopsia renal con aguja gruesa (BAG). La PAAF tiene una mayor tasa de resultados no concluyentes, en parte por el importante componente necrótico de los tumores renales, de forma que habitualmente se recomienda la realización de BAG<sup>1</sup>. La BAG, por el contrario, ofrece buenas tasas de diagnóstico, y tiene un papel creciente en la vigilancia activa de las masas renales pequeñas y en las masas tratadas mediante técnicas ablativas<sup>1</sup>. No está recomendada, no obstante, en masas renales diagnosticadas con técnicas de imagen dinámicas (TAC o RMN) que tengan planeada una intervención quirúrgica<sup>1</sup>. No obstante, hay que destacar que entre el 10 y el 20% de las BAG de masas renales no son diagnósticas<sup>59</sup>.

La concordancia entre el resultado histológico de una BAG y el de la pieza de extirpación quirúrgica es bueno, alrededor del 90%<sup>59</sup>. Es recomendable evitar la zona central del tumor, sobre todo en masas grandes, para disminuir el tejido necrótico en la muestra.

### **1.6.6. Cribado del CCR.**

Con la actual evidencia, no existe recomendación para el cribado sistemático del CCR. Además, las masas renales se diagnostican de forma progresiva con un tamaño cada vez menor<sup>1</sup>. Por otra parte, la

ausencia de biomarcadores séricos de CCR lo hace factible sólo con la realización de pruebas diagnósticas radiológicas.

No obstante, esta situación cambia en los pacientes con síndromes hereditarios asociados al CCR. En estos pacientes deben realizarse pruebas de imagen periódicas para el diagnóstico precoz y tratamiento de masas lo más pequeñas posibles, con el objetivo de preservar la función renal.

### 1.7. PRONÓSTICO.

Los factores que influyen en el pronóstico pueden clasificarse en: anatómicos, histológicos, clínicos y moleculares<sup>1</sup>.

#### 1.7.1. Factores anatómicos.

Los factores anatómicos incluyen el tamaño, la invasión venosa, la invasión capsular, afectación de la glándula suprarrenal, afectación ganglionar y metástasis a distancia. Mayoritariamente, estos factores son los que se agrupan en la clasificación TNM. La afectación venosa ha sido considerada como hallazgo de mal pronóstico en CRR, pero varios estudios han demostrado que pacientes con trombo en la vena pueden ser rescatados con un abordaje quirúrgico agresivo. Se estima una supervivencia a 5 años de 45-69% para aquellos pacientes con trombo en la vena y tumor confinado al riñón<sup>16</sup>.

#### 1.7.2. Factores histológicos.

Los factores histológicos incluyen: subtipo histológico, grado nuclear de Fühman, la invasión microvascular, la diferenciación sarcomatoide, la presencia de invasión del sistema colector y el grado de necrosis tumoral.

Las diferencias pronósticas entre los distintos subtipos de CCR se resumen en la siguiente tabla.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	FRECUENCIA (%)	T3-4 / M+ / N+ AL DIAGNÓSTICO	FÜHRMAN 3-4	SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA (HR)
CCRcc	80-90%	28%	28.5%	Referencia
CCRp	6-15%	17.6%	28.8%	0.64-0.85
CCRcr	2-5%	16.9%	32.7% *	0.24-0.56

**Tabla 10.** Características y pronóstico de los subtipos de CCR (adaptado de las Guías Clínicas de la EAU)<sup>1</sup>. \* El grado de Fühman no parece aplicable a los CCRcr.

#### 1.7.3. Factores clínicos.

Dentro de los factores clínicos se incluye el estado del paciente, la presencia de síntomas, el estado nutricional y la caquexia, la presencia de anemia y recuento de plaquetas.

#### 1.7.4. Factores moleculares.

Se han descrito varios marcadores moleculares predictores del pronóstico del CCR, como la anhidrasa carbónica IX (CAIX), VEGF o HIF1 $\alpha$ . No obstante, ninguno de estos marcadores ha mejorado la precisión actual de los sistemas pronósticos clínicos, ni ha sido validado externamente. Por este motivo, en la actualidad no están recomendados en la práctica clínica<sup>1</sup>.

### 1.7.5. Nomogramas pronósticos.

En los últimos años se han desarrollado y validado externamente múltiples sistemas pronósticos, más precisos que el TNM o el grado de Führman. En la siguiente tabla se resumen los más destacados.

	TNM	ECOG	KARNOFSKY	SÍNTOMAS	FÜHRMAN	NECROSIS	TAMAÑO	T DE DIAGNÓSTICO A TRATAMIENTO	LDH	CALCIO	HEMOGLOBINA	NEUTRÓFILOS	PLAQUETAS
UISS	X	X			X								
SSIGN	X				X	X	X						
KARAKIEWICZ	X			X	X		X						
MSKCC			X					X	X	X	X		
HANG			X					X	X	X	X	X	X

**Tabla 11.** Resumen de los nomogramas pronósticos para CCR (adaptada de las guías clínicas de la EAU)<sup>1</sup>.

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; LDH: lactato deshidrogenasa; MSKCC: Memorial Sloan Kettering Cancer Center; SSIGN: Stage Size Grade Necrosis; UISS: University of California Los Angeles Integrated System.

## 1.8. TRATAMIENTO.

El tratamiento del CCR sigue siendo básicamente su extirpación quirúrgica, bien mediante nefrectomía radical o parcial<sup>1</sup>. Incluso en tumores metastásicos, el papel de la nefrectomía citorreductora se conoce desde principios de los años 90, en el contexto del tratamiento sistémico mediante citoquinas. Aunque la mejora de la respuesta al tratamiento sistémico mediante cirugía citorreductora en el nuevo escenario de terapias dirigidas debe ser confirmada, de momento se sigue asumiendo como beneficioso, siempre y cuando el riesgo quirúrgico no exceda ese teórico beneficio, y fundamentalmente en casos en que la mayor carga tumoral se encuentre localizada en el riñón.

**1.8.1. Tratamiento quirúrgico.** Sigue siendo el tratamiento fundamental del CCR, y el único con intención curativa, obviando las técnicas ablativas de pequeñas masas renales. Con el paso de los años se ha incrementado el peso de la cirugía conservadora de nefronas disminuyendo la indicación de cirugía radical.

### 1.8.1.1. Nefrectomía radical.

La extirpación completa del riñón, con la grasa perirrenal circundante y contenida en la Gerota, y en ocasiones también la glándula suprarrenal, se denomina nefrectomía radical. Sigue siendo la indicación terapéutica en tumores T2 o más, y en muchos de los T1b. Con el paso del tiempo, la cirugía laparoscópica ha ido desplazando a la cirugía abierta, incluso en los tumores de mayor tamaño, aunque sigue siendo una limitación el acceso a masas de más de 10cm o con invasión vascular o trombo en vena renal.

La indicación de linfadenectomía durante la cirugía renal sigue siendo controvertida. De momento está recomendada exclusivamente en los casos en que se aprecien ganglios aumentados de tamaño en las pruebas de imagen preoperatorias o durante la cirugía. No obstante, menos del 20% de las adenopatías sospechosas en pruebas de imagen se corresponden finalmente con adenopatías patológicas en el análisis histopatológico. En los casos en que no se identifican ganglios aumentados en las pruebas de imagen, hasta 6 ensayos clínicos han establecido que la linfadenectomía no está asociada a una mejora de la supervivencia<sup>1</sup>. No obstante, la linfadenectomía sí que tiene un papel importante en la estadificación y evaluación pronóstica del CCR, dado que la presencia de adenopatías afectadas es un

marcador independiente de mal pronóstico.

La suprarrenalectomía se recomienda exclusivamente en tumores de polo superior de más de 5cm o si hay cambios radiológicos en los estudios previos. En los casos en que no se presenten estas particularidades, la suprarrenalectomía no ha demostrado modificación en la supervivencia global (SG) ni SCE<sup>60</sup>.

**1.8.1.2. Cirugía conservadora de nefronas (nefrectomía parcial).**

Es la indicación más extendida en tumores pT1, y es de elección en pacientes monorrenos, con CCR bilateral o síndromes hereditarios. Tiene una similar supervivencia cáncer específica en pT1, con mejor función renal a largo plazo<sup>1</sup>.

Incluso dentro de los tumores pT1a, la dificultad quirúrgica es variable en función de varios aspectos, como la localización del tumor, su disposición central o periférica, su proximidad al hilio o su localización anterior o posterior. Por ese motivo se han desarrollado diferentes clasificaciones para evaluarlas<sup>9</sup>. Los nomogramas más extendidos son la clasificación R.E.N.A.L. y la clasificación de Padua. Las siglas de R.E.N.A.L. identifican los 5 elementos analizados en esta clasificación: el radio tumoral, la localización más o menos exofítica, la proximidad tumoral al sistema colector en milímetros, la localización anterior o posterior y la localización en el plano anteroposterior (polar o medial). El uso de estos sistemas de clasificación es útil, y permite evaluar y predecir la morbilidad previa a una cirugía conservadora o a técnicas ablativas.

	1 punto	2 puntos	3 puntos
<b>Radio (cm)</b>	<=4	4-7cm	>7
<b>Exofítico</b>	>50%	<50%	Endofítico
<b>N Cercanía a la vía (mm)</b>	<=4	4-7cm	>7
<b>Anterior / Posterior *</b>			
<b>Localización **</b>	Polar	Intermedio	Medial

**Tabla 12.** Clasificación R.E.N.A.L. de complejidad quirúrgica en cirugía parcial de CCR (adaptado de Kutikov y cols.)<sup>61</sup>.

\* No se asigna puntuación en este ítem. Se asigna A, P o X en función de localización.

\*\* Se establecen tres líneas imaginarias sobre el órgano: interpolar superior / medio, interpolar medio/ inferior y medial. Se identifica polar como por encima o por debajo de una de las líneas polares. Intermedio si cruza estas líneas polares. Medial si >50% de la masa cruza una línea polar o si cruza la línea medial.

No se han encontrado diferencias a largo plazo entre cirugía laparoscópica o abierta, de forma que se opta en función de la complejidad quirúrgica y de la experiencia del cirujano, por una u otra técnica. En cuanto a la cirugía robótica, en los análisis comparativos frente a cirugía laparoscópica ofrece resultados comparables tanto en márgenes afectados como en tiempo de isquemia y tiempo quirúrgico<sup>62</sup>; no obstante la tendencia actual se inclina por la cirugía robótica en los tumores de localización más desfavorable por permitir una extirpación del tumor más precisa, con tiempos de isquemia menores.

Los márgenes afectados por tumor están presentes en un 1-6% de los casos, independientemente de la técnica utilizada<sup>63</sup>. No obstante su implicación clínica está en entredicho y en el momento actual no está recomendada la indicación de nefrectomía radical. No obstante, los pacientes con márgenes positivos

deben ser informados de una tasa de recidiva local algo mayor, con una mayor probabilidad de necesitar un tratamiento posterior, y se debe establecer un protocolo de seguimiento mediante técnicas de imagen más intenso<sup>64</sup>.

La cirugía conservadora de nefronas ofrece una mejor función renal postoperatoria que la nefrectomía radical, con menor posibilidad de insuficiencia renal a medio o largo plazo tras el tratamiento; no obstante, la tasa de complicaciones es mayor, fundamentalmente a expensas de una mayor tasa de hemorragia, la posibilidad de fistula urinaria o la presencia de hematuria por fistulas arteriovenosas o pseudoaneurismas, lo que se relaciona con una mayor tasa de reintervención (2.5% frente a 0.2% en cirugía radical)<sup>65</sup>.

### **1.8.2. Vigilancia activa de masas renales.**

Es una opción recomendable en pacientes mayores o con pluripatología asociada, dado que tienen un bajo riesgo de mortalidad relacionada con el CCR<sup>66</sup>. Se define como vigilancia activa el seguimiento de las masas renales mediante pruebas de imagen repetidas en el tiempo, con indicación de tratamiento activo en los casos de progresión clínica durante el seguimiento (crecimiento mayor a 0.5cm anuales o masa renal de más de 4cm)<sup>67</sup>. Por el contrario, la actitud expectante se reserva para pacientes cuyas comorbilidades desaconsejan el tratamiento activo, y en estos casos no se recomienda realizar seguimiento mediante pruebas de imagen salvo indicación clínica<sup>1</sup>.

### **1.8.3. Técnicas ablativas para el CCR.**

Al igual que la vigilancia activa, puede considerarse una opción recomendable en pacientes mayores o con pluripatología asociada. Está recomendado realizar biopsia durante el procedimiento, para confirmar histopatológicamente la lesión y establecer un pronóstico en función de su naturaleza. Están publicados resultados con 90% de eficacia con un 20% de complicaciones, aunque parece algo mayor el riesgo de recurrencia local comparado con la nefrectomía parcial<sup>68</sup>.

### **1.8.4. Tratamiento médico del CCR.**

El tratamiento sistémico del carcinoma renal diseminado ha cambiado drásticamente en los últimos años gracias a la introducción de las nuevas terapias dirigidas. El tratamiento con citoquinas ofrece un beneficio clínico discreto a expensas de una elevada toxicidad. Se considera que el beneficio del tratamiento con citoquinas está limitado a los pacientes con CCRcc y características de buen pronóstico. No obstante, en los últimos meses han surgido numerosas alternativas en el campo de la inmunoterapia que parecen avanzar de nuevo un cambio de paradigma en el tratamiento del CCR diseminado. Las moléculas más importantes en el momento actual dentro del tratamiento del CCR se dividen en agentes dirigidos (inhibidores de la tirosín quinasa e inhibidores del mTOR), y agentes inmunoterápicos.

#### **1.8.4.1. Terapias dirigidas.**

**1.8.4.1.1. Inhibidores de la tirosín quinasa.** Siguen constituyendo la primera y segunda línea en tratamiento del CCR diseminado. Las moléculas de más importancia son: sunitinib, sorafenib, pazopanib y axitinib.

**1.8.4.1.2. Inhibidores de mTOR.** Se establecen como tratamiento de segunda línea. Everolimus y sirolimus.

1.8.4.2. Inmunoterapia.

1.8.4.2.1. Citoquinas. Se conoce su eficacia desde los 90, aunque con bajas tasas de respuesta y gran morbilidad asociada: IFN $\alpha$  y IL-2.

1.8.4.2.2. Anti PDL-1 o anti ligando de la proteína de muerte programada celular 1: avelumab y atezolizumab.

1.8.4.2.3. Anti PD-1 o anti proteína de muerte programada celular 1: nivolumab y pembrolizumab.

En la actualidad no existe un consenso sobre la elección consecutiva de los tratamientos de primera y segunda línea, aunque en la tabla siguiente se resumen las recomendaciones de la EAU en 2017 para el CCR diseminado.

	1ª LÍNEA	2ª LÍNEA	3ª LÍNEA
<b>BAJO RIESGO IMDC</b>	<b>Sunitinib* Pazopanib*</b>	<b>Cabozantinib* Nivolumab*</b>	<b>Cabozantinib* Nivolumab*</b>
	<b>Ipilumab* Nivolumab*</b>	<b>Anti VEGF*</b>	<b>Otra terapia dirigida*</b>
<b>INTERMEDIO O ALTO RIESGO IMDC</b>	<b>Ipilumab* Nivolumab*</b>	<b>Anti VEGF*</b>	<b>Otra terapia dirigida*</b>
	<b>Cabozantinib Sunitinib Pazopanib</b>	<b>Anti VEGF Nivolumab</b>	<b>Otra terapia dirigida*</b>

**Tabla 13.** Recomendaciones de la EAU para el tratamiento del CCR metastásico (adaptado de las guías clínicas de la EAU)<sup>1</sup>.

\*\* Marcadas con asterisco las alternativas con recomendación fuerte.

1.9. BIOMARCADORES DE CCR.

Pese a que ha aumentado el diagnóstico de masas renales incidentales, y por tanto la media de tamaño del CCR al diagnóstico ha disminuido paulatinamente, el diagnóstico de masas localmente avanzadas o en fase metastásica no se ha visto reducido, y aún hoy en día se calcula que en el caso de CCRcc hay un 25-30% de casos metastásicos desde el diagnóstico<sup>69</sup>, con una supervivencia a 5 años inferior al 10%<sup>70</sup>.

En este contexto, y de forma análoga a otros tumores, se ha desarrollado una intensa actividad investigadora orientada a la detección de biomarcadores para el CCR. La búsqueda en Pubmed de biomarcadores de CCR muestra 2926 entradas desde 2010.

En un concepto amplio de biomarcador de un tumor, se pueden establecer diferentes subtipos: clínicos (síntomatología, HTA), plasmáticos (proteínas detectables en muestras de tejidos o líquidos plasmáticos) y genéticos (mutaciones presentes en el genoma del paciente).

No obstante, al hablar de biomarcador de un tumor maligno usualmente se entiende como la presencia en concentración anómala (por elevación o disminución) de una proteína identificable en muestras de tejido, plasma o líquidos de secreción, que se relacione directamente con la presencia de un tumor maligno, su pronóstico o con su posible respuesta a diferentes tratamientos.

Dado que un biomarcador se define por tanto como una proteína en cantidad anómala relacionada con el tumor maligno, es necesario conocer a fondo las bases genéticas y moleculares del CCR.

En los últimos años, los estudios sobre las bases moleculares de CCR han ofrecido grandes avances, tanto que en la actualidad el pronóstico del CCR metastásico ha cambiado tras la introducción de los nuevos fármacos dirigidos, posibles gracias al conocimiento de los procesos moleculares que se desarrollan en este tumor<sup>9</sup>.

No se ha validado de momento ningún biomarcador de CCR que tenga utilidad clínica en el diagnóstico o pronóstico del CCR. En la literatura existente se encuentran elevado número de posibles marcadores, que finalmente no han llegado a demostrar eficacia clínica.

### **1.9.1. Fuente de las muestras para detección de biomarcadores de CCR.**

Los marcadores tumorales pueden identificarse en diferentes muestras: tejido, muestras séricas o plasmáticas o muestras en excreción. En el caso del CCR, también en orina. En estas diferentes muestras también será diferente la concentración de aquellas proteínas potencialmente válidas como biomarcadores.

**1.9.1.1. Detección de biomarcadores en tejido tumoral.** La gran ventaja de la utilización de esta fuente de proteínas es que la concentración de éstas es la más alta posible, debido a la proximidad con la célula tumoral. No obstante, existen problemas asociados a las muestras tisulares que no han sido resueltos: por un lado, estos tejidos presentan una gran heterogeneidad en las muestras. Por otro, en estudios comparativos entre diferentes muestras se ha encontrado que hasta 2 de cada 3 mutaciones genéticas no se encontraban en todas las muestras tumorales comparadas de un mismo paciente<sup>46</sup>.

**1.9.1.2 Detección de biomarcadores en sangre periférica y muestras plasmáticas.** Desde un punto de vista práctico y clínico, es el medio en que más útil puede resultar la detección de biomarcadores, aunque también tiene limitaciones<sup>46</sup>: por un lado, la concentración de las proteínas relacionadas con el tumor es mucho menor que en tejidos, y por tanto más compleja su detección en un medio con gran cantidad de proteínas con un rango dinámico de más de 10 órdenes de magnitud (desde pg/ml a mg/ml)<sup>71</sup>. Además, las proteínas derivadas del tumor pueden degradarse en sangre periférica debido a la actividad de las proteasas, y no ser finalmente identificables.

**1.9.1.3. Detección de biomarcadores en orina.** En relación con el CCR, la detección en orina ofrece grandes ventajas teóricas. De hecho, en los análisis del proteoma eliminado por orina se han identificado más de 1500 proteínas, muchas de ellas extracelulares, lisosomales y de plasma, pero también proteínas de membrana, probablemente presentes debido a la secreción de las mismas en exosomas<sup>72</sup>. Esto permite plantear que la orina es un medio adecuado donde identificar biomarcadores. No obstante, aunque la detección en orina ofrecería grandes ventajas teóricas, en la práctica su utilidad está muy limitada por los siguientes hechos<sup>46</sup>: la orina es extremadamente heterogénea en función de múltiples parámetros, lo que dificulta la determinación de un rango de concentración del biomarcador; además la



concentración suele ser baja. Por otra parte, las muestras de orina están con frecuencia alteradas por la presencia de microorganismos que modifican su composición proteica.

De momento es en las muestras tisulares donde se han realizado más avances, y la identificación de un marcador tisular con suficiente potencia podría después colaborar a su identificación en plasma u orina en una fase posterior.

### 1.9.2. Tipos de biomarcadores de CCR.

Los biomarcadores de CCR pueden dividirse en función del objetivo que tengan: pueden estar orientados al diagnóstico del tumor, al establecimiento de un pronóstico del mismo o a la evaluación de una respuesta al tratamiento.

**1.9.2.1. Biomarcadores diagnósticos en CCR.** Sigue siendo el campo con más publicaciones, con más de 3500 entradas desde 2010 en PubMed. El objetivo del establecimiento de marcadores diagnósticos de CCR ya ha sido comentado: el CCR es asintomático hasta fases avanzadas de la enfermedad, y se diagnostica incidentalmente con pruebas radiológicas, pero hasta el 12% de las masas hipercaptantes vistas en esas pruebas tienen una histopatología benigna<sup>68</sup>. Este porcentaje varía en función del tamaño de la lesión, y asciende hasta el 45% en casos de lesiones de menos de 1cm, mientras que es sólo del 7% en tumores de más de 7 cm<sup>46</sup>.

Se han propuesto múltiples marcadores en el diagnóstico del CCR, pero ninguno ha demostrado de momento utilidad clínica ni se utiliza en la práctica diaria. A continuación, se presentan los marcadores diagnósticos de CCR con más soporte en la literatura hasta la fecha. Un resumen de estos resultados se presenta en la tabla 14.

**1.9.2.1.1. HIF1 $\alpha$ .** En un estudio comparativo entre tejidos con CCRcc de 32 pacientes y tejidos de otras características, se demostró la presencia de HIF1 $\alpha$  en concentraciones elevadas en el 75% de los CCRcc, pero solo en el 37% de los otros tejidos. Así mismo comprobaron que ninguno de los tumores con HIF1 $\alpha$  normal presentaban mutación del gen VHL<sup>73</sup>

En cuanto al resto de la vía de hipoxia, el **VEGF** está íntimamente ligado al HIF1 $\alpha$  y a la vía ligada a VHL. De hecho, la inhibición de esta proteína ha sido la mayor revolución en cuanto a las terapias dirigidas del CCR. Por este motivo, se ha estudiado como posible biomarcador. Dada su vinculación a VHL y HIF1 $\alpha$ , sería de esperar que su presencia fuera mayoritaria en CCRcc frente a otros subtipos de CCR, pero de forma paradójica, se ha demostrado mucho más presente en CCRp, con hasta un 69% de muestras con sobreexpresión del mismo, frente a un 29% en los CCRcc, según un estudio en muestras de CCR desarrollado por Yildiz et.al. Por esta presencia relativamente baja en CCRcc, no parece tener por sí solo futuro como biomarcador<sup>45</sup>.

**1.9.2.1.2. Anhidrasa carbónica IX (CAIX).** En la cascada de hipoxia celular iniciada por HIF1 $\alpha$  tras la supresión del gen VHL, uno de los eslabones es la CAIX. Tiene un papel importante en la regulación del pH del microambiente celular.

Se ha propuesto la posibilidad de detectar la CAIX en una masa renal o metastásica mediante PET-TAC marcado con un anticuerpo monoclonal anti-CAIX (124 I-girentuximab), con resultados de sensibilidad del 86%, especificidad del 85,9% y valor predictivo positivo del 94%<sup>74</sup>. Se trata de un ensayo fase III, pendiente de completar el desarrollo comercial<sup>75</sup>.



**1.9.2.1.3. Ácidos nucleicos séricos.** Los ácidos microrribonucleicos (miRNAs) son segmentos cortos no codificantes que se asocian con diversas situaciones patológicas. Su papel en la carcinogénesis es desconocido, al menos hasta el momento, aunque existen múltiples estudios que relacionan algunos de ellos con el CCR. Estudios pequeños y no validados han identificado algunos microRNA (miRNA) como potenciales biomarcadores de CCR. Los miRNA son segmentos cortos no codificantes de ARN, que se han demostrado útiles como marcadores tumorales en otros cánceres, así como marcadores de hipoxia y daño tisular. Se han publicado múltiples propuestas de miRNA, y de paneles de varios miRNA, como posibles marcadores de CCR. Aunque ningún estudio ha sido validado de forma externa, se destacan a continuación los que ofrecen mejores resultados.

- miR 210. Es un miRNA regulado por la vía metabólica del HIF1- $\alpha$ . En un estudio de Zhao et.al.<sup>76</sup> se estudió su presencia tanto en el tejido tumoral, en comparación con tejido sano del mismo órgano (32 pacientes), como en sangre periférica (68 enfermos frente a 42 controles sanos). El área bajo la curva (ABC) del miR 210 sérico fue de 0.874, con una sensibilidad del 81% y una especificidad del 79.4%. Además, se comprobó que los niveles séricos de miR-210 descendieron de forma significativa una semana después de la cirugía del CCR.
- miR 378, miR451, miR1233.<sup>77</sup> En este estudio de Redova et.al. se compararon las concentraciones de miRNA entre 15 pacientes con CCR y 12 voluntarios sanos. Se identificaron 30 miRNA sobreexpresados y 11 infraexpresados. La combinación de miR378 y miR451 ofreció un resultado de sensibilidad del 81% con especificidad del 83% y un ABC de 0.86.

**1.9.2.1.4. Péptidos séricos y aminoácidos.** En un estudio con 189 pacientes con CCRcc y 104 controles sanos se identificaron 8 aminoácidos claramente elevados en los pacientes con tumor: cisteína, histidina, leucina, tirosina, prolina, valina, lisina y ornitina. En este estudio, la identificación sérica elevada de estos aminoácidos mostró alto poder diagnóstico, con ABC de 0.81. No obstante, se trata de un estudio retrospectivo sin validación externa<sup>78</sup>.

En otro estudio con 15 pacientes con CCR y 51 controles sanos, se midieron los niveles séricos de  $\alpha$ -enolasa y galectina 1 y 3. Encontraron que la elevación de galectina 1 y 3 se asoció con CCR con una sensibilidad del 47% y una especificidad del 98%<sup>79</sup>. Pese a la baja sensibilidad, la alta especificidad puede ofrecer aplicaciones clínicas. No obstante, estos resultados también están pendientes de validación externa.

**1.9.2.1.5. Biomarcadores compuestos.** Cuando existe dificultad para encontrar un marcador que por sí solo sea capaz de ofrecer mejora en el diagnóstico de un cáncer, en ocasiones se buscan grupos de marcadores que de forma asociada presenten una utilidad similar. En un estudio de 2013 de Su Kim et al. se ha evaluado la posibilidad de que la asociación de tres diferentes proteínas, nicotinamida N-metil transferasa (NNMT), plastina 2 y la proteína 1 de células no metastásicas (NM23A) pueda ofrecer resultados en cuanto al diagnóstico del CCR. Se incluyeron 102 pacientes sanos o con tumores benignos y 87 con CCR. El análisis presentó un ABC de 0.932 para este conjunto de biomarcadores, a la espera de validación externa<sup>80</sup>. No se ha publicado desde esa fecha ningún artículo relacionado con este panel de proteínas.

**1.9.2.1.6. Metaloproteasas.** Las metaloproteinasas 2 y 9 están ampliamente extendidas en otras neoplasias, y tienen un papel importante facilitando la expansión tumoral y el desarrollo de metástasis

## INTRODUCCIÓN

mediante la degradación de la membrana basal y la destrucción de las barreras de tejido conectivo. En CCR, las metaloproteasas 2 y 9 se encontraron sobreexpresadas en el 67-76% y 43% de los tumores respectivamente<sup>45</sup>. Están correguladas por la proteína del gen VHL (pVHL) y HIF.

BIOMARCADOR	MEDIO	CARACTERÍSTICAS
HIF 1- $\alpha$	Suero	Presente en el 75% de las muestras tumorales. Poco específico.
CAIX	Suero	PET-TAC con 123I-Geruntixumab contra CAIX: Sensibilidad y especificidad 86%. VPP 96%. VPN 69%.
miR-1233	Suero	Elevado en CCR con ABC 0.59
miR-378	Suero	Elevado en pacientes con CCR. ABC 0.71
miR-451	Suero	Descendido en CCR. ABC 0.77
miR-378 + miR-451	Suero	Marcador compuesto con ABC 0.86
ADN extracelular	Suero	Los niveles totales muestra una ABC de 0.75
Aminoácidos libres	Suero	Marcador compuesto de 8 aminoácidos, con ABC 0.81
Galectin 1 + Galectin 3	Suero	Elevados en pacientes con CCR, con ABC de 0.74 y 0.76
MMP-2 y MMP-9	Suero	Presente en 67-76% y 43% de los CCR

**Tabla 14.** Biomarcadores diagnósticos en CCR (adaptado de Nge y cols<sup>46</sup>)

**1.9.2.2. Biomarcadores pronósticos en CCR.** La evaluación pronóstica del CCR tiene una gran importancia, y los modelos utilizados en la clínica, como el índice de Karnofsky o las alteraciones analíticas en LDH, hemoglobina, calcio y recuento de plaquetas, han demostrado una gran fiabilidad. No obstante se buscan marcadores que, análogamente a otros tumores, sean capaces de predecir el riesgo tumoral.

**1.9.2.2.1. Vía de VHL.** Pese a que claramente esta vía, con sus componentes fundamentales: VHL, HIF1- $\alpha$  y VEGF, está asociada al CCR, su ruta está intensamente regulada y con muchas interacciones que la hacen difícilmente interpretable<sup>46</sup>. Además, los estudios en cuanto al valor pronóstico han mostrado resultados contrapuestos: algunos artículos han sugerido que la elevación de VHL o de HIF1- $\alpha$  se asocian con mal pronóstico y otros con buen pronóstico<sup>46</sup>. En un estudio con análisis multivariante de factores pronósticos se detectó que la mutación o hipermetilación de VHL se relacionaba con mejor supervivencia en estadios I-III de CCRcc. En otro estudio se demostró que la mutación que conlleva pérdida de función de VHL conlleva un peor pronóstico<sup>45</sup>.

Sí se ha demostrado en un estudio con 141 pacientes con CCRcc metastásico que niveles elevados de HIF1- $\alpha$  se asociaron a peor supervivencia (13,5 meses vs 24,4 meses), de forma análoga a la expresión de CAIX en este mismo estudio. No obstante, ya se ha comentado la divergencia de resultados en cuanto al valor pronóstico de HIF1- $\alpha$ , probablemente relacionado con que la expresión elevada en el medio

citoplasmático o en el medio nuclear no tienen el mismo significado biológico<sup>45</sup>, siendo verdaderamente negativa en cuanto al pronóstico del cáncer su presencia en medio nuclear.

Por el contrario, los niveles de VEGF en plasma sí que se han asociado reiteradamente con el tamaño tumoral, el grado nuclear, el estadio tumoral o la microinvasión vascular, aunque con una capacidad pronóstica inferior a los clásicos modelos clínicos, patológicos o analíticos.

**1.9.2.2.2. CAIX.** Su papel como marcador pronóstico está menos claro que el diagnóstico. Aunque ha sido asociada su sobreexpresión con una menor tasa de metástasis, no se relaciona con menor mortalidad<sup>46</sup> en la mayoría de los estudios, aunque también hay disparidad en este punto<sup>73</sup>.

**1.9.2.2.3. miRNA.** La publicación más relevante en este sentido es de 2012, cuando Wu et. al identificaron 4 miRNA (miR-10b, miR-135-5p, miR130b y miR-199b-5b), relacionados con metástasis con una sensibilidad del 76% y una especificidad del 100%<sup>81</sup>. Se trata de un estudio en que se incluyeron 28 pacientes con CCRcc, tanto metastásicos como localizados.

**1.9.2.2.4. Insuline-like growth factor II mRNA-binding protein (IMP3).** Propio de la embriogénesis, se encuentra elevado en muchos tumores sólidos, y suele asociarse a peor pronóstico; en condiciones normales debe estar ausente en un paciente sano. Se ha estudiado su asociación en CCR: en 2006, Jiang et.al. estudiaron 501 pacientes con CCR, tanto metastásicos como localizados; encontraron que IMP3 estaba presente en los pacientes metastásicos con mucha más frecuencia; pero además asociaron la presencia de IMP3 en pacientes con CCR localizado con el desarrollo de metástasis en el futuro: la tasa libre de metástasis a 5 años fue del 44% en pacientes con IMP3, frente a un 98% en los que no tenían presente esta proteína<sup>82</sup>. Este estudio ha sido validado posteriormente por Hoffmann et. al, que estudiaron 716 CCRcc consecutivos<sup>83</sup>, y comprobaron que la presencia de esta proteína se asociaba a un mayor grado tumoral, una diferenciación sarcomatoide y peor supervivencia cáncer específica; en total, un 30% de los especímenes estudiados tuvieron elevada la IMP3.

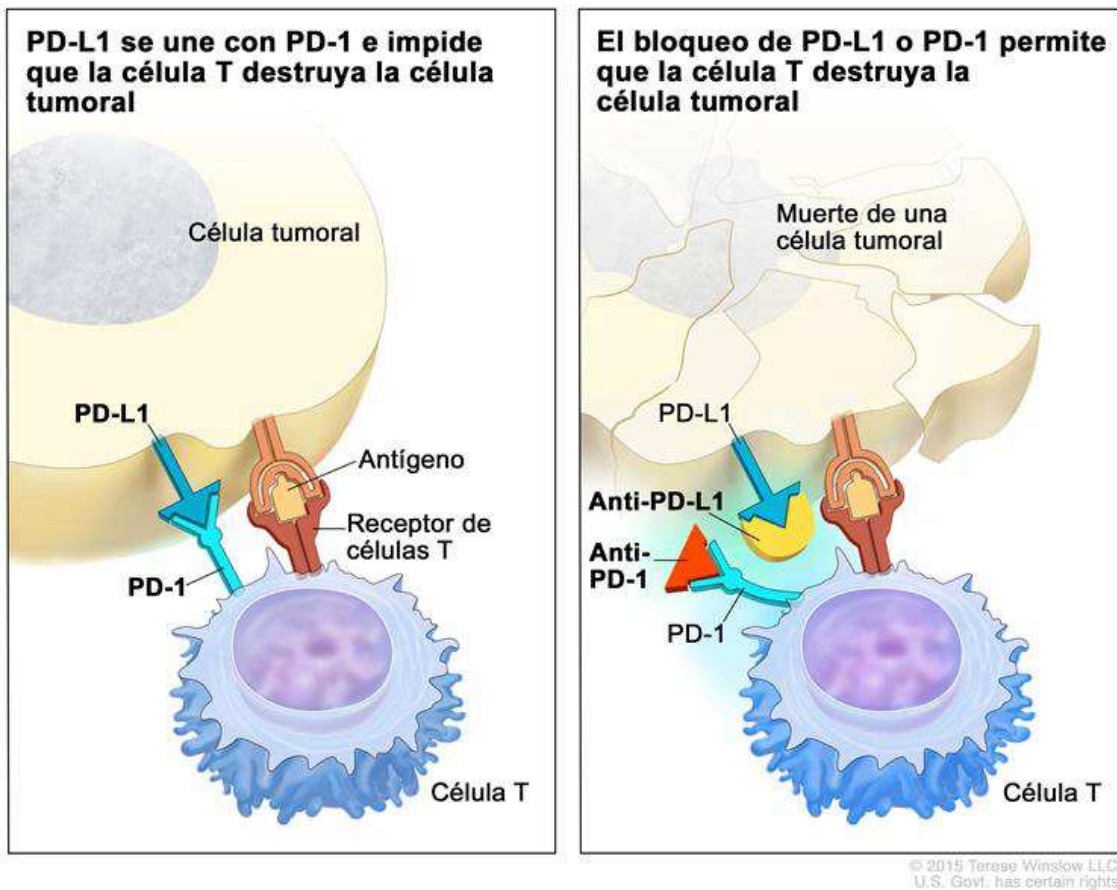
**1.9.2.2.5. Marcadores inflamatorios.** El papel de las rutas metabólicas de inflamación tiene una presencia significativa en la oncogénesis, aunque es difícilmente distinguible de otros procesos biológicos, y por tanto por inespecífica tiene un escaso papel diagnóstico. No obstante, sí que hay trabajos que asocian marcadores de inflamación con peor pronóstico:

- Proteína C reactiva (PCR): pese a ser inespecífica y estar normalmente elevada en muchos tumores independientemente de la localización, en el caso concreto del CCR se ha asociado con un aumento de mortalidad, independientemente del tamaño, estadio, grado nuclear o índice de comorbilidad de Charlson<sup>84</sup>.
- VSG (velocidad de sedimentación globular). También se ha asociado a un aumento de mortalidad la elevación del VSG en un estudio en que se incluyeron 167 pacientes con CCR. Se determinó de forma preoperatoria el nivel sérico de ESR. Se establecieron tres grupos en función de su concentración: bajo, medio y elevado riesgo. En el análisis de mortalidad, el HR para el grupo de alto riesgo fue de 18,5 (IC95%: 2,117–162,228), y de 4.5 para el intermedio (IC95%: 0.735–27.649)<sup>85</sup>.

**1.9.2.2.6. Marcadores de sistema inmune.** De forma similar a lo que sucede con los marcadores inflamatorios, la actividad del sistema inmune en el cáncer es compleja y por tanto pocas veces identificable como específica. En ocasiones es capaz de suprimir tumores de forma completa mediante la eliminación de células tumorales, pero en otras su actividad es capaz de seleccionar los fenotipos

tumorales más agresivos, aquellos capaces de sobrevivir a un ambiente inmunológico especialmente hostil<sup>46</sup>. Se han propuesto diferentes marcadores pronósticos en CCR en relación con el sistema inmunológico. El más conocido es el relacionado con la vía de las células T.

- Vía de las Células T.** Esta vía está regulada por PD-1, una de las proteínas que más desarrollo ha permitido en inmunoterapia, con anticuerpos dirigidos contra ella. En condiciones normales, PD-1 modula la respuesta inmune para limitar la destrucción del tejido sano activada por el sistema inmune como respuesta a una agresión. Las células tumorales parecen expresar PD-L1 como una respuesta adaptativa a la agresión<sup>46</sup>, simulando la respuesta de los tejidos sanos, tal y como se muestra en la figura 9. De esta forma, el anticuerpo antiPD-1L ofrece respuestas de hasta el 20-25% de los tumores sólidos. Una publicación reciente sugiere que el PD-L1 (o B7-H1), se relaciona con una peor SCE. Se incluyeron 306 pacientes con CCR tratados mediante nefrectomía, cuantificando la expresión de B7-H1 en las muestras tisulares de tumor. Asociaron su expresión con mayor tasa de metástasis en el seguimiento (RR 3,46) y de peor SCE (RR 4,13).



**Figura 9.** Actividad de la PD-1 en la célula tumoral, inhibiendo la destrucción de la misma por las células T activadas. Tomada del National Cancer Institute<sup>86</sup>

**1.9.2.2.7. Ki-67.** Se trata de un marcador de proliferación celular, asociado como factor pronóstico en varios tumores hasta la fecha. También se ha demostrado como un factor pronóstico en CCR, pero con menor utilidad que los nomogramas clínico-patológicos utilizados en la práctica clínica habitual<sup>45</sup>.

**1.9.2.3. Biomarcadores predictivos de respuesta a tratamiento en CCR.** El trabajo de esta tesis no se orienta en este sentido, pero es interesante conocer la existencia de marcadores que predicen la respuesta al tratamiento con las diferentes moléculas disponibles para CCR diseminado, y que permiten predecir por tanto qué molécula puede ser más adecuada en cada caso. Se resumen en la tabla 15.

FÁRMACO	BIOMARCADORES	SIGNIFICADO
Pazopanib	IL-8, osteopontina, HGF, TIMP-1	Peor supervivencia libre de progresión (SLP)
Sorafenib	Osteopontina y VEGF	Peor SLP
Sorafenib	Osteopontina, VEGF, sCA9, CollIV, sVEGFR-2, TRAIL	Predicen respuesta a tratamiento combinado con IFN $\alpha$
Sunitinib	IL-6, bFGF, HGF	Predicen SLP
Bevacizumab	Rs9582036 SNP, VEGFR-1	Peor respuesta
Temsirolimus	LDH	Mejor respuesta

**Tabla 15.** Marcadores moleculares predictivos de respuesta a tratamiento en CCR (adaptado de Ngo y cols.)<sup>46</sup>.

IL-8: interleukina 8; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; TIMP-1: inhibidor 1 de metalopeptidasa; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; sCA9: proteína 9 de la ataxia espinocerebelar; COL IV: colágeno IV; TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos.

## 1.10. INTRODUCCIÓN A LA PROTEÓMICA.

La proteómica se define como el estudio a gran escala de la estructura y función de las proteínas, y sus cambios bajo la influencia de perturbaciones biológicas, tales como la enfermedad o el tratamiento con fármacos. Una de las limitaciones que se ha asociado con la genómica es que el material genético presente en un ser vivo puede no estar expresándose en el individuo, de forma temporal o permanente, por lo que la presencia de una alteración genética no siempre tiene una traducción clínica o un impacto real.

Por otro lado, el ADN primero se transcribe en ARN y posteriormente éste se traduce en síntesis proteica. En estos procesos existen cambios biológicos que afectan al resultado final de la composición proteica. A estos cambios se les denomina postraduccionales. La genética no estudia el impacto de estos cambios en el ser vivo, que son fundamentales en las rutas metabólicas de algunos tumores.

La proteómica por tanto permite un estudio de la expresión genética real, teniendo en cuenta los cambios postraduccionales, permitiendo un estudio del proteoma del ser vivo, es decir, del conjunto de las proteínas expresadas de un genoma en un momento dado y bajo unas determinadas condiciones de tiempo, espacio y estímulo externo<sup>70</sup>. También permite el estudio del secretoma, es decir, del conjunto de proteínas presentes en fluidos orgánicos.

**1.10.1. Técnicas analíticas en proteómica.**

Dos de las técnicas más empleadas en el análisis proteico son la electroforesis y la espectrometría de masas. Se han desarrollado otras técnicas que también se describirán a continuación de forma muy superficial.

**1.10.1.1. Electroforesis en gel de 2 dimensiones (2-DE).** Descrita por O'Farrel en 1975, permite la separación de proteínas en función de su punto isoeléctrico y su peso molecular. No obstante, presenta inconvenientes a la hora de identificar proteínas de elevado peso molecular e hidrofobicidad extrema, que fueron resueltas posteriormente con el empleo de la cromatografía de líquidos.

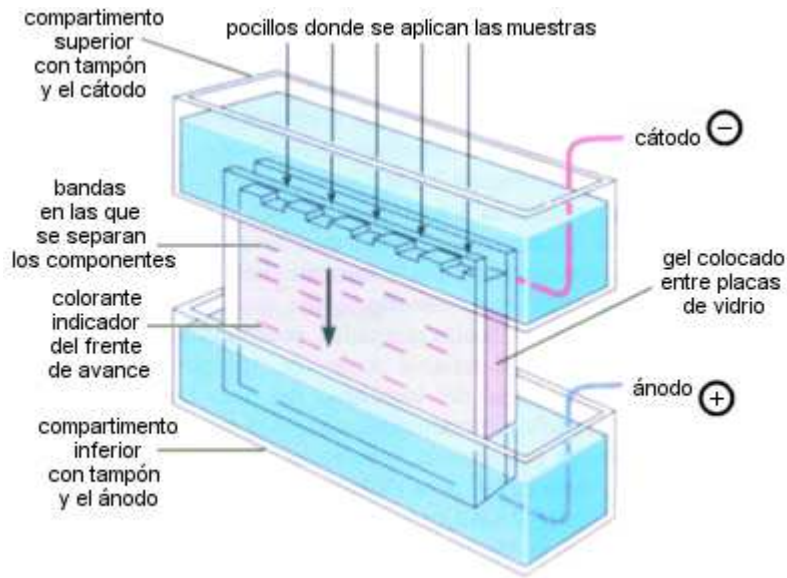


Figura 10. Esquema de electroforesis 2D<sup>87</sup>.

**1.10.1.2. Difference gel electrophoresis - DIGE.** Es una técnica similar a la previa, pero minimiza las variaciones técnicas haciendo correr las proteínas en el mismo gel.

**1.10.1.3. Cromatografía de líquidos (LC):** La cromatografía de líquidos es una técnica de separación de los componentes de una disolución: permite la separación de muestras complejas de proteínas con una alta resolución. Se ponen en contacto una fase móvil (la disolución o disoluciones) con una fase fija o estacionaria, habitualmente resinas de intercambio iónico. Los intercambiadores iónicos contienen grupos ionogénicos de carga positiva o negativa, de forma que los distintos componentes de la disolución se fijan por afinidad a estos puntos de forma diferenciada, y consecuentemente se separan unos de otros.



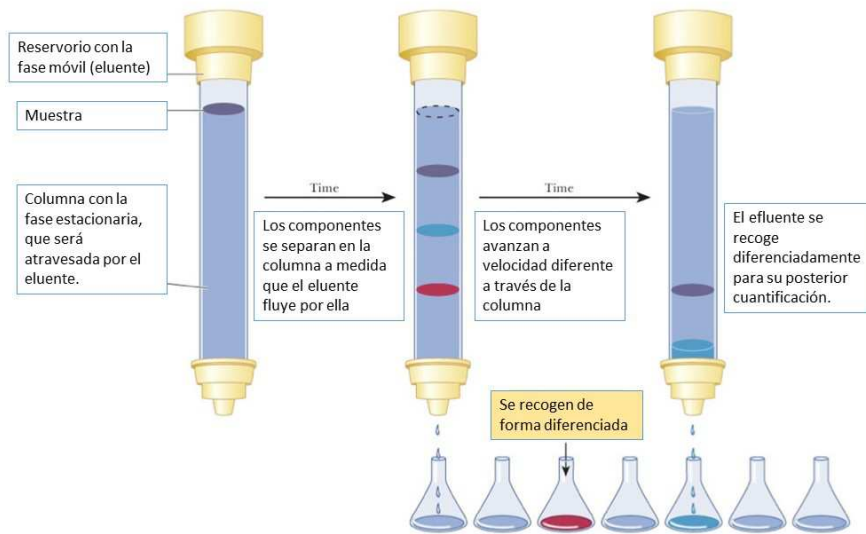


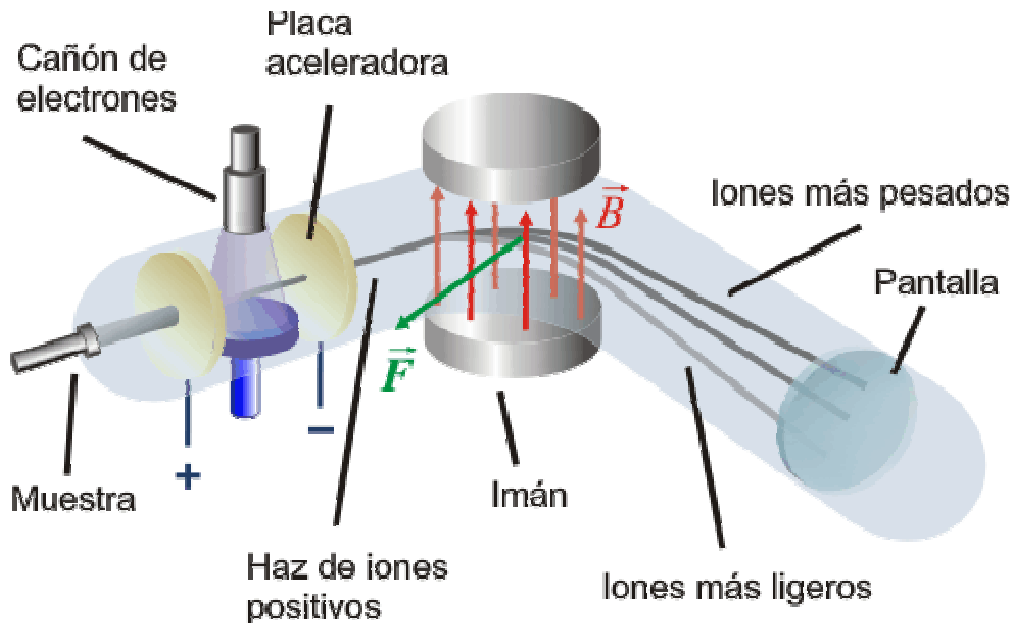
Figura 11. Cromatografía de líquidos.<sup>88</sup>

**1.10.1.4. Espectrometría de masas (EM).** Acoplada a la LC permite la identificación y cuantificación de las proteínas. Esta tecnología permite el cálculo del peso molecular de un ión con gran precisión, lo que supone que es necesaria la ionización de los analitos. Las proteínas se pueden detectar de forma intacta ("intact mass proteomics") o tras su digestión a péptidos con distintos tipos de enzimas ("shot gun-proteomics"). Esta última técnica es la empleada en este trabajo.

Los componentes de un analizador de EM son una FUENTE IONIZANTE que marque la proteína, un ANALIZADOR DE MASAS que permita el cálculo del ratio masa /carga, y por último un DETECTOR, que identifique el número de iones para cada valor de masa/carga, permitiendo la cuantificación de los péptidos.

- **Fuente ionizante.** Se utilizan habitualmente ESI (electrospray ionization) o MALDI/SELDI (matrix-assisted cad surface-enhanced laser desorption/ionization).
- **Analizador de masas.** Existen cuatro tipos de espectrómetros de masas utilizados en proteómica: trampa de iones, tiempo de vuelo o *time of flight* (TOF), cuadrupolo o *quadrupole* y el analizador de masas de transformada de Fourier.

Habitualmente se combinan MALDI con TOF y ESI con la trampa de iones.



**Figura 12.** Esquema de un espectrómetro de masas. La muestra se ioniza, y atraviesa un campo magnético que separa los componentes según su carga. El detector es capaz de identificar la cantidad y cualidad de los diferentes componentes<sup>89</sup>.

La aplicación de la proteómica en la investigación de enfermedades, sobre todo orientada al descubrimiento de biomarcadores (aunque también al estudio de la fisiopatología) está viviendo una época dorada en los últimos años, impulsada por las mejoras en las técnicas de separación de proteínas y péptidos, en la cada vez más fiel cuantificación e identificación de los mismos, y por último en el apoyo de herramientas bioinformáticas que han permitido el manejo y el análisis de ingentes cantidades de información, poco posible de forma manual<sup>90</sup>.

#### 1.10.2. Muestras biológicas analizadas.

Es importante destacar que los análisis en proteómica se hacen con respecto a un tejido control, que debe ser lo más fiable posible. La mayor parte de los trabajos en CCR han utilizado como muestra control el tejido sano peritumoral, teniendo como objetivo la identificación de marcadores moleculares de CCR.

Aún no se han publicado trabajos en CCR con fuente basada en líquido intersticial del tumor recogido in vitro de muestras frescas, es un elemento prometedor, donde las concentraciones se suponen altas y poco contaminadas por otros elementos<sup>90</sup>.

Sea cual sea la muestra utilizada en el estudio proteómico, la estandarización de la recogida y procesado, así como almacenamiento, son cruciales para poder reducir la variabilidad.

En cuanto a la tendencia de los artículos publicados, los estudios proteómicos habitualmente se basan en la comparación de dos tipos de muestras, de forma pareada: muestra de tejido sano y muestra tumoral. La definición de tejido sano es variable: muestras de controles sanos, o de tejido sano del mismo órgano, son la fuente más habitual. La heterogeneidad propia de los tejidos, sobre todo tumorales, puede complicar la interpretación de los resultados; esto es más marcado en tejidos de arquitectura fisiológica y molecular más compleja, como es el caso del riñón<sup>90</sup>. La mayor parte de los estudios se centran en muestras frescas congeladas, que permiten una mejor conservación de las proteínas de cara a su posterior análisis y cuantificación.



### 1.10.3. Metodologías del estudio proteómico.

Básicamente se pueden dividir entre las que se centran en aproximaciones "de arriba a abajo", en las que se analizan proteínas intactas, y las de "abajo a arriba", en las que son los péptidos de las proteínas previamente digeridas, habitualmente con tripsina, las que se analizan posteriormente. En los análisis de "abajo a arriba", la posibilidad de marcar con isótopos estables los péptidos ha permitido una mejora significativa en la posterior comparación de resultados. Están publicadas varias técnicas, de las que se van a destacar a continuación dos: SILAC y ITRAQ.

**1.10.3.1. SILAC (*stable isotope labelling by amino acids in cell culture*).** Permite la separación de péptidos "pesados" y "ligeros" en las dos muestras comparadas, que migran conjuntamente en las técnicas de separación cromatográficas, facilitando la posterior cuantificación e identificación.

**1.10.3.2. ITRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantification*).** La introducción del reactivo ITRAQ supuso un avance significativo en el campo de la proteómica cuantitativa. Ese reactivo introduce etiquetas isobáricas en los péptidos, y permite la cuantificación relativa y absoluta de proteínas en distintas muestras. Este método se basa en la unión covalente y diferencial de péptidos procedentes de digeridos proteolíticos con uno de los cuatro reactivos iTRAQ, dando lugar a la incorporación de un grupo 144.1. De esta forma, la cadena lateral de las lisinas y el extremo N-terminal de los péptidos quedan marcados. Los péptidos, una vez marcados, son indistinguibles por masa, pero pueden ser diferenciados mediante disociación inducida por colisión (*collision-induced dissociation*). Al fragmentar los péptidos, que se comportan igual desde un punto de vista cromatográfico, se desprende un ion "informante" (*ion reporter*), cada uno de los cuales con masa diferente (114.1, 115.1, 116.1, 117.1 dalton). El análisis permite por tanto identificar y cuantificar los péptidos (y por extensión de las proteínas) de cuatro muestras diferentes de forma simultánea. Esto reduce significativamente la variabilidad del análisis, pero mantiene la capacidad de análisis diferenciado tras su cuantificación e identificación<sup>91</sup>.

Por otro lado, la aproximación del trabajo puede ser de dos tipos, en función de los objetivos buscados en el estudio: proteómica de descubrimiento y proteómica dirigida.

**1.10.3.3. Proteómica de descubrimiento:** centrada en la identificación masiva de proteínas, en campos en los que el estudio es aún incipiente. Aporta una información amplia sobre el proteoma estudiado y la concentración diferencial de algunas proteínas, de forma que posteriormente se seleccionen las que se intentará validar en un posterior análisis.

**1.10.3.4. Proteómica dirigida:** orientada a la validación de proteínas en concreto, ya identificadas en otros estudios, sobre las que se centra el análisis de forma focalizada.

El análisis más habitual en los estudios de proteómica se basa en la identificación de péptidos o proteínas mediante EM.

## 1.11. ANÁLISIS PROTEÓMICO EN TEJIDOS DE CCR.

Tal y como se ha reseñado previamente, el análisis proteómico puede utilizar muestras de tejido, de plasma o de fluidos orgánicos, pero dentro de estas tres opciones, el análisis del tejido tumoral tiene una concentración proteica elevada en comparación con las otras muestras. Las principales limitaciones del análisis proteómico de tejidos con CCR son<sup>92</sup>:

- Baja reproducibilidad de resultados basados en MS.
- Variabilidad del 10-30% que se acepta como válida en estos estudios.
- Se aceptan proteínas con una tasa de falsa detección (FDR, *false discovery rate*) de menos del 1%.

La baja reproducibilidad, sumada a la heterogeneidad de las muestras tumorales, puede explicar los dispares resultados en cuanto a proteínas sobre o infraexpresadas en CCR a lo largo de los múltiples trabajos realizados en este ámbito<sup>92</sup>.

No obstante, la proteómica ha aportado al estudio del CCR un amplio conocimiento del ambiente molecular del CCR, así como de la localización espacial de cambios moleculares<sup>92</sup>.

La mayor parte de los estudios han comparado tejido sano (considerando tejido sano diferentes opciones, según las publicaciones) con tejido tumoral. No obstante, también se han utilizado muestras de líneas celulares in-vitro. Los estudios suelen incluir un número limitado de pacientes o de muestras, algo habitual en los análisis proteómicos iniciales<sup>90 93</sup>. Las muestras se han seleccionado habitualmente de forma directa, aunque algunos estudios han introducido la microdissección como técnica de recogida para mejorar la precisión de la muestra utilizada, ya que, según estos autores, permite garantizar que la muestra tiene tejido tumoral y minimiza la presencia de necrosis en el tejido analizado.

A continuación, se detallan los trabajos más importantes en este campo.

- a. **Grupo de Seliger<sup>94</sup>**. Utilizando 2DE/MALDI-TOF, estos autores hacen una primera descripción del proteoma del CCR.
- b. **Sun et.al<sup>95</sup>**. Mediante la misma técnica 2DE/MALDI-TOF, identifica una disminución evidente en las proteínas de metabolismo y señalización, con un aumento del HIF1 $\alpha$  y de las proteínas de detoxificación de productos oxigenados.
- c. **Gribaldi et.al<sup>96</sup>**. Utilizando una técnica basada en gel, y comparando con tejido sano, identifica los siguientes cambios:
  - Aumento de proteínas del metabolismo de glucosa.
  - Aumento de proteínas transportadoras.
  - Aumento claro de la Reticulocalbin 1 (*calcium binding protein reticulocalbin 1*).
  - Disminución del metabolismo de señalización, transducción y estrés proteico.
  - Disminución de proteínas plegadoras de iones.
- d. **Poznanovic et.al<sup>93</sup>**. Mediante microdissección con láser de pequeñas muestras de tejido tumoral y normal del mismo riñón, posteriormente marcadas de forma isotópica, se identificaron 29 proteínas diferencialmente expresadas. De entre ellas, CAI (anhidrasa carbónica I), anexina A4 (metabolismo lipídico), triosa-fosfato isomerasa I (vía de la glicólisis) y fosfoglicerato kinasa (vía de la glicólisis) coinciden con otras publicaciones. Muestra además cómo es posible un análisis potente con mínimas cantidades de tejido.
- e. **Unwin et.al<sup>97</sup>**. Focalizado en los cambios metabólicos más que en la expresión diferenciada, muestra una actividad elevada de las enzimas glicolíticas con descenso de las enzimas relacionadas con la gluconeogénesis.

- f. **Castronovo et.al**<sup>98</sup>. En este estudio se perfundieron riñones con tumor una vez extirpados con una solución específica. Se identificaron 637 proteínas en 3 muestras diferentes. De ellas, 184 estaban presentes exclusivamente en tejido tumoral. Consiguieron confirmar la elevación de CAIX, MG50 (que participa en el metabolismo peroxidativo), periostina (participa en la migración y adhesión de células epiteliales), y 3 proteínas de la familia de la lectina, asociadas al metabolismo y función del colágeno: agrecano, versican y fibromodulina.
- g. **Zhang et.al**<sup>99</sup>. En este estudio se analizaron proteínas séricas de CCR T1a mediante la técnica ITRAQ, efectuada en 29 pacientes con CCRcc, 24 con lesiones benignas, 28 con otros tipos de tumores urológicos y 18 sujetos sanos. Se detectaron 263 proteínas en el análisis. Encontraron 27 proteínas diferencialmente expresadas, de las que 11 fueron posteriormente validadas: C1QC, C1QB, S100A8, S100A9 (las cuatro relacionadas con la respuesta inmune), ceruloplasmina (proteína transportadora de cobre) y lumican (proteína que participa en la formación de la matriz de colágeno extracelular).

VÍA METABÓLICA	PROTEÍNAS IMPLICADAS
<b>Metabolismo oxidativo</b>	HIF1 $\alpha$ , CAIX, CAI, MG50
<b>Metabolismo de la glucosa y mitocondrial</b> ( $\uparrow$ glicólisis, $\downarrow$ gluconeogénesis)	Anexina A4, Triosefosfato isomerasa, fosfoglicerato kinasa, Enolasa 2
<b>Matriz extracelular. Colágeno</b>	Periostina, agrecano, versican, fibromodulina, lumican
<b>Respuesta inmune</b>	C1QC, C1QB, S100A8, S100A9

**Tabla 16.** Vías metabólicas implicadas en el CCR y proteínas de estas vías identificadas.

HIF1 $\alpha$  : factor inducible de hipoxia  $\alpha$ . CAIX: anhidrasa carbónica IV. CAI: anhidrasa carbónica I. MG50: peroxidasa homóloga. C1QC: subunidad del complemento C1qC. C1QB: subunidad del complemento C1qB. S100A8: proteína S100A8. S100A9: proteína S100A9.



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## 2. HIPÓTESIS.

El carcinoma de células renales (CCR) conlleva una modificación en el proteoma del tejido renal enfermo, pero los estudios realizados hasta la fecha no han sido completos, y el tejido habitualmente utilizado como referencia, tejido sano del órgano con tumor ("NT"), no ha sido validado como tejido completamente normal.

Para validar el tejido "NT" como tejido de referencia se puede comparar mediante técnicas de proteómica cuantitativa con un tejido que pueda ser considerado sano, o que provenga de un riñón sin CCR.

No se ha conseguido validar ningún marcador o panel de biomarcadores para el CCR hasta la fecha, pese al gran número de trabajos publicados al respecto. No se ha comprobado eficacia clínica de ninguno de ellos, ni como marcador diagnóstico, ni como marcador diferencial entre subtipos de CCR, ni como marcador pronóstico, ni como marcador de respuesta a tratamientos.

Las técnicas de proteómica cuantitativa permiten conocer de forma generalizada la expresión proteica de un tejido enfermo, y permiten compararlo con muestras de tejido sano o de otros tejidos enfermos. La expresión diferenciada de proteínas, y de las rutas metabólicas en las que participan, puede ayudar a establecer diferencias entre estas muestras, y conocer más profundamente por tanto su comportamiento biológico.

Una vez conocidas las diferencias, puede ayudar a seleccionar proteínas que sirvan como posibles biomarcadores diagnósticos de CCR. También, al establecer diferencias entre tipos de CCR puede ayudar al diagnóstico diferencial entre ellos. Estas proteínas candidatas deberán ser validadas en sucesivos estudios.





### 3. OBJETIVOS.

#### 3.1. Objetivos primarios.

3.1.1. Describir el proteoma de los tejidos seleccionados como referencia: “NT” y “Control”, y analizar sus diferencias metabólicas y proteicas.

3.1.2. Describir el proteoma del CCRcc, y analizar sus diferencias metabólicas y proteicas con respecto a los tejidos de referencia.

#### 3.2. Objetivos secundarios.

3.2.1. Describir el proteoma de CCRcr, y analizar sus diferencias metabólicas y proteicas con respecto a CCRcc.

3.2.2. Proponer una firma de proteínas como biomarcadores de diagnóstico y/o pronóstico en CCR.



# **MATERIALES Y** **MÉTODOS**



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1. DISEÑO GENERAL DEL ESTUDIO.

Se llevó a cabo un estudio cuasiexperimental con una estrategia de comparación y obtención de datos transversal. Este tipo de estudios se caracterizan por la ausencia de aleatorización. La perspectiva transversal permite el registro de la variable en un punto de corte en el tiempo, realizando una comparación entre los sujetos del estudio. En este caso, los grupos control no serán equivalentes.

La asignación al correspondiente grupo, que determina la construcción de los mismos, se basa en una variable conocida, que en este caso se trata de la existencia de un carcinoma de células renales (CCR) en el grupo índice.

Los estudios cuasiexperimentales con frecuencia preceden a los experimentales en la implantación de una intervención.

Se trata de un estudio transversal de pacientes con CCR, con inclusión de muestras de tejido sano. Se diseñó de modo que la selección de la muestra se hizo de forma consecutiva en pacientes tratados mediante nefrectomía radical o parcial de un carcinoma de células renales en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid (HURyC) en un periodo concreto de tiempo, desde Junio de 2011 a Febrero de 2012.

El análisis de los tejidos se realizó mediante técnicas de proteómica cuantitativa. Se trata por tanto de un estudio de proteómica de descubrimiento, basando el análisis en la técnica iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantification*), que permite, tal y como se ha comentado en la introducción, la comparación de 4 grupos de tejidos de forma simultánea en la misma cuantificación. Se escogieron como sujeto de análisis muestras de dos tipos de carcinoma de células renales diferentes, y dos muestras de tejido sano diferentes, tal y como se expondrá más adelante.

El análisis de la expresión diferencial de proteínas en el contexto de estudios de descubrimiento suele desarrollarse en el ámbito de estudios con una n reducida, y con muestras de tejido enfermo y tejido sano. Se realiza un análisis de cada uno de los tejidos incluidos, para luego comparar con técnicas de cuantificación la expresión diferencial de las proteínas. El papel biológico y las rutas metabólicas en las que se integran estas proteínas se determinan mediante la utilización de herramientas de bioinformática y software específicos.

### 4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.

La población estudiada está constituida por hombres y mujeres mayores de 18 años de edad que fueron remitidos a las Consultas de Área u Hospitalarias de la Especialidad de Urología del HURyC.

La Ley 6/2009 de 16 de noviembre (Boletín oficial de la Comunidad de Madrid (BOCM) número 274 de 18 de noviembre) de Libertad de Elección en la Sanidad de Madrid que modifica la Ley 12/2001 de 21 de diciembre, organiza el territorio de la Comunidad de Madrid en un Área Sanitaria única. El Decreto

52/2010, de 29 de julio (BOCM número 189 de 9 de agosto) establece en el área única de salud como estructura básica, la zona básica de salud.

El HURyC atiende, desde la puesta en vigor en la Comunidad de Madrid del Área Única de Salud, las zonas básicas de salud asignadas en su contrato de gestión y a todas aquellas personas que ejerzan su opción de libre elección sobre alguno o todos sus servicios.

Por lo tanto, al HURyC le correspondería la atención especializada del Área Noreste (antigua área 4). Constituida por los distritos de San Blas, Hortaleza y Ciudad Lineal.



**Figura 13:** Zonificación previa a la implementación del Área Sanitaria única.

La población asignada con fecha 31/12/2012 fue de 555.655 personas.

NOMBRE DE CENTRO	LOCALIDAD	POBLACIÓN (31/12/2012)			
		<14a	14-64a	>=65a	TOTAL
C.S. Alameda de Osuna	Madrid	5001	19388	4498	28887
C.S. Alpes	Madrid	7026	25159	4855	37040
C.S. Aquitania	Madrid	3504	14775	3827	22106
C.S. Avda. Aragón	Madrid	2329	13633	3262	19224
C.S. Barajas	Madrid	2714	13497	2437	18648
C.S. Benita de Ávila	Madrid	2497	12948	5257	20684
C.S. Canal de Panamá	Madrid	3273	20516	7043	30832
C.S. Canillejas	Madrid	5033	25801	6977	37811
C.S. Doctor Cirajas	Madrid	4318	24512	7640	36470
C.S. Estrecho de Corea	Madrid	3398	19588	6171	29157
C.S. Gandhi	Madrid	4189	22728	7504	34421
C.S. García Noblejas	Madrid	2845	14930	5323	23098
C.S. Jazmín	Madrid	4365	17321	4263	25949
C.S. Mar Báltico	Madrid	5984	36093	12597	54674
C.S. Monovar	Madrid	2550	11764	3230	17544
C.S. Rejas	Madrid	2686	8944	1602	13232
C.S. Sanchinarro	Madrid	12217	24806	1265	38288
C.S. Silvano	Madrid	4910	24760	5395	35065
C.S. Vicente Muzas	Madrid	2838	13758	4062	20658
C.S. Virgen del Cortijo	Madrid	2426	8259	1182	11867
<b>TOTAL</b>		<b>84085</b>	<b>373180</b>	<b>98390</b>	<b>555655</b>

**Tabla 17.** Población asignada HURyC (fuente: memoria 2013 HURyC).

La figura 14 muestra la pirámide de población (fuente: Informe del Estado de Salud de la Población de la Comunidad de Madrid 2012. Madrid: Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid; 2012).

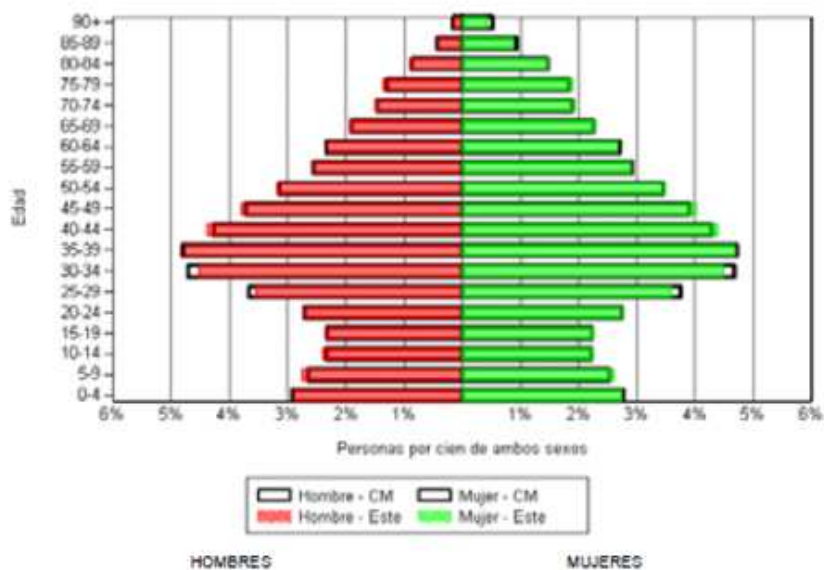


Figura 14. Pirámide de población asignada al HURyC.

#### 4.2.1. Selección de pacientes y muestras.

Durante el periodo comprendido entre Junio de 2011 y Febrero de 2012, se seleccionaron en el Servicio de Urología del HURyC aquellos pacientes con un diagnóstico de masa renal a los que se intervino de forma programada mediante nefrectomía radical o parcial.

En el año 2011, en el Servicio de Urología del HURyC, bajo el GDR 303 (procedimientos sobre riñón y uréter por neoplasia) se clasificaron 69 altas, que ascendieron a 81 altas en el año 2012. Este fue el grupo de pacientes del que se obtuvieron las muestras del grupo índice: pacientes con CCRcc y CCRcr., así como el grupo de muestras de referencia "NT".

Por otro lado, durante los años 2011 y 2012 se llevaron a cabo 63 y 67 trasplantes renales respectivamente. De ellos, fueron a partir de donantes expandidos, con necesidad de biopsia previa al trasplante, 34 y 51 respectivamente. Estos fueron fuente de las muestras del grupo "Control".

Se optó por un análisis de descubrimiento por la ausencia de marcadores para CCR en el momento actual. En la fase de descubrimiento, se podrían haber utilizado muestras plasmáticas o séricas, pero se prefirieron utilizar muestras de tejido. En relación a la metodología elegida, sería necesario hacer unas consideraciones previas:

La identificación de potenciales biomarcadores en plasma o suero es irremediamente el objetivo último de las investigaciones en este campo<sup>100</sup>. Además, el proteoma del plasma es una representación circulante de todos los tejidos del cuerpo, y por tanto de todos los procesos fisiológicos y patológicos. Pero el análisis proteómico de muestras séricas y plasmáticas presenta inconvenientes importantes:

1. El rango dinámico de las muestras plasmáticas y séricas es de hasta 10 órdenes de magnitud. Es decir, los niveles de concentración de las distintas proteínas en plasma es enormemente dispar: desde la albúmina (en rango de mg/ml) a las interleukinas (en rango de pg/ml). La figura 15 muestra el rango dinámico del plasma, con la variabilidad de concentraciones, según la presentación de L. Anderson<sup>101</sup>.



2. Hay innumerables procesos postraduccionales que pueden haberlas modificado.
3. Es necesaria una depleción de las proteínas mayoritarias para mejorar la sensibilidad en la identificación de las proteínas que realmente interesan, habitualmente minoritarias, ya que la capacidad de carga de los métodos analíticos es limitada. Sólo la **albúmina** y la **inmunoglobulina G** representan entre el 60 y el 80% del contenido proteico de estas muestras.
4. En la depleción se utilizan columnas cromatográficas, pero al eliminar estas proteínas mayoritarias también se pierden proteínas potencialmente interesantes que se encuentran ligadas a ellas.

Por este motivo se optó por realizar un análisis proteómico de tejidos frescos congelados.

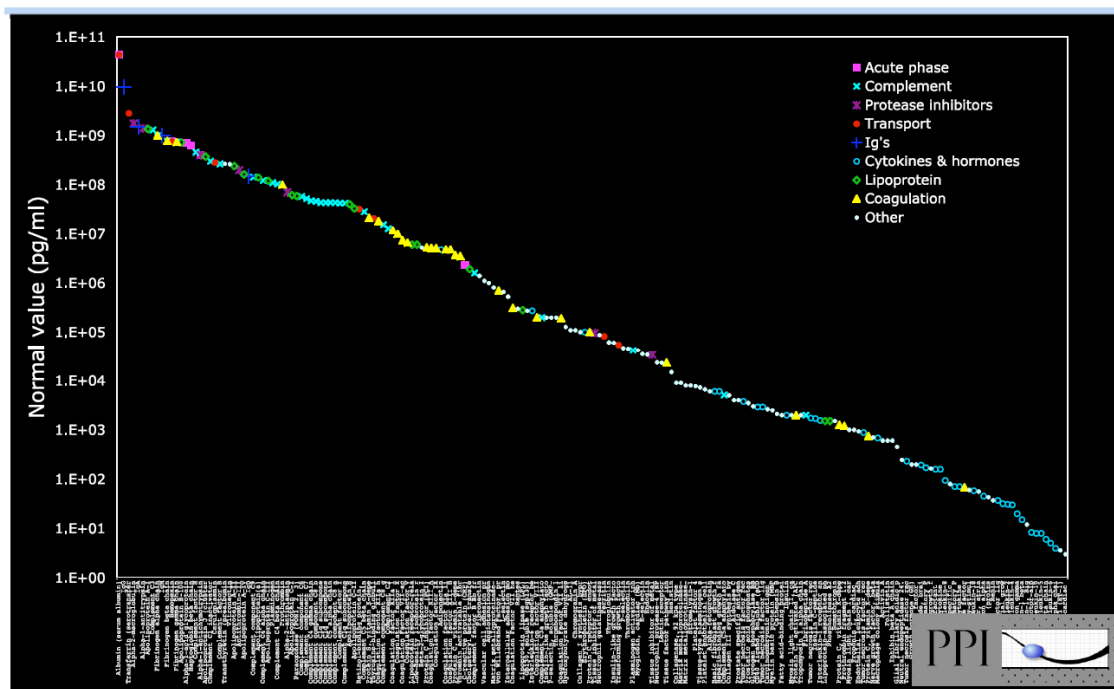


Figura 15. Rango dinámico de 199 proteínas plasmáticas (de L. Anderson)<sup>71</sup>.

#### 4.2.2. Tamaño de la muestra.

El diseño general del estudio, en forma de un estudio cuasiexperimental, permitió no realizar un cálculo formal del tamaño muestral, dada la ausencia de datos en la literatura.

Este tipo de diseño resulta adecuado en el contexto de la proteómica de descubrimiento, centrada en la identificación masiva de proteínas en campos como el presente, en los que el estudio es aún incipiente.

##### 4.2.2.1. Criterios de Inclusión:

1. Pacientes mayores de 18 años, con diagnóstico de masa renal, sometidos a nefrectomía radical o parcial, cuyo diagnóstico anatomopatológico ulterior confirme la existencia de CCRcc o CCRcr.
2. Aceptación y firma del consentimiento informado (anexo 1).

Para la obtención de las muestras correspondientes a los tejidos sanos del grupo “Control”, el Comité de Ética del HURyC proporcionó la adecuada aprobación (anexo 2).

#### 4.2.2.2. Criterios de exclusión:

1. Histopatología diferente a CCRcc o CCRcr.
2. No firma del consentimiento informado por parte del paciente.

### 4.3. PROTOCOLO DE TRABAJO.

#### 4.3.1. Selección de muestras y definición de los grupos del estudio.

Se definieron cuatro grupos de estudio:

- Tejido de CCRcc.
- Tejido de CCRcr.
- Tejido sano procedente de riñón portador de CCRcc: “NT”.
- Tejido sano de donante renal para trasplante: “Control”.



Figura 16. Muestras incluidas en el estudio.

#### 4.3.2. Técnica de obtención de muestras de tejido.

La obtención de muestras fue llevada a cabo por el cirujano responsable del procedimiento.

##### 4.3.2.1. Tejido de CCRcc y CCRcr.

La obtención de muestras de tejido tumoral se realizó a partir de piezas de nefrectomía radical o parcial. En cualquiera de ambas situaciones se procedió de la misma manera: en el quirófano de Urología del HURyC se realizó la cirugía mediante la técnica convencional. Una vez extirpado el órgano o el tumor, se se obtuvo una muestra del mismo mediante hoja de bisturí (evitando su zona central, donde existe más necrosis) de aproximadamente 0.5cc, mediante disección fría.

#### 4.3.2.2. Tejido sano de riñón con CCRcc y CCRcr.

La obtención de muestras de tejido sano a partir de piezas de nefrectomía radical o parcial se realizó de manera análoga a la del tejido tumoral: una vez extirpada la lesión o el órgano, se tomó mediante disección fría y con bisturí, una cuña lo más alejada posible del tumor de aproximadamente 0.5cc.

#### 4.3.2.3. Tejido sano de donante renal para trasplante.

Según el protocolo de trasplante renal del HURyC, todos los órganos procedentes de donantes con criterio expandido son sometidos a biopsia, con el objetivo de evaluarlos de forma previa. La biopsia fue sistemáticamente obtenida tras la perfusión del órgano con solución de preservación a 4°C. Durante la cirugía de banco, y del mismo sitio en que se realizó la biopsia del injerto renal para su evaluación histológica pretrasplante, se tomó una muestra similar para su inclusión en este estudio, de aproximadamente 0.5cc y mediante disección fría.

#### 4.3.3. Procesamiento de las muestras. Congelación.

Las muestras de tejido correspondientes a los diferentes grupos de investigación fueron remitidas en fresco, embebidas en suero salino, mediante tubo de vacío, para su criopreservación inmediata en un tiempo máximo de 10 minutos. Las muestras se congelaron en criotubos de 1.8ml de plástico (NuncCat nº 375418, Nunc Roskilde, Dinamarca; Figura 17), mediante inmersión en isopentano frío. Fueron trasladadas en ese recipiente al criopreservador Bright Clinic Rapid Freezer (figura 18), para conseguir una temperatura de -80°C. Una vez que el isopentano adquiere el aspecto opaco correspondiente a la consecución de la temperatura adecuada, las muestras se conservaron en sus respectivos criotubos en arcón congelador Forma Scientific Modelo 926 (figura 19) a -80°C.



Figura 17. Criotubo Nunc Roskilde 1.8ml



Figura 18. Criopreservador Bright Clinic Rapid Freezer



Figura 19. Arcón congelador Forma Scientific Modelo 926

#### 4.3.4. Conservación. Trazabilidad.

Las muestras se conservaron en este mismo arcón congelador hasta completar el periodo de inclusión de muestras.

En ese momento, se trasladaron a la Unidad de Proteómica del CNIO, en sus correspondientes criotubos y con el adecuado etiquetado, en un arcón de hielo seco (CO<sub>2</sub> sólido a -78°C), donde se conservaron de nuevo a -80°C en arcón congelador hasta su análisis posterior.

#### 4.3.5. Análisis histopatológico.

Las piezas extirpadas tras cirugía radical o parcial de masas renales fueron procesadas de acuerdo al protocolo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal.

**4.3.5.1. Procesamiento de muestras.** El procedimiento difiere inicialmente entre las piezas de nefrectomía parcial y de nefrectomía radical: en los casos de nefrectomía parcial, se tiñe la superficie de la muestra con tinta china para identificar posteriormente afectación tumoral del margen quirúrgico. El resto de los posteriores pasos es el mismo independientemente del tipo de nefrectomía.

Se disecciona la pieza, con corte sagital de la misma. Se toman fotografías de cada sección. Se corta la pieza en láminas finas buscando lesiones corticales o medulares adicionales.

**4.3.5.2. Descripción de la pieza.** Se pesa y mide la muestra, y se describen las características del tumor: tamaño, forma, ubicación, extensión, homogeneidad, necrosis y datos de hemorragia. Se debe estudiar la posible presencia de invasión de cápsula, tejidos perirrenales, cálices, pelvis y vena renal.

**4.3.5.3. Secciones para histología.** Mínimo tres secciones del tumor, incluidos cortes con tejido adyacente. Mínimo dos secciones de riñón sin tumor. Inclusión de arteria y vena renales, así como de nódulos linfáticos, si estuvieran presentes.

**4.3.5.4. Información diagnóstica.** Se debe informar del tipo histológico, del grado histológico (Führman), de la presencia de desdiferenciación sarcomatoide (si la hubiera), de signos de necrosis y de la diseminación local del tumor, según la clasificación TNM. Así mismo, se describen los márgenes tumorales y se informa, si la hubiera, de invasión angiolinfática.

#### 4.3.6. Recogida de datos.

La recogida de datos se realizó en base a un protocolo estructurado de la forma siguiente:

##### 4.3.6.1. Datos identificativos.

- Número de identificación.
- Número de HC.
- Sexo.
- Edad expresada en años cumplidos.

##### 4.3.6.2. Datos antropométricos:

- Talla, peso e índice de masa corporal.

##### 4.3.6.3. Datos de tratamiento y seguimiento:

- Tipo de cirugía.
- Diagnóstico anatomopatológico.
  - o Tipo de tumor.
  - o Estadio TNM.
  - o Clasificación nuclear de Führman (en los casos que estuviera indicada).

Los datos recogidos en el protocolo previamente descrito permitieron la realización de una tabla de datos combinada en Excel para su posterior análisis mediante el paquete estadístico SPSS 15.0.

#### 4.3.7. Análisis proteómico de las muestras.

El análisis proteómico de las muestras de tejido se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del CNIO, de acuerdo con el esquema resumen de metodología de la figura 20.

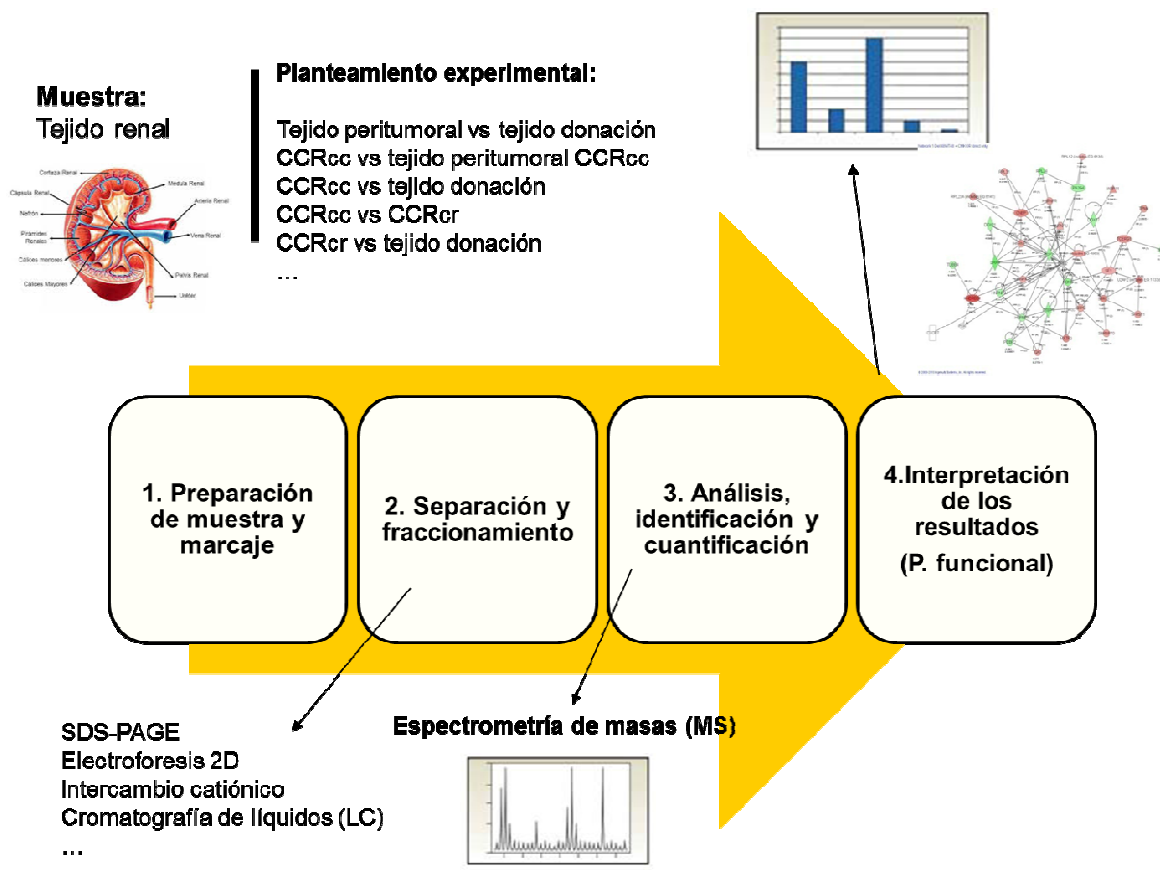


Figura 20. Esquema resumen de la metodología de trabajo.

#### 4.3.7.1. Recursos Humanos del CNIO.

Isabel Ruppen, Dra. Química Analítica con más de diez años de experiencia en espectrometría de masas, investigación oncológica traslacional y descubrimiento de biomarcadores. La Dra. Ruppen dejó de trabajar para el CNIO con posterioridad al desarrollo del análisis de estos tejidos, del que fue la máxima responsable.

La Unidad está actualmente compuesta por cuatro personas: el jefe de Unidad (Dr. Javier Muñoz), dos técnicos titulados superiores (Dres. Pilar Ximenez de Embún y Fernando García) y una investigadora predoctoral (Ana Martínez).

#### 4.3.7.2. Unidad de Proteómica del CNIO. Medios materiales.

- Homogenizador de muestras Precellys.
- Fraccionador 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies).
- Eksigent nano LC system Ultra (Eksigent)
- Espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher)



Figura 21. Precellys 24 Homogenizer (Bertin Instruments).



Figura 22. 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies).



Figura 23. Eksigent nano LC system Ultra (Eksigent).



Figura 24. LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher).

#### 4.3.7.3. Elección de técnica de análisis proteómico.

Se optó por la utilización de la técnica iTRAQ, que permite un análisis múltiple de cuatro tipos de tejidos diferentes. La identificación y cuantificación de proteínas se realizó mediante el análisis de las muestras por LC y EM en un equipo ESI LTQ Orbitrap Velos (que combina trampa iónica con transformada de Fourier). Esta técnica requieren una pequeña cantidad de muestra ( $\mu\text{g}$  de proteína total) y presentan una elevada selectividad en la separación de la misma. Posteriormente, la identificación, cuantificación y posterior análisis funcional de las proteínas se realizó mediante motores de búsquedas y herramientas bioinformáticas.

Se incluyeron en el estudio cuatro grupos de tejidos, que es el número de reactivos iTRAQ. Estos grupos fueron:

- Muestras de CCR tipo células claras. 12 muestras de 12 pacientes.
- Muestras de CCR tipo cromóforo. 4 muestras de 4 pacientes.



- Muestras de tejido sano de riñón con CCR tipo células claras (“NT”). 12 muestras de los mismos 12 pacientes con CCRcc.
- Muestras de tejido renal sano de órgano de donante en muerte encefálica para trasplante renal (“Control”). 17 muestras de 17 donantes.



Figura 25. Muestras incluidas en el estudio.

El proceso de análisis proteómico sigue el siguiente esquema, que posteriormente será desarrollado:

- A. Extracción proteica y marcado iTRAQ.
  - Extracción proteica:
    - Preparación y lavado de las muestras.
    - Homogeneización y extracción proteica
  - Cuantificación proteica.
  - Digestión enzimática de las proteínas (en péptidos).
  - Marcado de péptidos.
  - Separación por punto isoelectrico.
- B. Separación por cromatografía de fase reversa (RP LC) y análisis de los péptidos mediante espectrometría de masas (ESI LTQ Orbitrap Velos).
- C. Análisis funcional de los datos.

#### 4.3.7.4. Extracción proteica y marcado iTRAQ.

**A. Preparación y lavado de muestras.** De cada una de las muestras se obtuvo un fragmento significativo de alrededor de 50 mg. Lavado de las muestras con inhibidor de proteasas (Mini Complet, Roche) disuelto en PBS (phosphate buffer saline) para impedir la degradación proteica al descongelar la muestra.

**B. Extracción proteica.** Cada una de las muestras fue sometida a una técnica de extracción proteica mediante un tampón (*buffer*) de extracción. En este caso se utilizó un método mixto físico y químico mediante el homogeneizador de muestras Precellys: la muestra se introdujo junto con 4 piezas de cerámica y un tampón químico en el dispositivo. La composición del buffer de extracción es la siguiente:

- 7M de urea: es un agente caotrópico, lo que significa que lisa las células al romper las membranas celulares.
- 2M de thiurea: que aumenta la solubilidad de las proteínas.
- 100 mM de HEPES: tampón que mantiene el pH de la disolución en 7,3.
- Inhibidor de las proteasas (1:100; 1 tableta por 7ml) (Mini Complete, Roche)
- Benzonasa (1:1000): destrucción de ADN y ARN.
- DTT para la destrucción de puentes disulfuro.
- Detergente, para mejorar la lisis celular.

Cada muestra, tras el proceso de extracción proteica, fue centrifugada a 4°C durante 15 minutos a 16.000rpm. De ese centrifugado se seleccionó el suero sobrenadante, donde están contenidas las proteínas.

**C. Cuantificación proteica.** La técnica iTRAQ se basa en el análisis conjunto de todas las muestras incluidas en cada uno de los 4 grupos de estudio, de forma simultánea. Esto exige que en la muestra final a analizar tienen que estar representadas cada una de las muestras con la misma cantidad de proteína. En este punto se unificarán las muestras de cada grupo de análisis, reduciendo los elementos a procesar sólo a 4.

Para ello debe cuantificarse la cantidad de proteínas de cada muestra, y seleccionar 100 µg de cada una de ellas. La cuantificación se realizó mediante técnica de Bradford, que cuantifica las proteínas mediante espectrofotometría (*Protein Assay Kit, Bio-Rad*). En las siguientes 4 tablas se resume la cantidad de proteína de cada una de las muestras, su concentración y el volumen finalmente incluido en el grupo correspondiente, de forma que cada muestra contribuyera con 100 µg de proteína a su grupo.

MUESTRA	PROTEÍNAS (µg)	CONCENTRACIÓN (µg/ml)	VOLUMEN (µl) con 100µg DE PROTEÍNA
CCRcc 2	1.245	3.113	32.1
CCRcc 3	1.074	2.684	37.3
CCRcc 4	0.740	1.850	54.1
CCRcc 6	0.465	1.163	86.0
CCRcc 12	0.588	1.470	68.0
CCRcc 14	0.406	1.016	98.5
CCRcc 15	0.593	1.482	67.5
CCRcc 17	0.495	1.237	80.9
CCRcc 18	0.637	1.592	62.8
CCRcc 19	1.064	2.659	37.6
CCRcc 20	0.823	2.058	48.6
CCRcc 21	0.563	1.408	71.0
<b>VOLUMEN FINAL</b>			<b>744.3µL</b>
<b>TOTAL PROTEÍNA</b>			<b>1200µg</b>

**Tabla 18.** Muestras de CCR células claras. Cantidad de proteína, concentración y volumen necesario para seleccionar 100µg.

## MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRA	PROTEÍNAS ( $\mu\text{g}$ )	CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g/ml}$ )	VOLUMEN ( $\mu\text{l}$ ) con 100 $\mu\text{g}$ DE PROTEÍNA
CCRcr 1	1.427	3.567	56.1
CCRcr 5	1.064	2.659	75.5
CCRcr 9	0.985	2.463	81.2
CCRcr 13	1.255	3.138	63.7
<b>VOLUMEN FINAL</b>			<b>276.2<math>\mu\text{L}</math></b>
<b>TOTAL PROTEÍNAS</b>			<b>800<math>\mu\text{g}</math></b>

**Tabla 19.** Muestras de CCR cromóforo. Cantidad de proteínas, concentración y volumen necesario para seleccionar 100 $\mu\text{g}$

MUESTRA	PROTEÍNAS ( $\mu\text{g}$ )	CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g/ml}$ )	VOLUMEN ( $\mu\text{l}$ ) con 100 $\mu\text{g}$ DE PROTEÍNA
NT 2	1.262	3.155	31.7
NT 3	1.157	2.891	34.6
NT 4	1.262	3.155	31.7
NT 6	1.031	2.578	38.8
NT 12	1.327	3.318	38.1
NT 14	1.327	3.318	30.1
NT 15	1.116	2.791	35.8
NT 17	1.458	3.644	27.4
NT 18	1.086	2.716	36.8
NT 19	1.021	2.553	39.2
NT 20	1.312	3.280	30.5
NT 21	1.357	3.393	29.5
<b>VOLUMEN FINAL</b>			<b>404.2<math>\mu\text{L}</math></b>
<b>TOTAL PROTEÍNAS</b>			<b>1200<math>\mu\text{g}</math></b>

**Tabla 20.** Muestras de tejido sano de riñón con CCR de células claras. Cantidad de proteína, concentración y volumen necesario para seleccionar 100 $\mu\text{g}$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRA	PROTEÍNAS (µg)	CONCENTRACIÓN (µg/ml)	VOLUMEN (µl) con 100µg DE PROTEÍNA
CONTROL 1	1.290	3.225	31.0
CONTROL 2	1.341	3.352	29.8
CONTROL 3	1.047	2.618	38.2
CONTROL 4	-0.107	N/A	50.5
CONTROL 5	0.923	1.808	55.3
CONTROL 6	0.576	1.441	69.4
CONTROL 7	1.371	3.428	29.2
CONTROL 8	0.834	2.086	47.9
CONTROL 9	0.683	1.706	58.6
CONTROL 10	0.688	1.719	58.2
CONTROL 11	1.427	3.567	28.0
CONTROL 12	1.143	2.858	35.0
CONTROL 13	0.379	0.947	105.6
CONTROL 14	0.662	1.656	60.4
CONTROL 16	0.617	1.542	64.9
CONTROL 17	0.627	1.567	63.8
CONTROL 18	1.234	3.086	32.4
<b>VOLUMEN FINAL</b>			<b>858.3µL</b>
<b>TOTAL PROTEÍNAS</b>			<b>1700µg</b>

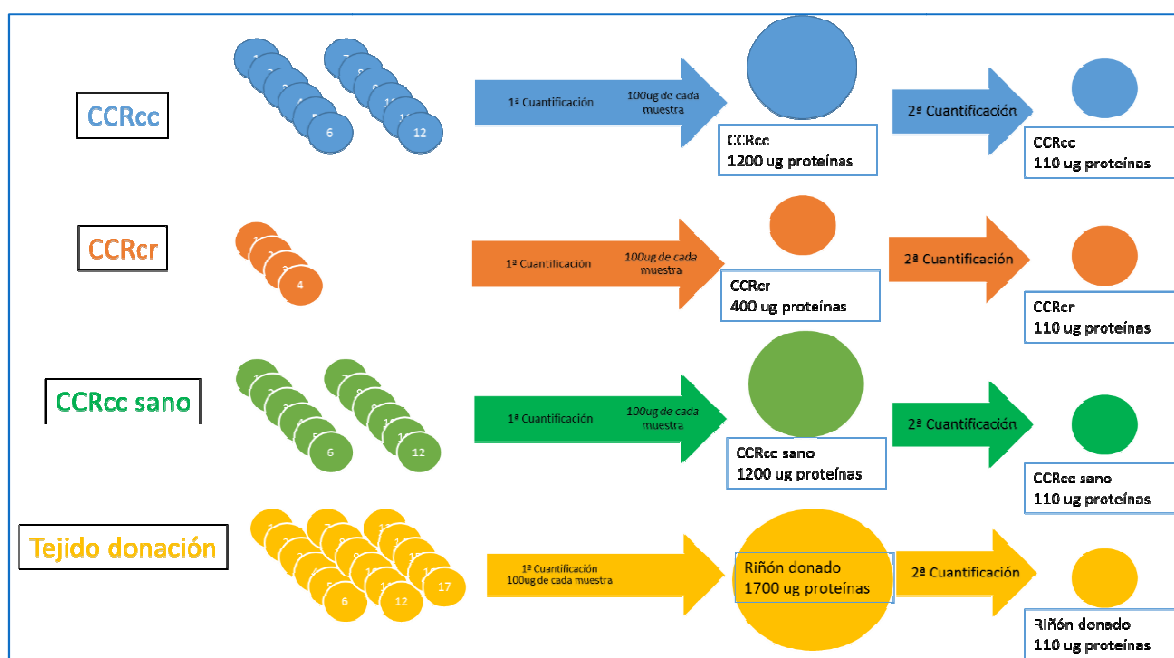
**Tabla 21.** Muestras de tejido renal sano de donante cadáver de riñón para trasplante. Cantidad de proteína, concentración y volumen necesario para seleccionar 100µg.

Una vez conseguidos los cuatro grupos, se realiza una segunda cuantificación mediante el método Bradford de cada uno de ellos, para conseguir 110 µg de proteína de cada grupo. Para ello se precipitan las proteínas mediante centrifugado, tras añadir metanolcloroformo, eliminando el sobrenadante y evaporando el precipitado. Se reconstituye la muestra en solución de 7M de urea y 2M de tiourea y se realiza un segundo Bradford<sup>102</sup>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRA	PROTEÍNAS ( $\mu\text{g}$ )	CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g/ml}$ )	VOLUMEN ( $\mu\text{l}$ ) con 110 $\mu\text{g}$ DE PROTEÍNA
CCRcc	2.117	1.059	103.9
CCRcr	3.166	1.581	69.6
Tejido sin tumor de riñón con CCRcc	2.822	1.411	78.0
Tejido sano de donantes cadáver	2.622	1.311	83.9

**Tabla 22.** Muestras de los cuatro grupos del estudio. Cantidad de proteínas, concentración y volumen necesario para seleccionar 110 $\mu\text{g}$ .



**Figura 26.** Cuantificación y unificación de muestras en 4 grupos.

**E. Digestión enzimática de las proteínas.** Es necesario digerir las proteínas en péptidos que puedan posteriormente ser marcados e identificados. Con este objetivo se empleó la técnica FASP (*Filter aided sample preparation*)<sup>103</sup>. Esta técnica se realiza sobre un filtro que permite el paso de moléculas menores a 30.000 Da, repitiendo un proceso que combina tres acciones: REDUCIR, ALQUILAR Y DIGERIR. De esta forma, 100 $\mu\text{g}$  de cada muestra en una solución de 7M de urea y 2M de thiourea se dispuso sobre el filtro, aplicando los siguientes procesos:

- **REDUCIR:** consiste en la eliminación de los puentes disulfuro que conforman la estructura tridimensional de una proteína, mediante DTT (ditiotreitól). Se añadieron 10mM de DTT durante

una hora a 37° a cada muestra, sobre el filtro. El filtro elimina los fragmentos innecesarios y retiene las proteínas ya reducidas (desplegadas).

- ALQUILAR: consiste en impedir el restablecimiento de los puentes disulfuro y por tanto evitar el replegamiento de las mismas. Los puentes disulfuro se establecen entre los grupos SH del aminoácido CYS (cistina), el único aminoácido que tiene estos grupos. Para conseguirlo, se añade un grupo alquil a cada terminación SH. Para ello se añadieron 50mM de iodoacetamida durante 20 minutos, en un ambiente oscuro.
- DIGERIR: por último se deben convertir las proteínas en péptidos identificables. Se realizó una digestión enzimática durante una noche, con una endoproteinasa Lys-C proveniente de *acromobacter lyticus* M497-1 (Wako Pure Chemical Industries), en una proporción 1:50 de enzima con respecto a proteína. Finalmente se añadió tripsina (Promega) para una segunda digestión durante 6 horas. La digestión fragmenta las proteínas en péptidos rompiendo los enlaces de la siguiente forma:
  - LYS-C: rompe las proteínas detrás de cada LYS (lisina).
  - Tripsina: rompe detrás de cada LYS y cada ARG a no ser que el siguiente residuo sea una prolina

El filtro permite el paso de los péptidos de menos de 30.000Da, que son los que se utilizaron en el posterior análisis.

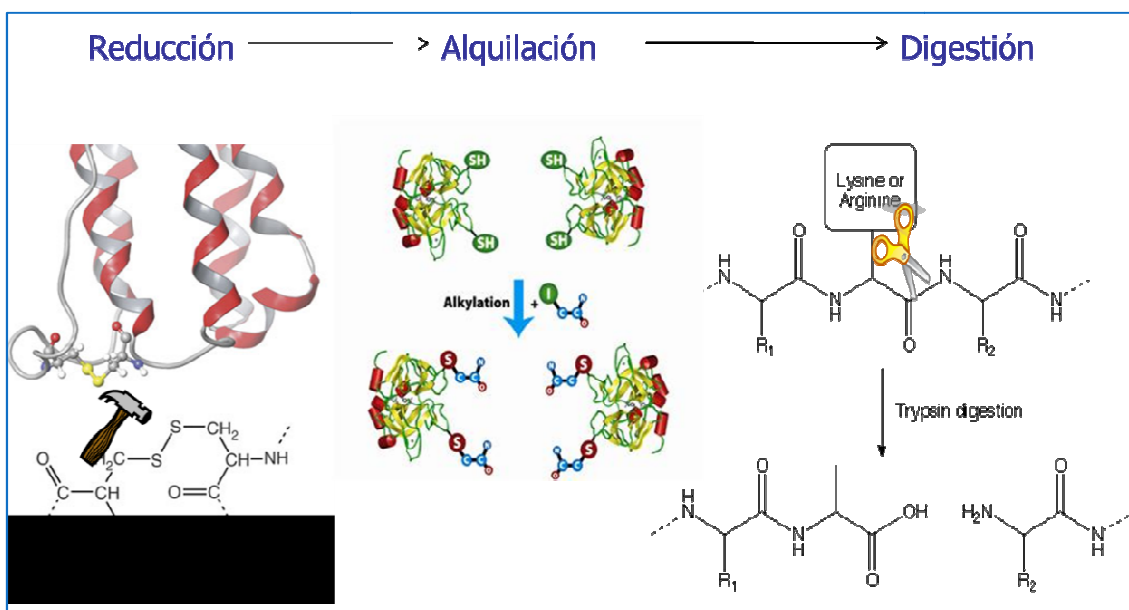


Figura 27. Método FASP para la digestión de las proteínas en péptidos identificables.

**F. Marcado de péptidos. iTRAQ.** Para la cuantificación e identificación de los péptidos de forma simultánea se debe pasar de las 4 muestras de péptidos, una por cada grupo de estudio, a una única muestra representada homogéneamente por cada grupo. Pero previamente debe marcarse cada grupo con uno de los cuatro isótopos reactivos de iTRAQ: 114.1, 115.1, 116.1 y 117.1. Cada muestra de digestión proteica fue marcada de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ABSciex), con la siguiente correspondencia:

ETIQUETA iTRAQ	TEJIDO DEL ESTUDIO
114	Tejido sano de donante cadáver
115	Tejido no tumoral de riñón con CCRcc
116	Tejido de CCR cromóforo
117	Tejido de CCR células claras

**Tabla 23.** Correspondencia de las etiquetas iTRAQ del estudio.

Tras una hora de incubación de la muestra junto con el reactivo, las muestras se unificaron, evaporaron y centrifugaron.

**G. Separación por punto isoelectrico.** La muestra única se procesa para dividir los péptidos en 24 grupos según su punto isoelectrico. Para ello se utilizó el sistema fraccionador 3100 OFFGEL Fractionator system (Agilent Technologies). Se dispusieron 150µl de cada muestra, en un medio a 20°C y 50µA hasta que se alcanzó el electroenfoque en 50kVh. Tras el enfoque, se retiraron las 24 fracciones de péptidos, diluyendo el medio en 100µl de una solución 0.1% TFA. Se unificaron los péptidos con la dilución correspondiente, y esta nueva disolución se evaporó mediante centrifugado en vacío.

#### 4.3.7.5. Análisis de los péptidos mediante NanoLC-MS/MS.

Las muestras digeridas fueron separadas mediante cromatografía de líquidos, y analizadas mediante electrospray MS/MS, mediante el sistema Eksigent nano LC acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific), equipado con una fuente iónica de nanoelectrospray (Proxeon Biosystems). Los péptidos más abundantes fueron sometidos a fragmentación (MS/MS) mediante colisión con elevada energía o "Higher energy collision dissociation (HCD)".

#### 4.3.7.6. Análisis de los datos iTRAQ.

Los espectros masas adquiridos se analizaron mediante el programa Proteome Discoverer 1.3.0.339 (Thermo Scientific), empleando la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot y Sequest como motor de búsqueda. Las funciones biológicas y rutas metabólicas se analizaron mediante el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

Se consideró que una proteína estaba sobre-expresada con un punto de corte de 2 veces en comparación con la otra muestra comparada, e infra-expresada si la proporción era inferior a 1/2 (0.5). Sólo se consideraron válidas para análisis aquellas proteínas identificadas con al menos 2 péptidos únicos.

El análisis de las proteínas identificadas se dirigió a identificar de cada péptido la siguiente información:

- La proteína a la que corresponden.
- El gen que codifica la proteína.
- La calidad de la identificación.
- Las rutas metabólicas y procesos biológicos en los que las proteínas están identificadas.

Así mismo, con IPA se pueden establecer patrones alterados biológicos, es decir, aumento o disminución de procesos biológicos en los que múltiples proteínas están alteradas.

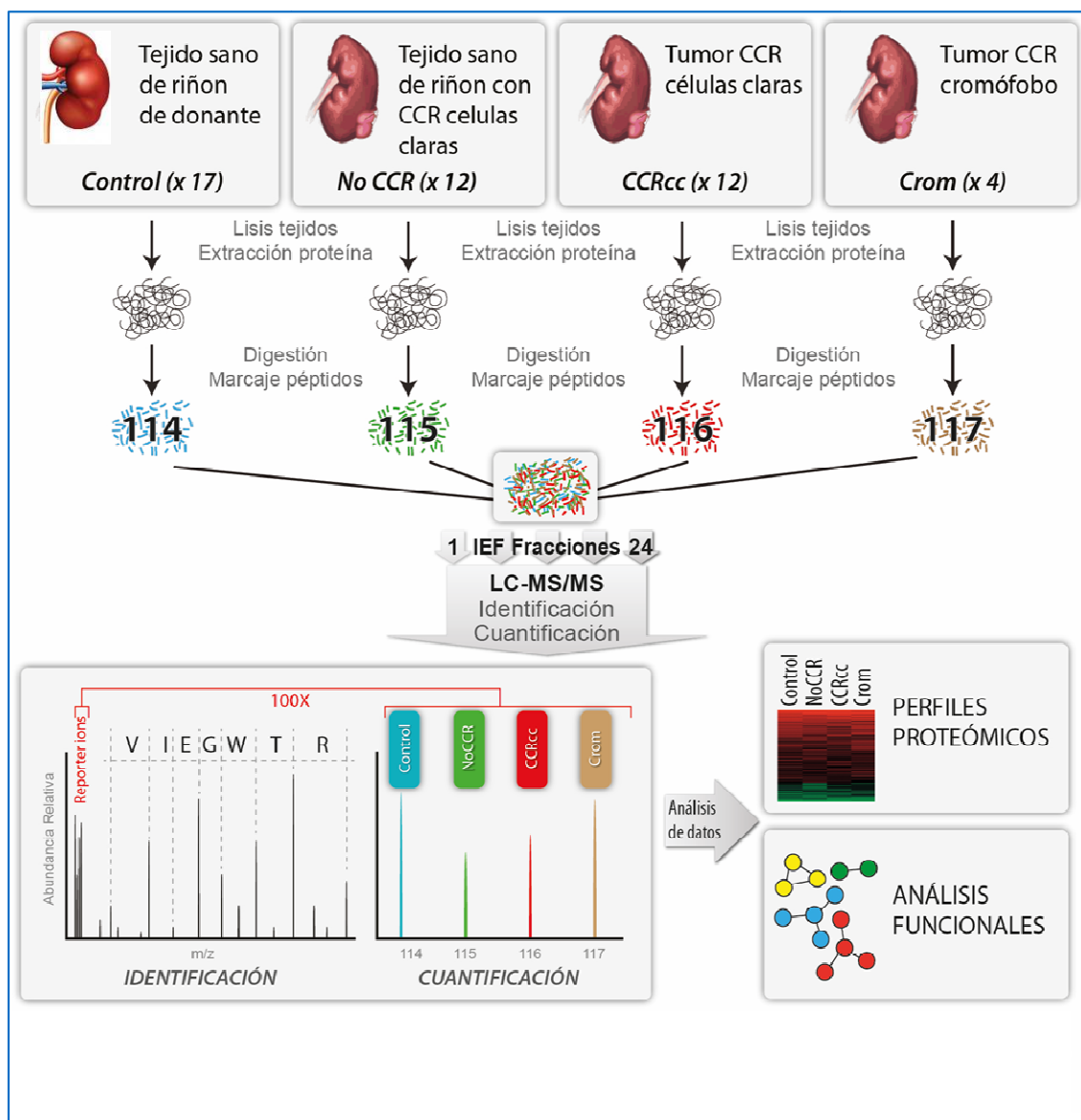


Figura 28. Procesado y análisis de las muestras.

#### 4.3.8. Análisis estadístico.

Se realizaron comparaciones de cada una de las proteínas identificadas en cada grupo, estableciendo su sobre-expresión o infra-expresión de las mismas en estas comparaciones.

Se estableció como punto de corte para determinar que una proteína se encontraba sobre o infra-expresada el ratio 2. El punto de corte habitual en estos trabajos oscila entre 1,5 y 1,8<sup>104,105</sup>. Se optó por un punto de corte más restrictivo para discriminar mejor las proteínas con potencial valor como biomarcador.



# **RESULTADOS**



## 5. RESULTADOS.

El estudio recogió muestras de tejido de los pacientes con tumor incluidos en el mismo, considerando para su comparación las muestras de tejido obtenidas de donantes cadáver para trasplante renal.

Se describirán inicialmente las características de estos pacientes.

Una vez procesadas las muestras, se establecieron diferentes comparaciones entre los resultados obtenidos de cada grupo, de acuerdo con el diseño inicial del estudio:

- Tejido sano de riñón con tumor ("NT") frente a tejido de riñón de donación para trasplante ("Control").
- Tejido sano de riñón con tumor ("NT") frente a tejido de tumor CCRcc.
- Tejido de riñón de donación para trasplante ("Control") frente a tejido de tumor CCRcc.
- Tejido de CCRcc frente a tejido de CCRcr.

Los resultados de estas comparaciones se desgranarán de forma independiente, para una mejor comprensión.

### 5.1. PACIENTES CON TUMOR INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

La tabla 24 resume las características histopatológicas y quirúrgicas de los 21 tumores renales incluidos inicialmente en el estudio. De los 21 pacientes, 13 fueron varones (62%) y 8 mujeres (38%). La edad media fue de 64.6 años con una desviación estándar (DE) de 13.5.

Respecto a las cirugías realizadas, 17 fueron nefrectomías radicales (81%) y 4 parciales (19%).

## RESULTADOS

CASO	FECHA DE INTERVENCIÓN	TIPO DE NEFRECTOMÍA	ANATOMÍA PATOLÓGICA
CCR/001	07/06/2011	Parcial	CCRcr
CCR/002	08/06/2011	Radical	CCRcc
CCR/003	15/06/2011	Radical	CCRcc
CCR/004	29/06/2011	Radical	CCRcc
CCR/005	05/07/2011	Radical	CCRcr
CCR/006	02/08/2011	Radical	CCRcc
CCR/007	16/08/2011	Radical	CCRp
CCR/008	23/08/2011	Parcial	CCR células granulares
CCR/009	29/08/2011	Radical	CCRcr
CCR/010	30/08/2011	Radical	Pielonefritis crónica
CCR/011	28/09/2011	Radical	Oncocitoma
CCR/012	11/10/2011	Radical	CCRcc
CCR/013	21/10/2011	Radical	CCRcr
CCR/014	03/11/2011	Radical	CCRcc
CCR/015	14/11/2011	Radical	CCRcc
CCR/016	15/11/2011	Parcial	Quiste renal simple
CCR/017	29/11/2011	Radical	CCRcc
CCR/018	09/12/2011	Parcial	CCRcc
CCR/019	03/01/2012	Radical	CCRcc
CCR/020	31/01/2012	Radical	CCRcc
CCR/021	14/01/2012	Radical	CCRcc

**Tabla 24.** Muestras de nefrectomía radical o parcial del estudio.

De los 21 pacientes incluidos, 19 presentaron en el análisis histopatológico una lesión tumoral: 12 con CCRcc, 4 con CCRcr, 1 CCR granular, 1 CCRp y 1 oncocitoma.

En 2 pacientes, la sospecha clínica inicial no se confirmó finalmente: uno presentó una pielonefritis crónica y otro un quiste simple.

De los 19 pacientes con tumor, finalmente se seleccionaron 16, con diagnóstico de CCRcc (12) y CCRcr (4) para el análisis proteómico.

En la tabla 25 se recogen los datos antropométricos e histológicos de los 16 pacientes finalmente estudiados.

## RESULTADOS

CÓDIGO	SEXO	EDAD (años)	PESO (kg)	TALLA (cm)	FECHA CIRUGÍA	TIPO CIRUGÍA	ANATOMÍA PATOLÓGICA	ESTADIO T	FÚHRMAN
CCR/001	Mujer	56			07/06/2011	Parcial	CCRcr	T1a	2
CCR/002	Varón	85	69	165	08/06/2011	Radical	CCRcc	1b	2
CCR/003	Varón	70	98	183	15/06/2011	Radical	CCRcc	1b	3
CCR/004	Varón	82	80	175	29/06/2011	Radical	CCRcc	1	2
CCR/005	Varón	58	112	193	05/07/2011	Radical	CCRcr	1b	3
CCR/006	Varón	73	80	172	02/08/2011	Radical	CCRcc	3a	3
CCR/009	Mujer	62	57	155	29/08/2011	Radical	CCRcr	3a	2
CCR/012	Mujer	64	68	163	11/10/2011	Radical	CCRcc	1a	1
CCR/013	Varón	81	85	175	21/10/2011	Radical	CCRcr	1a	2
CCR/014	Mujer	52	55	160	03/11/2011	Radical	CCRcc	1b	4
CCR/015	Varón	48	81	175	14/11/2011	Radical	CCRcc	3a	2
CCR/017	Mujer	41	65	155	29/11/2011	Radical	CCRcc	3a	2
CCR/018	Mujer	75	68	160	09/12/2011	Parcial	CCRcc	3a	2
CCR/019	Varón	82			03/01/2012	Radical	CCRcc	3a	4
CCR/020	Varón	41			31/01/2012	Radical	CCRcc	3a	4
CCR/021	Mujer	65	60	162	14/01/2012	Radical	CCRcc	1a	2

**Tabla 25.** Datos antropométricos y anatomopatológicos de los 16 pacientes incluidos en el estudio.

### 5.2. PACIENTES DONANTES CADÁVER PARA TRASPLANTE RENAL.

La tabla 26 resume los datos antropométricos de los 17 donantes cadáver para trasplante que se incluyeron en el grupo "Control", así como las características histopatológicas de los riñones.

En resumen, de los 17 pacientes incluidos, 8 fueron mujeres (44.4%), y 9 varones (50%). La edad media fue de 73.9 años con una desviación estándar (DE) de 10.5.

Un total de 7 injertos no fueron finalmente implantados.

## RESULTADOS

CÓDIGO	SEXO	EDAD (años)	PESO (kg)	TALLA (cm)	FECHA EXTRACCIÓN	RIÑÓN VÁLIDO	CAUSA DE NO UTILIZACIÓN DEL RIÑÓN
Control 1	Mujer	65	55	150	02/06/2011	No	Glomerulosclerosis > 20%
Control 2	Mujer	72	70	165	25/06/2011	No	Neoplasia epitelial incipiente de ovario
Control 3	Varón	78	65	162	15/07/2011	No	Glomerulosclerosis > 20%
Control 4	Varón	78	80	160	17/07/2011	No	Lesión vascular
Control 5	Varón	46	120	150	03/08/2011	Sí	
Control 6	Varón	79	90	178	28/08/2011	Sí	
Control 7	Varón	79	70	170	02/09/2011	Sí	
Control 8	Varón	78	75	170	15/10/2011	Sí	
Control 9	Mujer	81	80	155	30/10/2011	No	Riñones atróficos
Control 10	Mujer	71	75	168	04/11/2011	Sí	
Control 11	Mujer	82	50	145	23/11/2011	Sí	
Control 12	Mujer	79	65	150	25/11/2011	No	Glomerulosclerosis > 20%
Control 13	Mujer	83	65	160	09/12/2011	Sí	
Control 14	Varón	70	85	173	26/12/2011	Sí	
Control 15	Mujer	80	70	153	04/01/2012	Sí	
Control 16	Varón	83	70	172	05/02/2012	Sí	
Control 17	Varón	53	100	180	10/02/2012	No	Sepsis

**Tabla 26.** Datos antropométricos y anatomopatológicos de las muestras “Control”.

### 5.3. RESULTADO DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO GLOBAL.

### 5.4. COMPARACIÓN ENTRE TEJIDOS SIN TUMOR: “NT” FRENTE A “CONTROL”.

Se realizó una comparación por tanto entre las muestras de estos dos grupos, ya comentadas previamente en los apartados 5.1 y 5.2: 17 de riñones de donante cadáver para trasplante y 12 de tejido sano de riñón con CCRcc. El número total de proteínas identificadas fue de 3900.

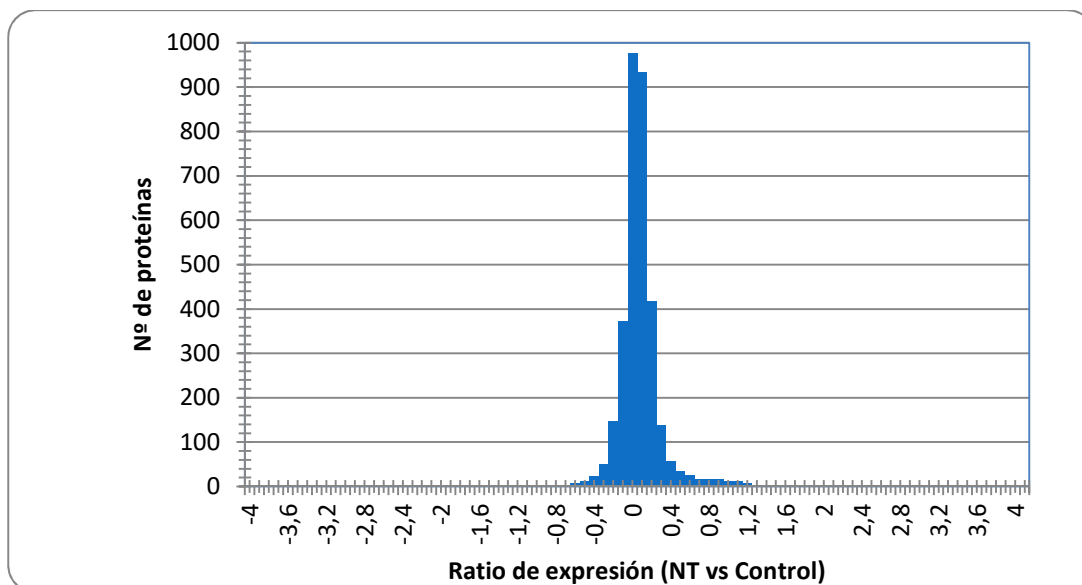
El análisis comparativo entre ambos grupos mostró que, desde el punto de vista metabólico, ambas muestras tenían un comportamiento muy similar, aunque con alguna diferencia destacable.

En la figura 29 se muestran las diferencias en la expresión de las 3900 proteínas identificadas, en forma de ratio logarítmico. En las abscisas se distribuye el ratio logarítmico de sobre-expresión o infra-expresión, y en las ordenadas, la cantidad de proteínas con ese ratio. Como se puede observar, la expresión proteica entre los dos tejidos sigue una distribución normal, con muy poca dispersión: las diferencias son escasas entre ambas muestras.

Se escoge expresar los resultados de forma logarítmica para que la sobre-expresión y la infra-expresión tengan un resultado análogo pero con valor positivo o negativo. De esta forma, una proteína X que se encontrara sobre-expresada en “NT” frente a “Control”, hallando el doble de cantidad, se representaría en esta gráfica como  $\log_2(2)$ , es decir, en el valor 1 de las abscisas; y si otra proteína Z se encontrara infra-expresada en “NT” frente a “Control”, hallándose la mitad de cantidad, se representaría como  $\log_2(0.5)$ , es decir, en el punto -1 de las abscisas.

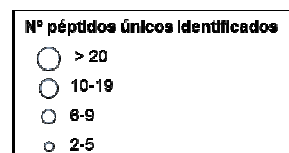
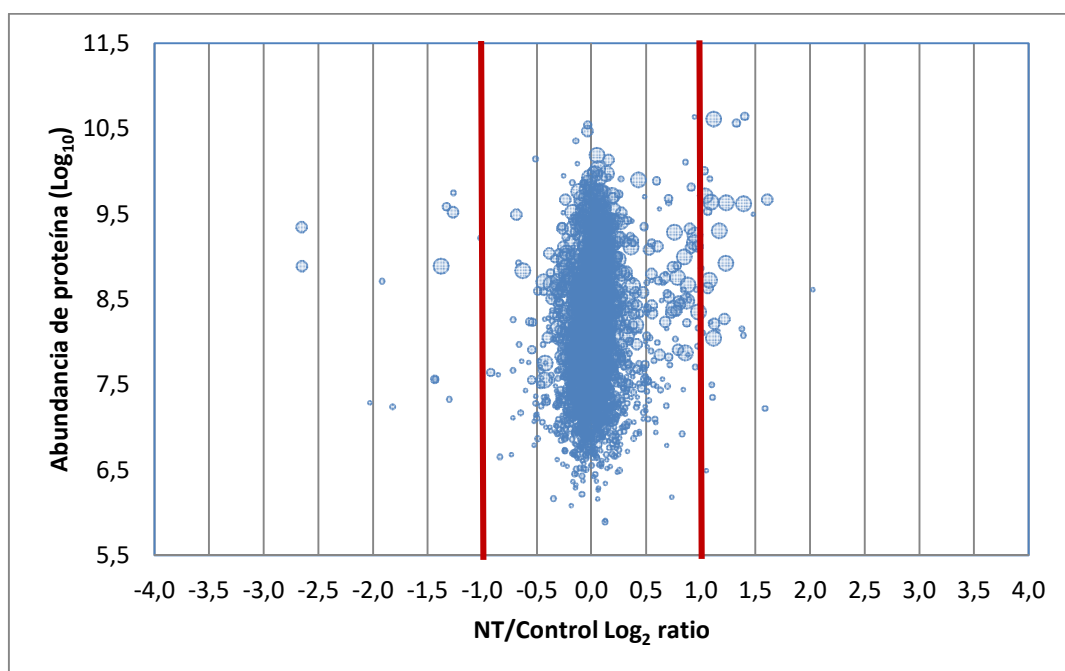
Unas diferencias marcadas mostrarían una gran amplitud en la gráfica. Como es esperable, en este caso el resultado ofrece una distribución normal con una dispersión muy limitada, como expresión de la similitud biológica de ambas muestras.





**Figura 29. Comparación en los ratios de expresión de ambos tejidos sin tumor.** Histograma que muestra la distribución de los ratios de sobre-expresión e infra-expresión de proteínas entre estos grupos, en Log2 y agrupados por intervalos. Ratios (logarítmicos) de expresión de las diferentes proteínas identificadas entre los grupos “NT” y “Control”. En el eje de las abscisas se representa el ratio de sobre-expresión (mayor de 0) o infra-expresión (menor de 0) de cada una de las 3900 proteínas, y el número de proteínas se representa en el eje de las ordenadas.

En la figura 30 se representa gráficamente la dispersión de las proteínas identificadas en la comparación entre estas dos muestras (“NT” y “Control”). Cada punto del gráfico representa una proteína, y el área del mismo punto representa la cantidad de esa proteína que se ha identificado en el análisis. Es evidente en este gráfico que las proteínas con expresión diferenciada entre ambos grupos son escasas.



**Figura 30.** Dispersión de los ratios de expresión de las proteínas entre los grupos “NT” y “Control”. Cada proteína corresponde a un círculo. En esta gráfica se muestran los siguientes parámetros:

En el eje de abscisas se expresa, en base logarítmica, el ratio de sobre-expresión o infra-expresión de cada proteína en la comparación “NT”/“Control”. Sigue una distribución normal, de forma que la mayoría de las proteínas, al tener cantidades similares en ambos grupos, se distribuyen en torno al 0. Se identifican con facilidad las proteínas con expresión más diferenciada en esta comparación: 23 proteínas sobre-expresadas y 10 infra-expresadas con un punto de corte de 2.

En el eje de las ordenadas se determina la cantidad de cada proteína encontrada.

El área de cada círculo representa el número de péptidos únicos de esa proteína identificados, lo que es una expresión de la calidad en la identificación.

Dentro de esta comparación, se aprecia que son muy pocas las proteínas que aparecen con más frecuencia en el tejido “Control” que en el “NT” (con un punto de corte de 2, sólo 10 proteínas). En cambio, se identificaron 23 proteínas que con ese ratio de 2 estaban sobre-expresadas en el tejido “NT”.

En la figura 30 se añade información con respecto a la 29: la cantidad hallada de cada una de las proteínas identificadas, lo que permite una interpretación más precisa de la relevancia de cada resultado.

Otro parámetro que debe valorarse es la calidad en la identificación de la proteína en EM. Para ello se utiliza el PSM (*peptide spectrum matches* o asignación péptido-espectro): identifica el número de veces

## RESULTADOS

que una secuencia peptídica de una proteína en concreto ha sido identificada; cuanto mayor sea, determina una mayor calidad en la cuantificación de la proteína. Las herramientas de análisis mediante espectrometría de masas no identifican directamente proteínas, sino secuencias de péptidos que deben ser asignadas posteriormente a una proteína. Dado que en este tipo de experimentos se generan miles de espectros, la interpretación manual no es una alternativa válida. Se utilizan diferentes herramientas para realizar estos emparejamientos, y a cada uno de ellos se le denomina así: PSM.

En las tablas con las proteínas sobre-expresadas e infra-expresadas de cada comparación se van a incluir los siguientes datos: la descripción de la proteína, el gen que la codifica, la asignación péptido-espectro o PSM (*peptide-spectrum match*) y el ratio de expresión diferenciada.

En la tabla 27 se muestran las proteínas sobre-expresadas en “NT” frente a “Control” con un ratio de sobre-expresión superior a 2, con su PSM correspondiente.

DESCRIPCIÓN	GEN	PSM	RATIO
Haptoglobin	HP	125	3,06
Apolipoprotein A-I	APOA1	137	2,72
Apolipoprotein A-II	APOA2	10	2,68
Hemoglobin subunit beta	HBB	1105	2,65
Hemoglobin subunit alpha	HBA1	687	2,53
Hemoglobin subunit delta	HBD	732	2,38
Apolipoprotein A-IV	APOA4	50	2,35
Fibrinogen beta chain	FGB	161	2,35
Fibrinogen alpha chain	FGA	174	2,24
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4	47	2,20
Apolipoprotein B-100	APOB	98	2,19
Serum albumin	ALB	1959	2,17
Fibrinogen gamma chain	FGG	158	2,17
Ig gamma-2 chain C region	IGHG2	160	2,16
Ig kappa chain V-IV region Len	IGKV4-1	7	2,15
Alpha-1-acid glycoprotein 2	ORM2	41	2,12
Complement factor B	CFB	49	2,09
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	HMGCS2	38	2,09
Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1	8	2,05
Ig gamma-1 chain C region	IGHG1	238	2,04
Serotransferrin	TF	318	2,03
Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS	9	2,02
Ig mu chain C region	IGHM	51	2,01

**Tabla 27.** Listado de proteínas sobre-expresadas en “NT” frente a “Control”, con un ratio de sobreexpresión superior a 2, con el PSM correspondiente.

## RESULTADOS

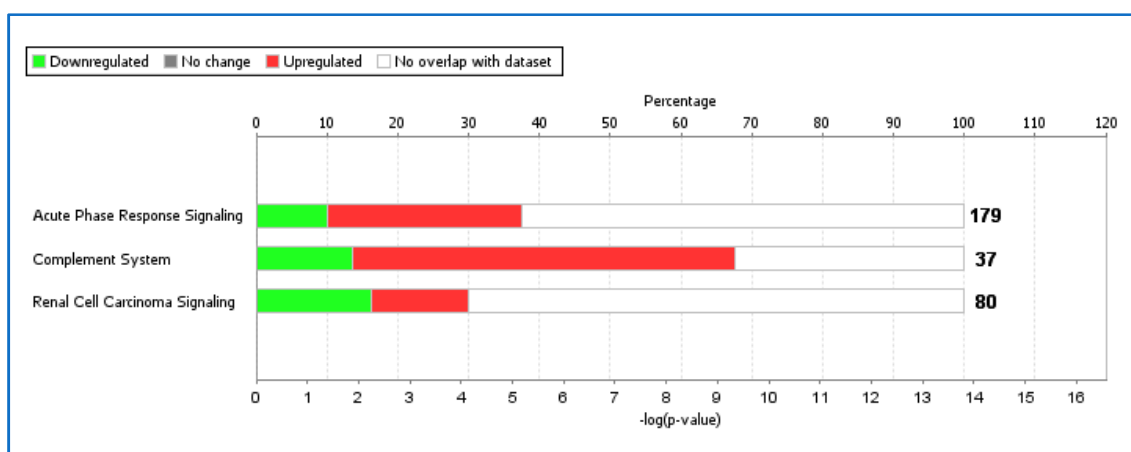
En la tabla 28 se describen las proteínas infra-expresadas en la comparación "NT" frente a "Control" con un ratio superior a 2.

DESCRIPCIÓN	GEN	PSM	RATIO
Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	53	<b>6,67</b>
Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	72	<b>6,25</b>
Collagen alpha-1(III) chain	COL3A1	11	<b>4,35</b>
Chitinase-3-like protein 1	CHI3L1	9	<b>3,33</b>
Phospholipase A2, membrane associated	PLA2G2A	5	<b>2,78</b>
Fibrillin-1	FBN1	129	<b>2,63</b>
Collagen alpha-4(IV) chain	COL4A4	5	<b>2,56</b>
Collagen alpha-1(IV) chain	COL4A1	136	<b>2,50</b>
Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3	8	<b>2,44</b>
Collagen alpha-2(IV) chain	COL4A2	108	<b>2,38</b>

**Tabla 28.** Listado de proteínas infra-expresadas en "NT" frente a "Control" con un ratio superior a 2, con el PSM correspondiente. Se ha invertido el ratio de expresión entre ambos grupos (1/resultado) para una mejor interpretación (si el resultado de una proteína A es la mitad de abundante en CCRcc que en "Control", en vez de 0.5 se expresará como 1/0.5=2).

El análisis de las rutas metabólicas en las que estas proteínas sobre-expresadas estaban implicadas mostró que la actividad inflamatoria y la cadena de reacción de fase aguda estaban muy activadas en el tejido del grupo "NT" frente a las muestras del grupo "Control".

En la figura 31 se detallan las rutas metabólicas más relevantes con diferencias entre ambos grupos. Es destacable el aumento de la actividad inflamatoria, tanto del sistema de complemento como de la reacción de fase aguda. La figura está sacada de los resultados del análisis funcional con la herramienta IPA de nuestros resultados.

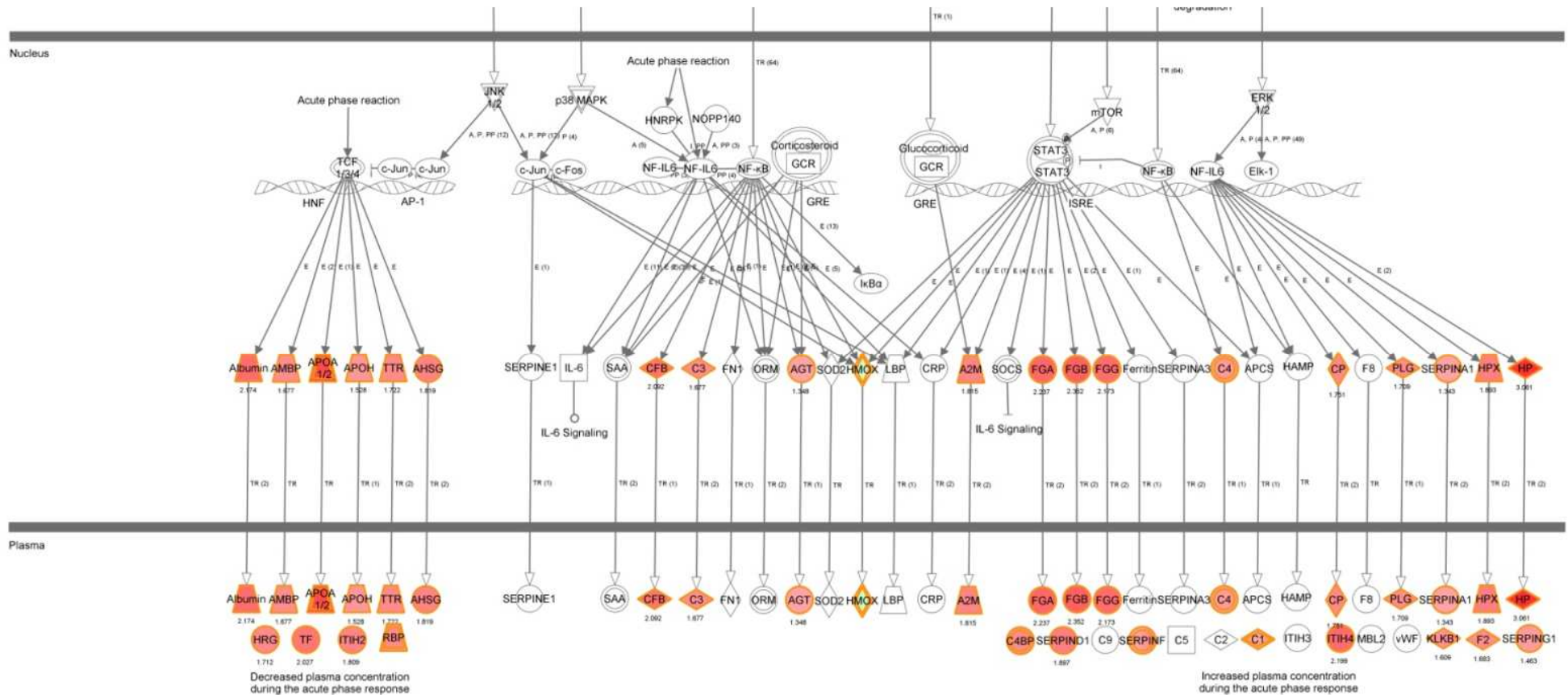


**Figura 31.** Rutas metabólicas más relevantes diferencialmente expresadas en "NT" frente a "Control".

## RESULTADOS

En relación a la ruta de la reacción de fase aguda, es destacable que 49 de las 177 proteínas conocidas de la misma estaban sobre-expresadas en el grupo "NT".

El ratio de expresión diferencial de las 177 proteínas de la ruta de reacción de fase aguda tuvo una mediana de 1.74 (rango intercuartílico 1.54-2.11). En la figura 32 se representa el final de la ruta de reacción de fase aguda, y se marcan las proteínas de la misma que se encontraron sobre-expresadas.



**Figura 32.** La reacción de fase aguda se inicia en la agresión a un tejido, que activa macrófagos, fibroblastos y células endoteliales, iniciando una cascada desencadenada inicialmente por TNF-α (factor de necrosis tumoral α), IL-1 (interleukina 1), OSM (oncostatin) e IL-6 (interleukina 6), liberadas en el espacio extracelular. A través de sus receptores, se introducen en el citoplasma y activan la respuesta en el núcleo para la producción de los productos finales, que se secretan al plasma. En esta imagen se ha mantenido sólo la respuesta en núcleo y en secreción al plasma final. Se ha marca en color todas aquellas proteínas sobre-expresadas en “NT” frente a “Control”.

AMBP. Proteína del gen AMBP.

APOA. Apolipoproteína A.

APOH.  $\beta$  – 2 glicoproteína 1.

TTR. Transtirretina.

AHSG.  $\alpha$  – 2 HS glicoproteína.

HRG. Glicoproteína rica en histidina.

TF. Serotransferrina.

ITIH2. Inhibidor de la inter- $\alpha$ -tripsina H2.

RBP. Proteína plegadora de retinol.

CFB. Factor B del complemento.

C3. Factor 3 del complemento.

AGT. Serin-piruvato aminotransferasa.

HMOX. Heme-oxigenasa 1.

A2M. Macroglobulina  $\alpha$ 2.

FGA. Cadena  $\alpha$  del fibrinógeno.

FGB. Cadena  $\beta$  del fibrinógeno.

FGG. Cadena  $\gamma$  del fibrinógeno.

C4. Factor 4 del complemento.

CP. Ceruloplasmina.

PLG. Plasminógeno.

SERPIN A 1.  $\alpha$  – 1 antitripsina.

HBX. Proteína X de VHB.

HP. Haptoglobina.

C4BP. Proteína plegadora de C4.

SERPIND1. Cofactor 2 de heparina.

SERPINF.  $\alpha$  – 2 antiplasmina.

C1. Factor 1 del complemento.

ITIH4. Inhibidor de la inter- $\alpha$ -tripsina H4.

KLKB1. Calicreina plasmática.

F2. Protrombina.

SERPING1. Inhibidor de proteasa plasmática C1.

## 5.5. COMPARACIÓN ENTRE TEJIDOS SIN TUMOR (“NT” Y “CONTROL”) CON TEJIDO DE CCRcc.

Una vez comparados los dos tipos de tejido sano dentro del estudio, se realizó una comparación de ambos con el tejido extraído de CCRcc, con el objetivo descrito de identificar posibles marcadores tumorales.

La comparación entre los tejidos sin tumor y el tejido proveniente del tumor mostró diferencias muy significativas, reflejo de la actividad metabólica y la expresión proteica diferenciada que produce el CCRcc.

En los siguientes apartados se van a detallar las diferencias generales entre estos grupos descritos, en comparaciones de dos en dos: “NT” frente a tejido de CCRcc, y “Control” frente a CCRcc.

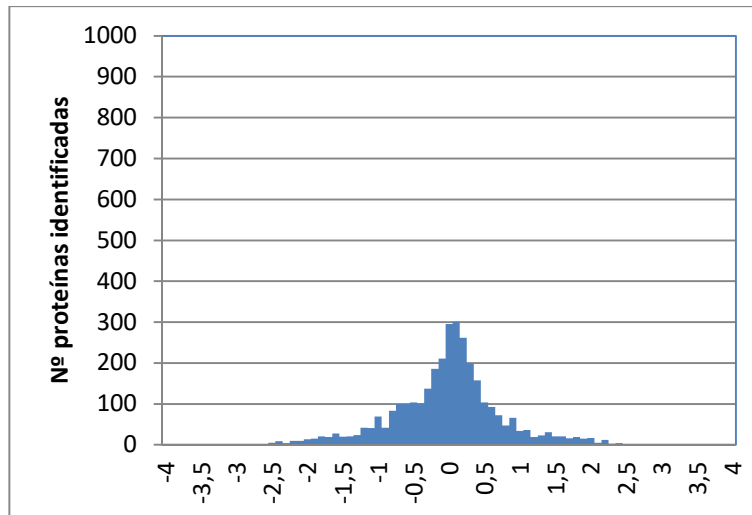
### 5.5.1. Tejido CCRcc frente a tejido “Control”.

A continuación, se detallan los resultados de estas comparaciones.

En la figura 33 se expresan las diferencias de CCRcc frente a “Control” en forma de histograma y en base logarítmica, tal y como se ha hecho en el apartado 5.4. De este modo, la sobre-expresión de una proteína se expresa en positivo como un multiplicador igual a la infra-expresión de una proteína, pero éste último en negativo.

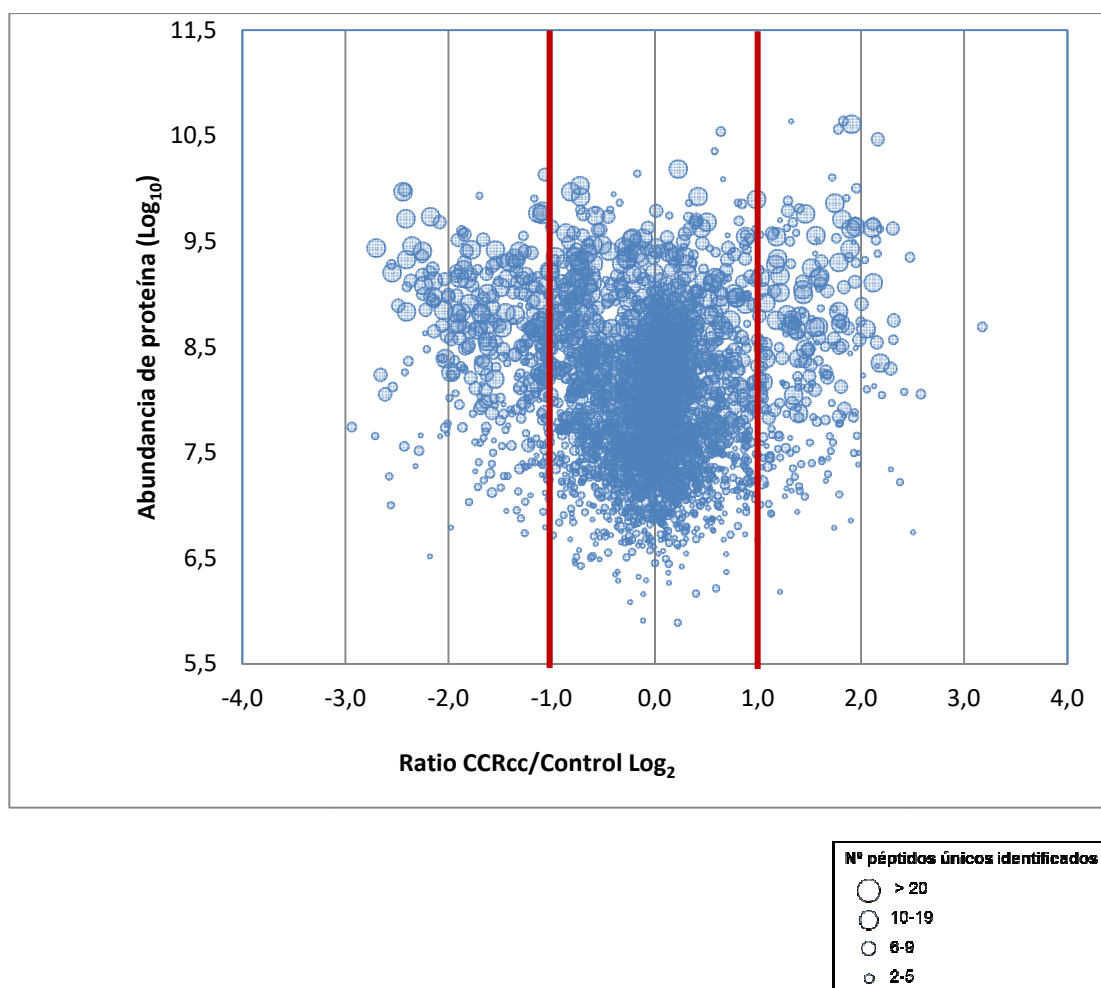
Como se puede apreciar en la figura 33, las diferencias entre ambos grupos siguen una distribución normal, en la que las proteínas sobre-expresadas o infra-expresadas con un multiplicador mayor de 2 son numerosas. En comparación con el análisis “NT” frente a “Control”, en este caso la distribución es más dispersa, y la cantidad de proteínas en torno al 0 es mucho menor (alrededor de 300 proteínas, frente a casi 1000 en “NT”/“Control”).





**Figura 33. Expresión del ratio CCRcc/"Control" en logaritmo de base 2.** Histograma que muestra la distribución de los ratios de sobre-expresión e infra-expresión de proteínas entre estos grupos, en Log2 y agrupados por intervalos. Los diferentes ratios de expresión proteica siguen una distribución normal, dejando en los extremos las proteínas encontradas con mayores diferencias entre ambas muestras.

Además de la expresión diferenciada, se debe tener en cuenta la cantidad de proteína hallada, así como la calidad de la identificación de la misma. Esto se representa en la figura 34.



**Figura 34. CCRcc frente a “Control”. Expresión diferenciada entre proteínas atendiendo a la cantidad encontrada de cada una y a la calidad de la identificación.** Esta figura, análoga a figura 30, representa de forma gráfica la distribución de los ratios diferenciados, distribuidos en torno al 0, y las proteínas con ratios diferenciados superiores a 2.

En esta comparación, muchas proteínas cumplen el ratio de más de 2 de sobre-expresión e infra-expresión. Si se compara con la gráfica similar del apartado 5.4 (los dos tejidos sin tumor incluidos en el estudio), se puede observar que la distribución no está tan agrupada como en aquella; ésta muestra una distribución mucho más dispersa, evidenciando unas mayores diferencias entre ambos tejidos.

Se identificaron 232 proteínas con un ratio de sobre-expresión superior a 2, y 333 infra-expresadas con ese mismo ratio.

En las tablas 29 y 30 se muestran las proteínas con diferencias más significativas entre estos dos grupos: tejido “Control” y tejido CCRcc.

## RESULTADOS

PROTEÍNAS SOBRE-EXPRESADAS CCRcc/CONTROL	GEN	PSM	RATIO
Fatty acid-binding protein, brain	FABP7	17	9,07
Tropomyosin beta chain	TPM2	86	6,38
Gamma-enolase	ENO2	57	5,74
Microfibril-associated glycoprotein 4	MFAP4	38	5,62
Periostin	POSTN	184	5,11
Transgelin	TAGLN	182	5,07
Fibulin-5	FBLN5	41	4,99
Protein kinase C delta-binding protein	PRKCDBP	9	4,97
Perilipin-2	PLIN2	27	4,89
Calponin-1	CNN1	55	4,75
Haptoglobin	HP	125	4,46
Fibronectin	FN1	337	4,38
Thrombospondin-1	THBS1	122	4,15
Thrombospondin-2	THBS2	32	3,81
Galectin-1	LGALS1	46	3,75
Matrix metalloproteinase-9	MMP9	3	3,35
Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	17	3,49

**Tabla 29.** Selección de proteínas sobre-expresadas en la comparación tejido CCRcc frente a “Control”.

## RESULTADOS

DESCRIPCIÓN	GEN	PSM	RATIO 1/RATIO *
<b>PROTEÍNAS INFRA-EXPRESADAS</b>			
D-amino-acid oxidase	DAO	12	5,26
Fatty acid-binding protein, liver	FABP1	33	5,26
Probable 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase, mitochondrial	HOGA1	38	5,56
Sodium/glucose cotransporter 2	SLC5A2	29	5,88
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM2A, mitochondrial	ACSM2A	156	6,25
Sodium/glucose cotransporter 5	SLC5A10	10	6,67
Sodium-coupled monocarboxylate transporter 2	SLC5A12	23	7,14
Solute carrier family 13 member 3	SLC13A3	4	20,00

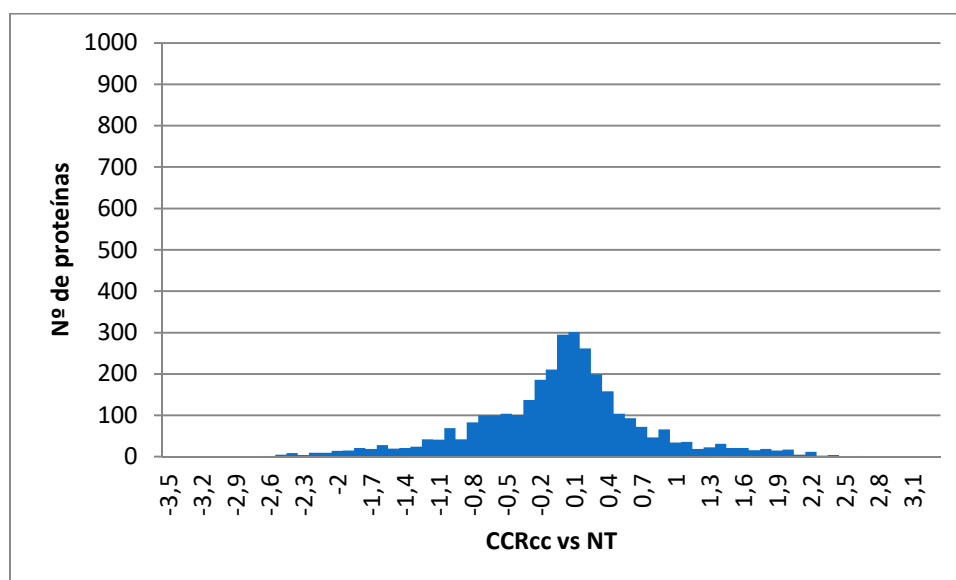
**Tabla 30.** Selección de proteínas infra-expresadas en la comparación tejido **CCRcc** frente a **“Control”**.

\* Se ha modificado el ratio de infra-expresión, invirtiendo el resultado (1/resultado) para una mejor interpretación (si el resultado de una proteína A es la mitad de abundante en CCRcc que en “Control”, en vez de 0.5 se expresará como 1/0.5=2).

### 5.5.2. Tejido CCRcc frente a tejido “NT”.

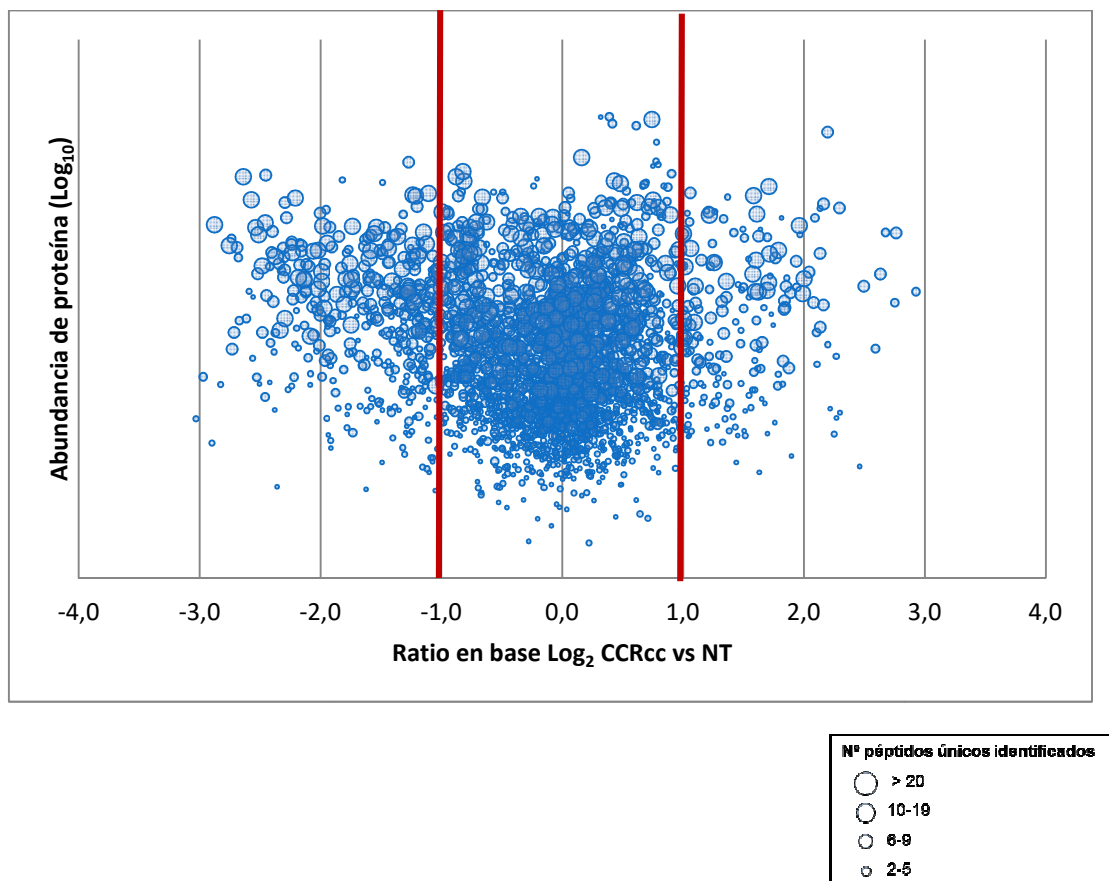
Se van a mostrar los mismos gráficos que en las otras comparaciones: histograma de distribución, distribución con expresión de la cantidad de proteína identificada y péptidos únicos, y tabla de las proteínas más destacadas.

La figura 35 muestra el análisis proteómico diferencial entre los tejidos CCRcc y “NT”, el cual es prácticamente superponible al encontrado en la comparación entre CCRcc y “Control”. Existen igualmente diferencias significativas en ambos extremos de la figura.



**Figura 35. Tejido de CCRcc frente a “NT”.** Histograma que muestra la distribución de los ratios de sobre e infra-expresión de proteínas entre estos grupos, en Log<sub>2</sub> y agrupados por intervalos. Continúa mostrando una distribución normal, con diferencias significativas en ambos extremos, igual que en la comparación anterior.

En la figura 36 se muestran las diferencias atendiendo a la cantidad de proteína identificada. Esta figura, análoga a figura 30, representa de forma gráfica la distribución de los ratios diferenciados, distribuidos en torno al 0, y las proteínas con ratios diferenciados superiores a 2.



**Figura 36. CCRcc frente a "NT". Expresión diferenciada entre proteínas atendiendo a la cantidad encontrada de cada una y a la calidad de la identificación.** Esta figura, análoga a figura 30, representa de forma gráfica la distribución de los ratios diferenciados, distribuidos en torno al 0, y las proteínas con ratios diferenciados superiores a 2.

Las proteínas más relevantes que se encontraron sobre-expresadas en la comparación se reflejan en la tabla 31.

## RESULTADOS

DESCRIPCIÓN	GEN	PSM	RATIO
Fatty acid-binding protein, brain	FABP7	17	7,63
Fibulin-5	FBLN5	41	6,76
Microfibril-associated glycoprotein 4	MFAP4	38	6,49
Periostin	POSTN	184	5,98
Gamma-enolase	ENO2	57	5,73
Tropomyosin beta chain	TPM2	86	5,69
Calponin-1	CNN1	55	5,37
Protein kinase C delta-binding protein	PRKCDBP	9	5,08
Transgelin	TAGLN	182	4,94
Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	17	4,59
Perilipin-2	PLIN2	27	4,41
Thrombospondin-2	THBS2	32	4,09
Thrombospondin-1	THBS1	122	3,96
Fibronectin	FN1	337	3,32
Galectin-1	LGALS1	46	3,21
Matrix metalloproteinase-9	MMP9	3	2,72
Haptoglobin	HP	125	1,43

**Tabla 31. Relación de las proteínas sobre-expresadas más relevantes en la comparación CCRcc vs "NT".** Se han seleccionado las mismas que en el anterior apartado, ya que son prácticamente coincidentes los resultados.

Las proteínas más relevantes que se encontraron infra-expresadas en la comparación CCRcc frente a "NT" se reflejan en la tabla 32.

DESCRIPCIÓN	GEN	PSM	1/RATIO
Probable 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase, mitochondrial	HOGA1	38	5,56
Fatty acid-binding protein, liver	FABP1	33	6,25
D-amino-acid oxidase	DAO	12	6,25
Sodium/glucose cotransporter 2	SLC5A2	29	6,67
Sodium/glucose cotransporter 5	SLC5A10	10	7,14
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM2A, mitochondrial	ACSM2A	156	7,14
Sodium-coupled monocarboxylate transporter 2	SLC5A12	23	7,69
Solute carrier family 13 member 3	SLC13A3	4	16,67

**Tabla 32. Relación de las proteínas infra-expresadas más relevantes en la comparación CCRcc vs "NT".** Se han seleccionado las mismas que en el anterior apartado, ya que son prácticamente coincidentes los resultados. \* Al igual que en la tabla 31, se ha invertido la infra-expresión (1/resultado) para mejor comprensión.

No hubo ninguna proteína que mostrara un comportamiento diferenciado con un ratio mayor de 2 en las comparaciones de CCRcc con los tejidos sanos: es decir, que estuviera sobre-expresada en una de las comparaciones e infra-expresada en otra.

**5.5.3. Tejido CCRcc frente a "Control" y "NT".**

La tabla 33 destaca las proteínas más relevantes de entre el panel de proteínas sobre-expresadas en la comparación de CCRcc frente a los tejidos "NT" y "Control".

			CCRcc/CONTROL	CCRcc/NT
	GEN	PSM	RATIO	RATIO
Fatty acid-binding protein, brain	FABP7	17	9,07	7,63
Tropomyosin beta chain	TPM2	86	6,38	5,69
Gamma-enolase	ENO2	57	5,74	5,73
Microfibril-associated glycoprotein 4	MFAP4	38	5,62	6,49
Periostin	POSTN	184	5,11	5,98
Transgelin	TAGLN	182	5,07	4,94
Fibulin-5	FBLN5	41	4,99	6,76
Protein kinase C delta-binding protein	PRKCDBP	9	4,97	5,08
Perilipin-2	PLIN2	27	4,89	4,41
Calponin-1	CNN1	55	4,75	5,37
Haptoglobin	HP	125	4,46	1,43
Fibronectin	FN1	337	4,38	3,32
Thrombospondin-1	THBS1	122	4,15	3,96
Thrombospondin-2	THBS2	32	3,81	4,09
Galectin-1	LGALS1	46	3,75	3,21
Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	17	3,49	4,59
Matrix metalloproteinase-9	MMP9	3	3,35	2,72

**Tabla 33.** Proteínas **sobre-expresadas** en CCRcc frente a los tejidos de sanos ("NT" y "Control"). Se aprecia la gran similitud en los resultados en ambos grupos.

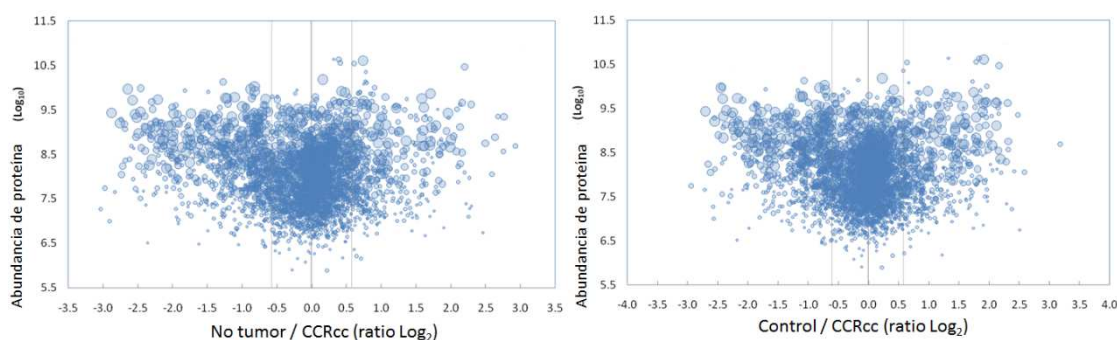
Así mismo, la tabla 34 muestra las proteínas más relevantes de entre las infra-expresadas en esa misma comparación CCRcc frente a tejidos "NT" y "Control".

## RESULTADOS

DESCRIPCIÓN	GEN	PSM	CCRcc/CONTROL	CCRcc/NT
D-amino-acid oxidase	DAO	12	5,26	6,25
Fatty acid-binding protein, liver	FABP1	33	5,26	6,25
Probable 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase, mitochondrial	HOGA1	38	5,56	5,56
Sodium/glucose cotransporter 2	SLC5A2	29	5,88	6,67
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM2A, mitochondrial	ACSM2A	156	6,25	7,14
Sodium/glucose cotransporter 5	SLC5A10	10	6,67	7,14
Sodium-coupled monocarboxylate transporter 2	SLC5A12	23	7,14	7,69
Solute carrier family 13 member 3	SLC13A3	4	20,00	16,67

**Tabla 34.** Proteínas infra-expresadas en CCRcc frente a los tejidos de sanos (“NT” y “Control”). Se aprecia la gran similitud en los resultados. Al igual que en las tablas anteriores, se ha invertido la infra-expresión (1/resultado) para mejor comprensión del ratio.

Como se aprecia en las tablas 33 y 34, la expresión diferenciada de proteínas del tejido con CCRcc con respecto a cualquiera de las muestras de referencia es similar. En la figura 37 se puede apreciar la dispersión de proteínas de las muestras “Control” y “NT” frente a tejido con CCR. Se aprecia la distribución similar de la dispersión de expresión de proteínas en ambas comparaciones.



**Figura 37.** Comparación entre dos tejidos sanos (“NT” y “Control”) frente a tejido con CCRcc.

Al realizar un análisis funcional sobre las rutas metabólicas que se encuentra alteradas en esta muestra con respecto a los tejidos de referencia (“NT” y “Control”), se objetivó que en ambas comparaciones se encontraban resultados similares: un incremento llamativo de las rutas de movimiento celular y de comunicación intercelular y una disminución marcada de los metabolismos de aminoácidos, lipídico y

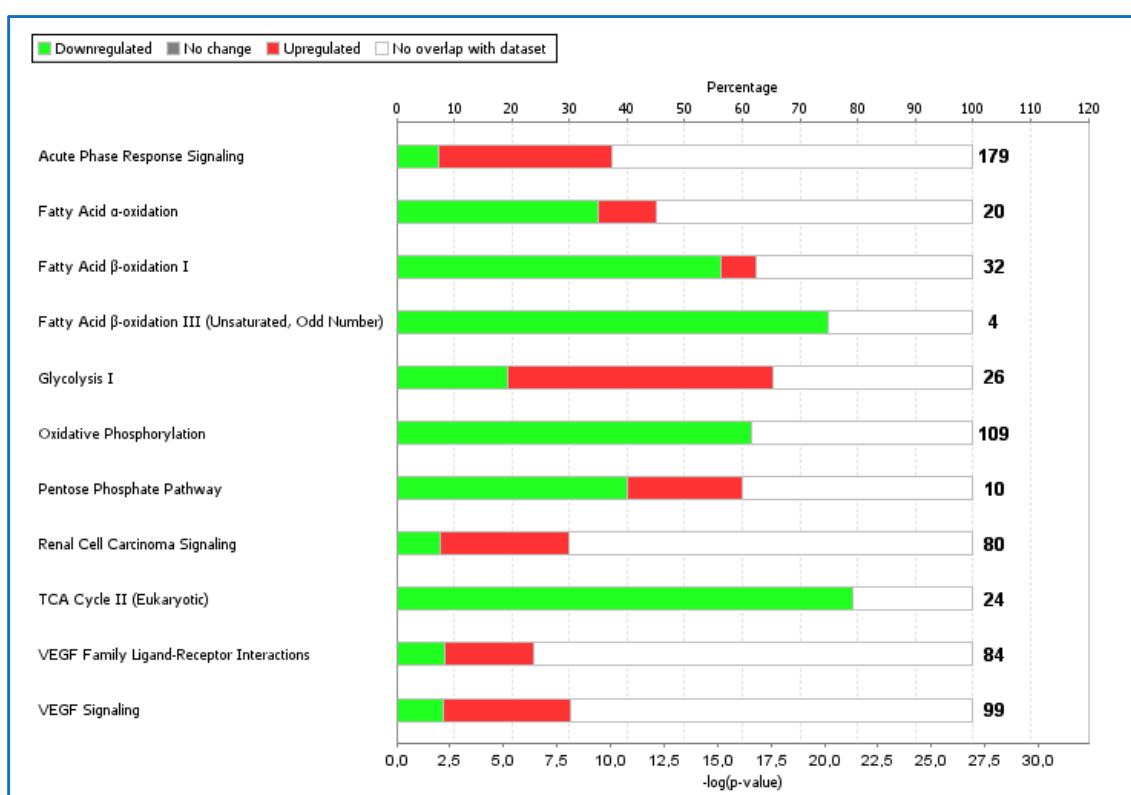


## RESULTADOS

especialmente del mitocondrial, con afectación de la práctica totalidad de las proteínas de esta ruta metabólica.

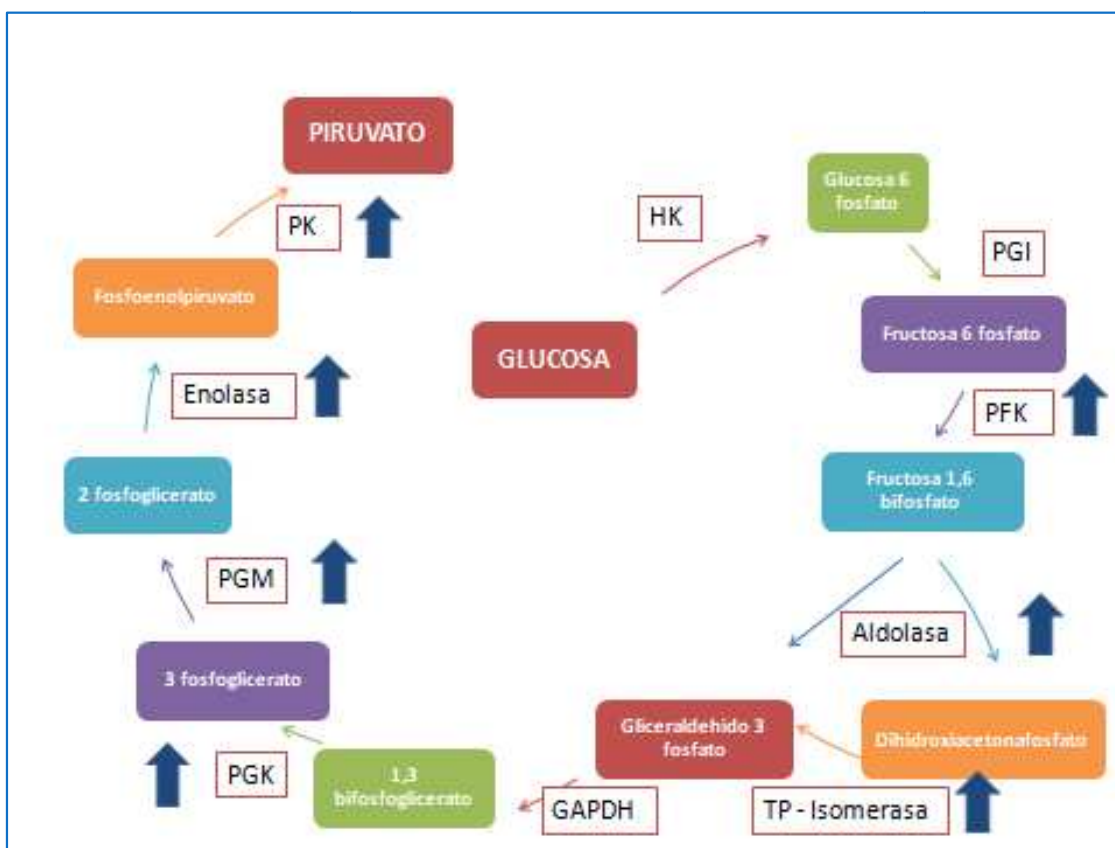
De hecho, 17 de las 26 proteínas de la vía de la glicólisis estaban sobre-expresadas en CCRcc frente a los tejidos de referencia. Y de forma paralela, 19 de las 24 proteínas de la vía de la respiración celular se hallaron infra-expresadas. Estos resultados fueron idénticos comparando CCRcc con ambos tejidos sanos.

En la figura 38 se muestran las rutas metabólicas más relevantes que mostraron actividad diferenciada entre CCRcc y los tejidos de referencia. Se puede apreciar que se encuentra muy enriquecida la vía de la glicólisis, así como suprimida la de respiración celular. También se aprecia disminuido el metabolismo de lípidos.



**Figura 38.** Vías metabólicas más diferenciadas entre CCRcc y "Control". Se puede apreciar que se encuentra muy enriquecida la vía de la glicólisis, así como suprimida la de respiración celular. También se aprecia disminuido el metabolismo de lípidos. La figura está sacada de los resultados del análisis funcional con la herramienta IPA de nuestros resultados.

En cuanto a la ruta canónica de la glicólisis, descrita en la figura 39, se aprecia en nuestros resultados un aumento de la mayoría de las enzimas participantes: fosfofructokinasa, aldolasa, enolasa 2 y piruvatokinasa con ratios por encima de 2. Por otro lado, triosefosfato isomerasa (TPI), fosfogliceratokinasa y fosfoglucomutasa (PGM) se encontraron elevadas, pero sin alcanzar un ratio de 2.



**Figura 39. Esquema de la vía de la glicólisis.** En los recuadros coloreados se encuentran las proteínas intermedias, mientras que en los blancos se representan las enzimas de esta vía. Se ha incluido una flecha ascendente en las enzimas que se encontraron sobre-expresadas en los resultados del estudio: con ratio por encima de 2, PFK, aldolasa, enolasa y PK. Además de estas enzimas, TP isomerasa, TPI, PGK y PGM estaban elevadas pero sin alcanzar un ratio de 2. Sólo HK, PGI y GAPDH se encontraron no sobreexpresadas.

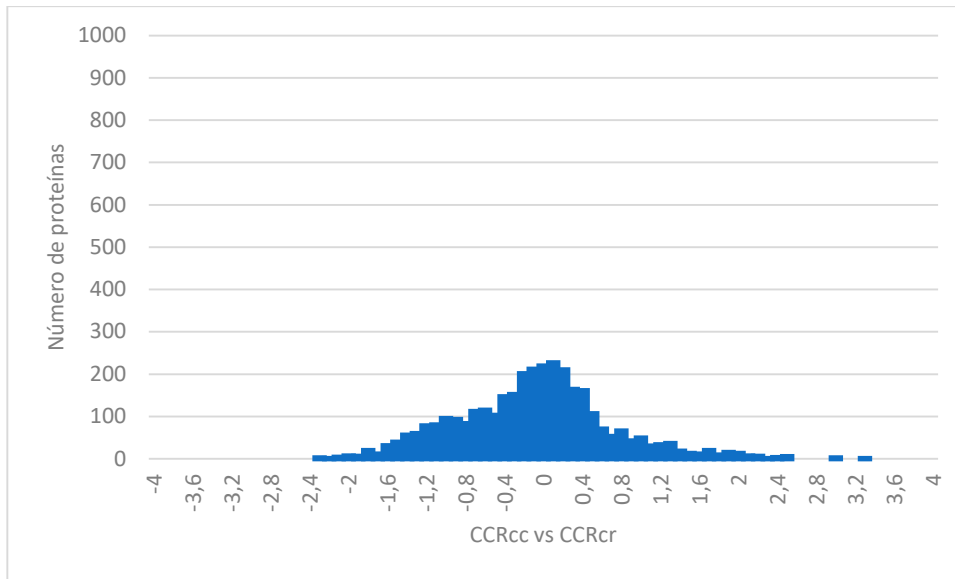
HK: hexokinasa; PGI: glucosa 6 – fosfato isomerasa; TP isomerasa: triosefosfato isomerasa; GAPDH: gliceraldehid 3 – fosfato dehidrogenasa; PGK: fosfogliceratokinasa; PGM: fosfoglucomutasa; PK: piruvatokinasa.

## 5.6. COMPARACIÓN ENTRE DOS TUMORES: CCRcc FRENTE A CCRcr.

En la figura 40 se muestra un histograma con los ratios de expresión diferenciada de proteínas entre CCRcc y CCRcr.

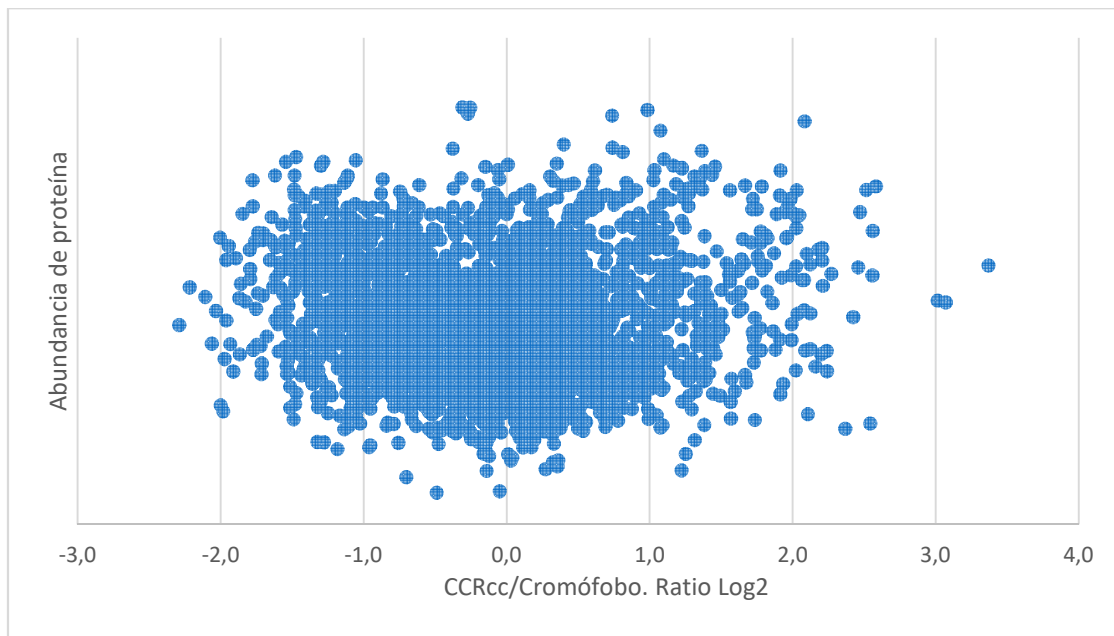
Los ratios de expresión diferenciada de proteínas en esta comparación muestran una distribución normal, aunque con diferencias importantes entre ambos.

## RESULTADOS



**Figura 40.** Distribución de los ratios de sobre e infraexpresión de proteínas entre CCRcc y CCRcr. En las abscisas se muestra el Log2 de los ratios CCRcc/CCRcr agrupados por intervalos.

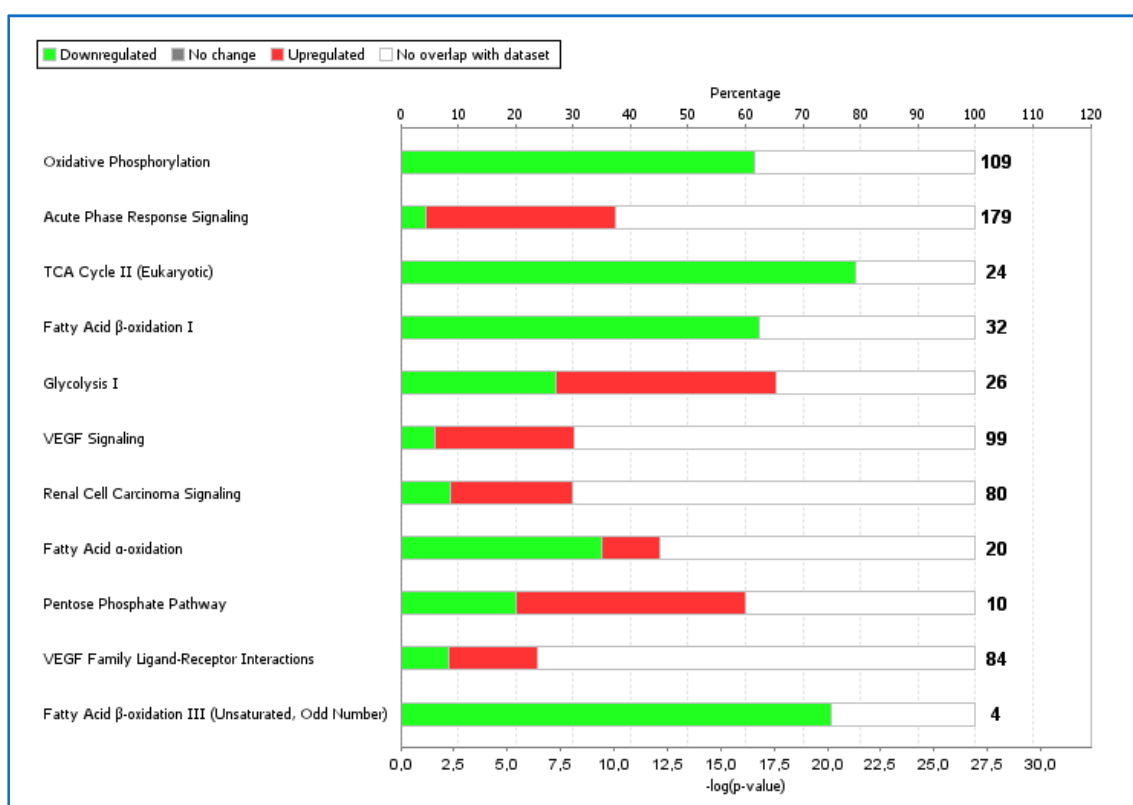
En la figura 41, gráfica de distribución y frecuencias, se aprecia la gran dispersión de resultados en esta comparación, que sugiere que el metabolismo de ambos tejidos es sustancialmente diferente.



**Figura 41.** Distribución de los ratios logarítmicos de expresión proteica en la comparación CCRcc/CCRcr en función de la abundancia de proteínas.

Al comparar las vías metabólicas, se comprobó que el metabolismo mitocondrial estaba sustancialmente más activo en CCRcr que en CCRcc. Y muchas de las proteínas que se encontraron más expresadas en CCRcr que en CCRcc estaban relacionadas con estas rutas metabólicas.

En la figura 42 se analizan las diferencias metabólicas de ambos tejidos. Se puede apreciar que en CCRcc la supresión de la respiración celular aeróbica y el enriquecimiento de la glicólisis se mantiene también en esta comparación. También se refleja un aumento en CCRcc de las vías de inflamación. La figura está sacada de los resultados del análisis funcional con la herramienta IPA de nuestros resultados.



**Figura 42.** Vías metabólicas más diferenciadas entre CCRcc y CCRcr.

La tabla 35 muestra las proteínas más relevantes de entre las que se encontraron sobre-expresadas en la comparación CCRcc y CCRcr.

## RESULTADOS

DESCRIPCIÓN	GEN	PSM	Ratio
Fatty acid-binding protein, brain	FABP7	17	11,86
Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	9	10,00
Matrilysin	MMP7	7	8,06
Gamma-enolase	ENO2	57	7,63
Tropomyosin beta chain	TPM2	86	6,30
Prolargin	PRELP	109	6,11
Lumican	LUM	145	5,99
Fibulin-5	FBLN5	41	5,91
Thrombospondin-1	THBS1	122	5,49
Periostin	POSTN	184	5,41
Thymidine phosphorylase	TYMP	38	4,73
Collagen alpha-1(V) chain	COL5A1	3	4,71
Calponin-1	CNN1	55	4,60
Protein kinase C delta-binding protein	PRKCDBP	9	4,54
Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	72	4,50
Actin, aortic smooth muscle	ACTA2	383	4,33
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2	88	4,31
Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	53	4,29
Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1	262	4,14
Myosin-11	MYH11	388	4,01
SPARC	SPARC	4	3,99
Galectin-1	LGALS1	46	3,97
Thrombospondin-2	THBS2	32	3,90
Versican core protein	VCAN	36	3,85
Haptoglobin	HP	125	3,49

**Tabla 35.** Listado de proteínas sobre-expresadas más relevantes en la comparación CCRcc vs CCRcr.

La tabla 36 muestra las proteínas más relevantes de entre las que se encontraron infra-expresadas en la comparación CCRcc y CCRcr.

DESCRIPCIÓN	GEN	PSM	1/Ratio
Barttin	BSND	9	3,70
Protein midA homolog, mitochondrial	C2orf56	3	3,70
Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	UQCRH	11	3,70
Cytochrome c oxidase subunit 1	MT-CO1	18	3,85
Uncharacterized protein KIAA1210	KIAA1210	5	3,85
Dehydrogenase/reductase SDR family member 2	DHRS2	16	3,85
Creatine kinase U-type, mitochondrial	CKMT1A	38	4,00
Solute carrier family 13 member 3	SLC13A3	4	4,00
Cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial	COX7C	7	4,55
Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	COX7A2	13	4,55
Brain protein 44-like protein	BRP44L	8	5,00

**Tabla 36.** Listado de proteínas infra-expresadas más relevantes en la comparación CCRcc vs CCRcr. Como en ocasiones anteriores, se ha invertido el resultado de la infra-expresión (1/resultado) para mejor comprensión.

Se puede observar, por un lado, que muchas de las proteínas que estaban sobre-expresadas en CCRcc con respecto a los tejidos sin tumor también se muestran muy elevadas en esta comparación: FABP7, NNMT, tropomiosina 2, enolasa 2, Periostina, fibulina 5 y haptoglobina. Estas proteínas, por tanto, parecen muy elevadas en CCRcc con respecto a cualquier otro tejido analizado.

# DISCUSIÓN





## 6. DISCUSIÓN.

La selección de las muestras a analizar en un estudio es clave para la interpretación de los resultados, tanto como la técnica empleada.

La búsqueda de biomarcadores de CCR se ha desarrollado en múltiples ámbitos: anatomopatológico<sup>107-109</sup>, genómico<sup>52,110</sup>, proteómico<sup>99</sup> y análisis de miRNA<sup>111</sup>. Las muestras empleadas han sido diferentes: tisulares<sup>98,112,113</sup>, plasmáticas<sup>79,114</sup> y de urinarias<sup>115-117</sup>, entre otras. A su vez, dentro de cada tipo de estudio, se han aplicado diferentes técnicas: IHQ<sup>108,118</sup>, espectrometría de masas<sup>98,114,117</sup>, ITRAQ<sup>99</sup> u otras muchas alternativas. Toda esta diversidad de técnicas y muestras han dado lugar a múltiples combinaciones de estudios, publicando resultados dispares, con la identificación de proteínas diferentes y en ocasiones con conclusiones contradictorias.

Pese a todo, en algunas proteínas sí que se han descrito resultados coincidentes, desarrollándose trabajos de validación sobre ellas. Incluso, algunos autores han llegado a proponer paneles diagnósticos<sup>80,119</sup>, que no han alcanzado aún la aplicación clínica<sup>1</sup>.

La investigación de biomarcadores en CCR continúa en un estado muy preliminar, con múltiples puntos de controversia. Antes de analizar la potencia diagnóstica de posibles biomarcadores, se debería aclarar si verdaderamente están relacionados con el CCR y a través de qué vías metabólicas.

En cuanto al **tipo de muestra utilizada**, nuestra hipótesis de trabajo se centra en el estudio proteómico de muestras tisulares, en vez de en orina o plasma, por las ventajas que presentan.

La orina permite la fácil detección de proteínas. Sin embargo, la principal desventaja de este tipo de muestra es que muchas de estas proteínas son extracelulares o de membrana<sup>72</sup>, pudiendo estar por tanto infrarrepresentadas otras de mayor valor clínico. Además, la concentración de proteínas en orina es muy variable.

En lo que respecta al plasma, las proteínas pueden encontrarse degradadas debido a las proteasas<sup>46</sup>, o unidas a otras proteínas transportadoras. Por otra parte, la concentración de proteínas en plasma presenta un rango dinámico amplísimo, como ya señaló Anderson<sup>101</sup>: proteínas muy abundantes (mg/ml) y otras extraordinariamente escasas (pg/ml), lo cual puede hacer que se pasen por alto proteínas de gran valor clínico.

Por el contrario, los análisis de muestras tisulares son los que han ofrecido en la literatura un mayor número de proteínas detectadas, con mayor potencial diagnóstico y con una mayor concordancia.

En el manejo de las muestras tisulares es esencial la congelación precoz para evitar su degradación. Si el procesado es adecuado, las muestras tisulares ofrecen una mayor concentración de proteínas que el resto de muestras posibles<sup>46</sup>, que además están directamente relacionadas con el tejido tumoral, y con menor factor de confusión de otras moléculas<sup>46</sup> con orígenes diversos presentes en plasma u orina.

De momento, en la literatura, los análisis tisulares son los que más proteínas han detectado, y los que mayor concordancia han presentado en sus resultados.

En lo que respecta a la **técnica empleada en el estudio**, se optó por la proteómica basada en EM, que permite un análisis directo y fiel de la función metabólica en un momento dado. Frente a ella, la genética detecta genes que pueden no ser expresados nunca<sup>92</sup>. Para evitar ese problema, se puede utilizar ARNm, pero en ese caso se pasan por alto los cambios postraduccionales<sup>120</sup>, que pueden tener un impacto importante en su función y estructura. Los resultados de un estudio proteómico muestran las diferencias en la expresión de una proteína o grupo de proteínas entre dos o más tejidos diferentes. Para interpretar la importancia de esas diferencias, se atiende también a la cantidad de proteína hallada y a la precisión con que ésta ha sido encontrada, en función del número de péptidos únicos de esa proteína encontrados.

Los trabajos proteómicos que hasta la fecha han utilizado muestras de orina<sup>117</sup> y en plasma<sup>114</sup> se han realizado antes de tener un conocimiento amplio del proteoma del CCR, lo que podría haber limitado la validez de sus resultados.

Los trabajos que se han realizado en tejido mediante técnicas de proteómica, han tenido **varias limitaciones metodológicas**.

El **primer problema** que han presentado ha sido la utilización del tejido no tumoral del órgano con CCR como tejido de referencia<sup>98,121</sup>, pero no se ha validado si ese tejido es verdaderamente un tejido sano, esto es, similar al parénquima normal de un riñón sin tumor.

La comparación del tejido de CCR con tejido sano del riñón con tumor ha sido la utilizada en los estudios de identificación de biomarcadores en muestras tisulares (proteómicos, genéticos o de cualquier otro tipo)<sup>98,110,111,121,122</sup>. La dificultad de acceso a otros tejidos sanos ha condicionado que las muestras empleadas como referencia no hayan sido validadas adecuadamente. Es por esto que en este estudio se incluyeran, además de las muestras "NT", las muestras "Control", con el objetivo de evaluar la validez de "NT" como referencia frente al tejido CCR. Estas muestras "Control" se obtuvieron de donantes cadáver de riñón para trasplante, tomando la muestra de la misma biopsia realizada en ese órgano para evaluar su viabilidad. Hasta la fecha, es la primera vez que se realiza una validación de este tejido "NT" comparándolo con otro tejido sano. Además de poder establecer su validez, esta comparación podría permitir una mejor interpretación de los resultados ya publicados con estas muestras.

El **segundo problema** ha radicado en la conservación de la muestra, lo cual es clave en los estudios proteómicos para impedir la degradación de las proteínas. La conservación inadecuada de las muestras condiciona una identificación de menor número de proteínas, y además, puede alterar la concentración de las mismas. Por este motivo, se optó por una congelación precoz de las muestras, inmediatamente después de extraídas. Teng<sup>121</sup> estudió el tejido intersticial de CCR, comparándolo con "NT", y uno de los problemas que describe de su trabajo fue que tuvo que mantener una hora caliente las muestras, lo que pudo alterar sus resultados.

El **tercer problema** de los estudios proteómicos ha sido la necesidad de realizar un análisis con cada muestra para comparar los resultados posteriormente.

Los estudios proteómicos constan básicamente de cuatro fases: preparación de la muestra, fraccionamiento de las proteínas, análisis mediante espectrometría de masas y posterior análisis bioinformático de los resultados. Cuando estos trabajos comparan dos o más tipos de tejidos, se realiza esta operación con cada uno de ellos, comparando los resultados a posteriori, entre un resultado y otro. Pero el propio procesado y análisis puede incidir en pequeños cambios de concentración de proteínas,

incluso si se analiza en dos ocasiones la misma muestra<sup>123</sup>. Esto limita la interpretación de cambios de concentración de una proteína entre dos tipos de muestra, sobre todo si la concentración de la misma es baja.

Por este motivo, se optó por utilizar la técnica iTRAQ<sup>91</sup>, que permite incluir en un único análisis hasta cuatro grupos de estudio diferentes. Las fases son comunes a cualquier análisis proteómico: inicialmente se prepara cada muestra por separado, y se fraccionan las proteínas en péptidos. Se selecciona una cantidad determinada de cada muestra, con una idéntica cantidad de proteínas. Cada una de ellas, se marca con un isótopo diferente, para después unir las en una única muestra. En esa muestra unificada, por tanto, existirá la misma cantidad de proteínas de cada uno de los grupos. El análisis mediante espectrometría de masas se realiza una única vez, limitando la heterogeneidad del proceso. Y posteriormente, se separan las proteínas por ese isótopo que las ha marcado. De esta manera, con un solo estudio se pueden comparar ratios entre varios grupos, con una mínima variabilidad debida a la técnica.

La técnica iTRAQ, por tanto, limita el número de muestras que se puede incluir en el estudio a cuatro. Los tejidos que se seleccionaron fueron los dos tipos de tejido sano ("NT" y "Control"), tejido de CCRcc y tejido de CCRc. Se optó por CCRc porque el CCR papilar es más heterogéneo<sup>53</sup>.

El **cuarto y último aspecto problemático** de los estudios proteómicos es la selección de un punto de corte a partir del cual definir una proteína como sobre o infra-expresada. No existe ninguna cifra consensuada, aunque en general se ha utilizado un punto de corte de 1,5<sup>105,114</sup>. En el presente estudio se optó por un punto de corte más selectivo, de 2, para aplicar un criterio más restrictivo y así evitar los falsos positivos en mayor medida. Además, este estudio es, hasta la fecha, el que ha sido capaz de identificar un mayor número de proteínas<sup>124 93</sup> en tejido de CCR (3500 proteínas con al menos dos péptidos únicos).

Hasta el momento, sólo hay dos estudios publicados en los que se han analizado muestras tisulares de CCR mediante iTRAQ<sup>105,125</sup>. En el primero, publicado por Siu<sup>105</sup> en 2009, se analizaron muestras de CCR comparándolas con tejido "NT". Se identificaron 937 proteínas, y utilizaron un punto de corte para seleccionar diferencias significativas de 1,5. No realizaron un análisis de las rutas metabólicas. Seleccionan varias proteínas, que también se han encontrado sobre-expresadas en nuestro estudio: vimentina, perilipina 2, nicotinamida – N- metiltransferasa (NNMT), timidin-fosforilasa y tropomiosina 1.

En el segundo trabajo, publicado por White<sup>125</sup> en 2013, se compararon muestras de CCR primario con muestras de CCR metastásico. En sus resultados destacan la asociación de galectina 1 con peor pronóstico, estando más elevada en el tejido metastásico que en el tejido de CCR.

El guion que se va a seguir en esta discusión va a seguir el de las diferentes comparaciones que se realizaron en el estudio. Inicialmente, la comparación entre los dos tejidos de referencia: "NT" frente a "Control". A continuación, la comparación de CCRcc frente a "NT" y "Control", y en tercer lugar, la comparación de CCRcc frente a CCRc. Por último se discutirán los aspectos más relevantes del estudio, así como sus fortalezas y debilidades.

La primera parte de la discusión se centra en la **comparación entre los tejidos “NT” y “Control”** se realizó con dos finalidades: establecer la validez de “NT” como tejido de referencia en los estudios de CCR, y analizar posibles cambios proteómicos y metabólicos en el tejido “NT” en relación con la presencia de un CCR en ese órgano.

Debe resaltarse el hecho de que ninguno de los tejidos de referencia es verdaderamente un tejido “sano” en el sentido más amplio del término. El tejido de riñón con CCR se obtuvo después de una nefrectomía radical o durante el procedimiento de una nefrectomía parcial, en ambos casos en un ambiente hipóxico por isquemia del órgano y a temperatura ambiente. El tejido del donante de riñón se obtuvo también un contexto particular: por un lado, tras una muerte encefálica, lo que también desencadena cambios en el metabolismo importantes<sup>126</sup>, tales como aumento de las moléculas de adhesión, invasión intersticial por linfocitos y un aumento generalizado de la actividad inflamatoria. Además, este tejido también estuvo sometido a un periodo de isquemia, si bien es cierto que esta isquemia fue diferente que en el tejido “NT”, pues se realizó en condiciones de hipotermia y con soluciones de preservación de órgano. Ambos factores modulan la respuesta a la hipoxia con el objetivo de minimizar el daño tisular producido por la isquemia – reperfusión.

La isquemia desencadena cambios en el metabolismo celular que condicionan el poder considerar estos tejidos como completamente sanos, y por tanto debe tenerse en consideración al interpretar los resultados<sup>127</sup>. En algunos trabajos al respecto se destaca, en los riñones que han experimentado un daño por isquemia, un aumento de las rutas canónicas de degradación de aminoácidos y de metabolismo lipídico, así como un aumento de la expresión de algunas proteínas como la N-fenil-acetilglicina, el piruvato, o la NNMT<sup>127</sup>.

Las diferencias entre “NT” y “Control” se deben analizar teniendo en cuenta estas particularidades: distinto tipo de isquemia y utilización de soluciones de preservación. Por el contrario, los análisis entre CCRcc y “NT” están libres de este sesgo, al ser el tipo de isquemia idéntico en ambas muestras.

El estudio de “NT” tiene un interés especial debido a la potencial multicentricidad del CCR y a la posible presencia de tumores satélites, así como a la idea cada vez más consolidada de la existencia de un microambiente tumoral<sup>128</sup>, esto es, de cambios metabólicos en los tejidos sanos en la proximidad del tumor.

La multicentricidad del CCR, o la presencia de tumores satélites, es algo estudiado en el pasado, aunque posiblemente sobre-estimado. Se ha descrito una incidencia entre el 6 y el 25% de los casos<sup>129 130 131 132</sup>. Esta potencial multicentricidad podría estar asociada a la idea de microambiente tumoral.

Al analizar los resultados obtenidos al comparar “NT” y “Control”, se comprobó que las muestras son muy similares en cuanto a su expresión proteica, a pesar de tratarse a priori de tejidos potencialmente diferentes. Esto se ilustra en las figuras 28 y 29, en las que se puede observar los ratios de expresión diferenciada de cada proteína entre ambas muestras. La dispersión de estos sigue una distribución normal muy agrupada en torno al 0, con escasas proteínas en los extremos. De hecho, sólo se identificaron 23 proteínas sobre-expresadas en el tejido “NT” frente al tejido “Control”, y 10 infra-expresadas en “NT” frente a “Control”.

Las proteínas sobre-expresadas en “NT” son por tanto proteínas que se encuentran en mayor concentración en tejido renal de un riñón con tumor que en el tejido renal en ausencia de tumor. Son escasas, pero podrían dar información acerca de lo que se ha llamado ambiente tumoral<sup>128</sup>.

Al analizar las rutas canónicas y metabólicas a las que estas proteínas sobre-expresadas estaban vinculadas, se comprobó un importante aumento de la actividad inflamatoria y de reacción de fase aguda.

Las diferencias en la actividad inflamatoria entre los tejidos “NT” y “Control” podrían explicarse a través de dos hipótesis. La primera es que el tejido “NT” verdaderamente tenga más actividad inflamatoria que el tejido “Control”. La segunda es que el tejido “Control” tenga menos inflamación que un tejido verdaderamente sano, debido a las diferencias en el tipo de isquemia y la utilización de soluciones de preservación. A nuestro juicio, los cambios desencadenados por la muerte encefálica hacen poco probable que la respuesta sea la segunda opción, y por tanto cabe suponer que el tejido “NT” tiene realmente más actividad inflamatoria que “Control”.

Estos resultados pueden hacer pensar en un ambiente inflamatorio en el tejido sano de un órgano con tumor, lo cual es muy relevante y concuerda con lo que está publicado. La relación entre inflamación y cáncer ya fue teorizada por Virchow en 1863<sup>133</sup>, y poco después Westphal y Ehrlich describieron la infiltración por mastocitos de los límites entre tejido tumoral y tejido sano<sup>128</sup>. Desde entonces, el conocimiento de la inflamación en el lugar de origen del tumor ha constatado que en el tejido sano peritumoral se acumulan células inflamatorias de todo tipo: macrófagos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas y linfocitos T<sup>134</sup>, que colaboran en el aumento de precursores endoteliales necesarios en la angiogénesis.

Es por tanto congruente que el tejido sano de un órgano con tumor presente un aumento claro de la actividad inflamatoria. Y en lo que respecta a su utilización como referencia en la búsqueda de marcadores, se deben tener en cuenta estas modificaciones, que pueden enmascarar algunos resultados. Es decir, si se comparan muestras de CCR frente a muestras “NT”, pueden no apreciarse las alteraciones de las vías inflamatorias que tenga el tejido tumoral, ya que al compararlas con un tejido que también tiene enriquecidas esas rutas, pueden pasar desapercibidas.

El análisis de la expresión de haptoglobina ilustra perfectamente lo anteriormente expuesto. La haptoglobina es una proteína del espacio extracelular<sup>135</sup> que forma parte de la reacción de fase aguda y de las rutas de inflamación, y parece tener un papel en la liberación de hierro para el tumor en crecimiento<sup>136</sup>. De hecho, se ha vinculado a varios tipos de tumores, fundamentalmente el de ovario<sup>136</sup>. Está también relacionada con inmunosupresión de pacientes con cáncer, así como con la angiogénesis<sup>135</sup>. El mecanismo a través del cual la haptoglobina puede inhibir el sistema inmune no está claro, pero la teoría más aceptada es que es clave la división de esta proteína en sus dos subunidades: haptoglobina  $\alpha$  y haptoglobina  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  parece interferir con el sistema inmune por su parecido estructural y funcional con las inmunoglobulinas. Se estableció por primera vez esta relación al estudiar la inmunosupresión producida en la carcinomatosis peritoneal de pacientes con cáncer de ovario, detectando un factor inmunosupresor de la respuesta inmune celular potente, que fue identificado como haptoglobina  $\alpha$ <sup>137 138</sup>. Además, la haptoglobina se ha encontrado elevada en pacientes con CCRcc, tanto en sangre<sup>114</sup> como en orina<sup>117</sup>; es decir, que se ha propuesto como posible marcador tumoral del CCR.

En el presente estudio, la haptoglobina estaba elevada en el tejido tumoral, con un ratio de sobre-expresión de 4.5 veces, en la comparación CCRcc frente a “Control”; es decir, la haptoglobina era cuatro veces más abundante en CCRcc que en el tejido “Control”. Sin embargo, en la comparación CCRcc frente a “NT” no alcanzó la significación estadística, con una ratio de 1.4. Es decir: si se hubiera utilizado el tejido “NT” como único tejido de comparación, el resultado de haptoglobina no hubiera sido significativo y

se hubiera pasado por alto que se encuentra muy sobre-expresada en el tejido CCRcc, al estar también sobre-expresada en el tejido “NT”.

La sobre-expresión de haptoglobina en tejido CCR es muy relevante: por un lado, el aumento de haptoglobina en “NT” es congruente con los cambios que se han descrito previamente en el ambiente tumoral, en los que los mecanismos de inflamación se han encontrado enriquecidos; y por otro, puede tener un potencial valor como marcador de CCR.

De forma análoga a lo ilustrado por haptoglobina, el utilizar tejido “NT” habría hecho obviar el resultado de sobre-expresión de las apolipoproteínas A-1 y A2 en el tejido de CCRcc. Ambas son proteínas del espacio extracelular relacionadas con el metabolismo lipídico, en concreto con el transporte del colesterol, que participan en la respuesta inflamatoria aguda<sup>135</sup>.

Las dos apolipoproteínas tuvieron resultados significativos en las comparaciones CCRcc frente a “Control” y “NT” frente a “Control”, pero en cambio no resultó significativa la comparación CCRcc frente a “NT”, al estar sobre-expresadas también en este tejido.

La elevación de las apolipoproteínas A-1 y A2 en tejido CCRcc y en “NT” puede deberse a la actividad inflamatoria aumentada en estos tejidos. Pero también se podría explicar por su relación con el CCR, dado que hay trabajos que describen la elevación de estas proteínas en CCR<sup>114</sup>. Su aumento en “NT” frente a “Control” podría por tanto deberse a su papel inflamatorio o a su elevación en contexto de CCR, y que el tejido sano en ese ambiente tumoral ya presente un cambio “pre-tumoral” en esa dirección.

El resto de proteínas sobre-expresadas en “NT” frente a “Control” también tienen una relación directa con la actividad inflamatoria y la respuesta inmune: el inhibidor de la cadena pesada de inter-alfa tripsina (ITIH4), la alfa-1-ácida glicoproteína 2 (ORM2) y factor B del complemento (CFB) tienen una gran importancia en estas vías.

En el caso de las 10 proteínas infra-expresadas en el tejido “NT” frente al grupo “Control” y que se describen en la Tabla 35, llama la atención que 6 son cadenas del colágeno. No se puede establecer una hipótesis a este respecto, que además no se ha estudiado en otros trabajos previos.

La **segunda parte** de esta discusión se centra en la **comparación entre el tejido de CCRcc frente a los dos de referencia, “NT” y “Control”**.

Este análisis mostró que CCRcc es sustancialmente distinto a los dos tejidos de referencia en su actividad metabólica y proteica. Además, se comprobó que las diferencias entre este tejido frente a “NT” son muy similares a las diferencias frente a “Control”, como expresión de que los tejidos “sanos” son muy parecidos entre sí, si se deja a un lado la actividad infamatoria. La similitud entre ambas comparaciones se ilustra en la figura 36 de resultados.

Como expresión de lo diferente que es CCRcc de los otros dos tejidos, el número de proteínas sobre-expresadas e infra-expresadas fue elevado: 232 y 333 respectivamente. Y debido a la similitud entre los dos tejidos de referencia, la mayoría de proteínas elevadas en la comparación CCRcc frente a “NT” también lo estaban frente a “Control”, ocurriendo lo mismo con las disminuidas. De hecho, no hubo ninguna proteína del estudio que estuviera elevada en CCRcc frente a uno de los grupos “sanos”, y disminuida con respecto al otro.



Al analizar las rutas metabólicas alteradas en el tejido CCRcc, mediante el programa IPA, se apreció que existían diferencias sustanciales entre este tejido y los de referencia. Y como expresión de que “NT” y “Control” son similares, las diferencias fueron las mismas frente a estos dos tejidos, si se exceptúa la actividad inflamatoria.

Las rutas metabólicas más enriquecidas fueron las de movimiento y comunicación celular, así como las de la glicólisis. Por el contrario, las rutas metabólicas más suprimidas fueron las relacionadas con el metabolismo lipídico y de aminoácidos, y muy especialmente las rutas del metabolismo mitocondrial y de la respiración celular. De hecho, la práctica totalidad de las proteínas de esta ruta se hallaron disminuidas.

En este apartado de la discusión, se van a comentar las diferencias más marcadas en el metabolismo y en las proteínas implicadas entre CCRcc y los tejidos de referencia. En primer lugar se hablará de las modificaciones debidas a la hipoxia, mediadas por HIF1- $\alpha$ , que se centran en la glicólisis y el ciclo de Krebs. A continuación, y en relación también con la actividad del factor inducible de hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) estimulando VEGF, los cambios en la matriz extracelular en el CCRcc, dentro del proceso llamado transición epitelio-mesenquimal (ETM en sus siglas en inglés). En tercer lugar, las modificaciones en el metabolismo lipídico. Y por último se comentarán otras proteínas que, sin formar parte de estos metabolismos alterados, tienen diferencias marcadas entre ellas.

La primera modificación metabólica que va a discutirse es la relacionada con la hipoxia y la activación HIF-1 $\alpha$ , cuyo papel en la patogénesis del CCR ha sido bien establecida en la literatura<sup>139</sup>.

En condiciones normales de aporte de oxígeno las células producen energía a través de los ciclos de respiración celular, que se desarrollan en la mitocondria. En cambio, en condiciones de hipoxia la producción de energía se lleva a cabo a través de la vía de la glicólisis anaeróbica, con la formación final de piruvato.

En la patogénesis del CCRcc, pese a la ausencia de hipoxia, se ha identificado un enriquecimiento de la vía de la glicólisis, así como la supresión de los ciclos de respiración celular. Esta circunstancia se conoce como “efecto Warburg” o de la glicólisis aeróbica (al desencadenarse la ruta de la glicólisis en un ambiente que no está sometido a condiciones de hipoxia)<sup>139</sup>.

Este ambiente de pseudo-hipoxia es responsable así mismo de la neoangiogénesis característica del CCRcc, sobre la cual se han desarrollado dianas terapéuticas<sup>45,46</sup>. Está suficientemente comprobado que la expresión de HIF-1 $\alpha$  se acompaña de un aumento de VEGF, el cual estimula a su vez la neoangiogénesis.

Nuestros resultados contribuyen a confirmar, en cierto modo, este conocimiento: el análisis proteómico puso de manifiesto la disminución del metabolismo mitocondrial y un aumento simultáneo de la vía de la glicólisis como expresión de un ambiente “pseudohipóxico” en condiciones de oxigenación normal.

El análisis metabólico de nuestro estudio demostró que 17 de las 26 proteínas de la vía de la glicólisis estaban sobre-expresadas en CCRcc frente a los tejidos de referencia. Y de forma paralela, 19 de las 24 proteínas de la vía de la respiración celular se hallaron infra-expresadas. Estos resultados son concordantes con lo que previamente se ha publicado al respecto en el CCRcc<sup>140,141</sup>.

Fijando la atención en la glicólisis, las diferencias entre CCRcc y los tejidos de referencia mostraron tres perfiles distintos. Por un lado, aumento con ratio mayor de 2 de enolasa 2, fosfofructokinasa 6, aldolasa y piruvatokinasa. Por otro, elevación con ratios entre 1,5 y 2 de triosefosfato isomerasa, fosfogliceratokinasa y fosfoglucomutasa. Y en tercer lugar, proteínas con ratios menores a 1,5 entre

CCRcc y los otros tejidos: hexokinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa y gliceraldehid 3 fosfato dehidrogenasa (GAPDH).

Sanders<sup>139</sup> realizó un mapa genético del CCRcc, sobre todo centrado en la vía de la glicólisis aeróbica, de la respiración celular y la gluconeogenesis. El análisis de la vía de la glicólisis ofreció resultados totalmente superponibles a los nuestros: elevación significativa de fosfofructokinasa 6, aldolasa, enolasa y piruvatoquinasa, pero no significativa de triosefosfato isomerasa, fosfogliceratokinasa y fosfoglucomutasa.

Rengui<sup>142</sup> analizó una base de datos genética de 100 pacientes con CCRcc, estudiando en concreto de enolasa 2 y glicin-deshidrogenasa (GLDC), una proteína mitocondrial ligada a la respiración celular aeróbica. Al igual que en nuestro estudio, los autores comprobaron que mientras enolasa 2 aparecía especialmente elevada en CCRcc, GLDC se encontró suprimida de forma significativa, asociando esta disminución a un peor pronóstico de la enfermedad.

Por otro lado, Kaneko<sup>119</sup> estudió la enolasa 2 en plasma periférico de pacientes con CCR mediante técnicas de proteómica. Comprobó que enolasa 2 estaba elevada en plasma en los pacientes con CCRcc, y que disminuía significativamente tras la cirugía, defendiendo su valor en el seguimiento del CCR ya tratado.

Así mismo, se analizó el papel de galectina 1 y galectina 3, unas proteínas vinculadas a la apoptosis y la proliferación y diferenciación celular<sup>135</sup> que han sido vinculadas en múltiples trabajos al CCR<sup>108,110</sup>. Ambas se encontraron significativamente elevadas en plasma periférico de pacientes con CCR. Completaron su estudio analizando el potencial valor diagnóstico de su combinación, que ofreció una sensibilidad del 47% con una especificidad del 98%, proponiendo su utilización como marcador diagnóstico de CCR.

La elevación de galectina 1 en CCR se apoya en otros trabajos<sup>110 108</sup>, mientras que el papel de galectina 3 no está claramente establecido<sup>108</sup>.

En nuestro estudio, enolasa 2 se encontró sobre-expresada con ratio de 5,7 en las dos comparaciones (CCRcc frente a "Control" y frente a "NT"). También galectina 1 estaba muy sobre-expresada, con ratios de 3.7 y 3.2 respectivamente. En cambio, galectina 3 no alcanzó diferencias significativas (ratio de 1,4).

Por tanto, cabría plantear que enolasa 2 y galectina 1 podrían ser marcadores potenciales en el diagnóstico de CCRcc, mientras que el papel de galectina 3 es más controvertido.

De forma paralela al aumento de la glicólisis se produce, en el llamado efecto Warburg, una inhibición del metabolismo oxidativo mitocondrial. La disminución generalizada de este metabolismo se ilustra en la infra-expresión de D-amino-oxidasa y de 4-hidroxi-2-oxoglutarato aldolasa mitocondrial (HOGA1), que se encontraron especialmente infra-expresadas.

En el caso de D-amino-oxidasa, además de su relación con la función oxidativa, cabe destacar que se ha estudiado como gen supresor tumoral<sup>143</sup>. Ambos elementos (el metabolismo oxidativo y su papel supresor tumoral) podría explicar nuestros resultados: sobre-expresión en CCRcc frente a "Control" y "NT" con ratios de 5.26 y 6.25 respectivamente.

La segunda modificación metabólica que se va a analizar es la alteración en las rutas de movimiento, comunicación y adhesión celular, en el contexto de la remodelación de la matriz extracelular. Esto podría



responder a que el desarrollo tumoral obliga a una reestructuración tisular completa: es preciso la destrucción de la matriz extracelular para la formación de una nueva, así como la lesión de la membrana basal en el camino de diseminación tumoral<sup>113</sup>. El proceso de remodelado tisular y reestructuración se traduce en un aumento de las proteínas relacionadas con estos procesos ya descrita en la literatura<sup>113,144</sup>, que coincide con nuestros resultados. Estas vías metabólicas están íntimamente ligadas al desarrollo de neoangiogénesis<sup>98,135</sup>.

La reestructuración del tejido tumoral desencadena el proceso conocido como EMT<sup>145</sup>, mediante el que las células epiteliales pierden su polaridad y desarrollan características mesenquimales, entre las que se incluye la motilidad. Como consecuencia de esta modificación celular, se pierde la impermeabilidad epitelial favoreciendo la migración celular. La EMT es un proceso fundamental en el desarrollo tumoral y la capacidad metastásica de un tumor.

Las proteínas que participan en estos procesos se encontraron en nuestro trabajo especialmente elevadas, destacando periostina, metaloproteasa 9, fibronectina, proteína 4 asociada a microfibrillas (MFAP4) y fibulina 5.

Inicialmente tiene lugar la destrucción del tejido intersticial llevada a cabo por las metaloproteasas, de entre las que destaca la metaloproteasa 9, y que se han vinculado a muchos tipos de tumor<sup>145,146</sup>. En concreto, con respecto a CCRcc, el aumento de metaloproteasa 9 se ha relacionado con peor pronóstico<sup>147</sup>. En nuestro trabajo, metaloproteasa 9 se encontró elevada en tejido CCRcc con respecto a los tejidos “NT” y “Control” con ratios de 2,7 y 3,5 respectivamente.

La actividad de metaloproteasa 9 se estimula a través de periostina<sup>144</sup>, también relacionada con CCR previamente<sup>98,113,144,148</sup>. Castronovo<sup>98</sup>, mediante técnicas de proteómica cuantitativa, encontró muy elevadas las proteínas de producción de matriz extracelular de forma análoga a nuestro trabajo (periostina, fibronectina, trombospondinas 1 y 2 y versican). La más sobre-expresada en sus resultados fue periostina.

Bakhtyar<sup>113</sup> analizó la expresión de periostina en muestras de tejido procedente de CCR local y metastásico, comprobando que en ambos casos estaba muy elevada. Utilizando técnicas de IHQ, concluyeron que el papel de periostina es clave en la adhesión y migración celular del CCRcc.

En nuestro estudio, periostina se encontró elevada con ratios de 5,1 y 6 frente a “Control” y “NT” respectivamente, en concordancia con los datos de la literatura referidos. Por tanto, el papel de periostina está claramente definido en los procesos asociados al CCRcc.

Otras proteínas relevantes en la producción de matriz extracelular son fibronectina, fibulina 5, MFAP4 y versican.

Existen estudios previos que analizan el papel de fibronectina en CCRcc<sup>98,122</sup>. Cabe destacar la publicación de Waalkes<sup>122</sup>, que analizó muestras tisulares de diferentes subtipos de CCR mediante ARNm, comparadas con “NT”. En sus resultados, fibronectina estuvo elevada en todos los subtipos de CCR, salvo el CCRp. En este subtipo en concreto sólo se elevaba en fases avanzadas. En este sentido, su hipótesis es que fibronectina es un marcador de mal pronóstico, al estar vinculada a mayor capacidad de invasión local y metástasis. Es decir, que la remodelación del espacio extra-celular se produce con más intensidad en los tumores de peor pronóstico.

Es reseñable que en nuestro trabajo la fibronectina se halló elevada no sólo en CCRcc con respecto a “NT” y “Control”, como reflejo de su papel oncológico, sino también significativamente en la comparación

CCRcc con respecto a CCRcr, en posible relación con el papel pronóstico que podría tener la desestructuración de la matriz extracelular.

El papel de fibulina-5 en cuanto al cáncer es controvertido, y parece que su función difiere de un tipo de tumor a otro, pudiendo comportarse como inductor o supresor del mismo<sup>149,150</sup>. En concreto, algunos trabajos han estudiado el papel de fibulina-5 como inhibidor de VEGF y de la angiogénesis<sup>149</sup>, aunque por otra parte se ha descrito elevado en fases avanzadas de CCRcc<sup>150</sup>. En nuestro estudio, fibulina 5 estuvo sobre-expresada con ratios de 5 y 6.7 con respecto a “Control” y “NT”, lo que sugiere que fibulina 5 está sobre-expresada en CCRcc, o que podría estarlo en los subtipos más agresivos de CCR.

Algo similar sucede con las trombospondinas 1 y 2. Ambas proteínas están relacionadas con la migración endotelial y la angiogénesis<sup>135</sup>. Pero su relación con la angiogénesis es controvertido: se postula que el papel de trombospondina es pleiotrópico, con funciones diferentes e incluso opuestas en según qué células, qué tejidos y en qué circunstancia, pudiendo promover o inhibir la angiogénesis<sup>151 152</sup>. En cuanto a su presencia en tejido de CCR, cabe citar el estudio de Teng<sup>121</sup> en fluido intestinal de CCR: encontró elevadas trombospondina 1, además de NNMT, galectina y enolasa 2. Además, comprobó que trombospodina 1 también estaba elevada en el plasma de pacientes con CCR.

En nuestro estudio, tanto trombospondina 1 como trombospondina 2 se encontraron elevadas en CCRcc. Trombospondina 1 con ratios de 4.1 y 4 con respecto a “Control” y “NT”, y trombospondina 2 con ratios de 3.8 y 4.1 en las mismas comparaciones.

Se puede suponer que, pese a cierta controversia en relación con su papel en la angiogénesis, trombospondina 1 está elevada en CCRcc y podría llegar a formar parte de un posible panel de biomarcadores.

En cuanto a MFAP4, tiene una íntima relación con las proteínas recientemente comentadas<sup>153</sup>, y aunque no ha sido estudiada previamente en el contexto del CCR, nuestros resultados son muy llamativos: presentaba una sobre-expresión en CCR frente a los tejidos de referencia de 5.62 y 6.49 (“Control” y “NT”).

Finalmente, en relación con la matriz extracelular, se destacan dos proteínas: transgelina 1 y transgelina 2. Son proteínas del espacio extracelular, con una función no claramente conocida<sup>135</sup>, pero fundamentales en la acción de los fibroblastos. La escasa información respecto a estas proteínas y el CCR se extrae de un estudio de la relación de transgelina 2 y de los miRNA miR1 y miR-133a con el CCR<sup>111</sup>. En este trabajo comprobaron que en los pacientes con CCR, transgelina 2 se elevaba mientras descendían esos miRNA.

En nuestro trabajo, transgelina 2 estaba sobre-expresada en CCRcc con respecto a los tejidos de referencia (ratios de 2,2 y 2,3 frente a “Control” y “NT” respectivamente), pero menos que transgelina-1 (ratios de 5 y 4,94 respectivamente).

La tercera modificación metabólica que va a analizarse es la alteración del metabolismo lipídico. A la luz de los datos de la literatura, el proceso de carcinogénesis produce un aumento del consumo energético, que suele condicionar cambios en el metabolismo lipídico<sup>154</sup>. En este sentido, las células tumorales

modifican su funcionamiento de acuerdo con una mayor necesidad energética, estando descrito un incremento del aporte lipídico exógeno, así como una disminución de la producción endógena de ácidos grasos<sup>155</sup>. En concordancia con este último aspecto, los resultados de nuestro estudio muestran que la actividad metabólica lipídica está disminuida, especialmente la referida a los ácidos grasos.

Zheng<sup>156</sup>, tras analizar mediante ITRAQ e IHQ 112 pacientes con CCRcc y comparando con “NT” como tejido de referencia, pusieron de manifiesto una franca disminución del metabolismo lipídico. Destacaron dos proteínas especialmente: proteína plegadora de ácidos grasos 1 (FABP1) y el cofactor NHE-RF-regulador del intercambio de sodio (PDZK1). Analizaron la capacidad de diferenciar tejido con CCR de tejido no tumoral en función de la infra-expresión de estas proteínas: sus resultados muestran un área bajo la curva de 0,82 para FABP1 y de 0,94 para PDZK1. Además, vincularon la infra-expresión de PDZK1 como un factor pronóstico independiente. En nuestro estudio, ambas proteínas se encontraron infra-expresadas en comparación con los tejidos de referencia “Control” y “NT”, en concordancia con el trabajo citado. En el caso de FABP1, con ratios de 5,26 y 6,25. En el caso de PDZK1, con ratios de 3 y 3,44.

En este mismo sentido, Pandey<sup>140</sup> analizó la base de datos Genomic Data Commons, que recoge información genética de diferentes tumores. Estudiaron específicamente el CCR comparándolo con “NT”. Encontraron disminuido el metabolismo lipídico, incluyendo la degradación de ácidos grasos, las hormonas esteroideas y el transporte lipídico. La síntesis de ácidos grasos sólo estaba elevada en CCRp y CCRcr, pero no en CCRcc.

Pese a la disminución generalizada del metabolismo lipídico en el CCR que parece dependerse de los datos publicados, hay ciertas proteínas que, pese a pertenecer a estas vías metabólicas, parecen sobre-expresadas: proteína plegadora de ácidos grasos 7 (FABP7) y perilipina 2. Van der Mijn<sup>157</sup> desarrolló un modelo murino de CCR para estudiar el efecto Warburg. Según sus resultados, el efecto Warburg está relacionado con la disminución del metabolismo lipídico. Los autores sugieren que, en esta modificación del metabolismo celular y pese a incrementarse el almacenamiento lipídico, se inhibe la degradación de lípidos y también su biosíntesis. Señalan no obstante que, mediado por HIF-1 $\alpha$ , se incrementan dos proteínas: FABP7 (relacionada con el transporte lipídico) y perilipina 2 (vinculada al almacenamiento lipídico).

La relación del CCR con FABP7 se ha confirmado en otros estudios, y además se ha relacionado con un peor pronóstico de la enfermedad<sup>107,155,158</sup>. Zhou<sup>158</sup> estudió la base de datos genética de 60 pacientes con CCRcc, comparando con “NT”, y comprobó que el gen más alterado en esos pacientes fue FABP7. Confirmó este hallazgo mediante IHQ, y lo asoció también a peor pronóstico. Sugiere que, además de su función de transporte lipídico, FABP7 podría promover el crecimiento celular mediante la activación de ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) y STAT3 (*selective signal transducer and activator of transcription*).

En cuanto a perilipina 2, su vinculación con CCR también se apoya en múltiples estudios<sup>115,159,160</sup>. Hu<sup>115</sup> detectó una elevación de perilipina 2 en orina en pacientes con CCRcc, con una concentración proporcional al tamaño de la lesión. En ese mismo sentido, Song<sup>116</sup> relacionó los niveles de aquaporina 1 y perilipina 2 en orina de pacientes con CCR con los resultados anatomopatológicos de la biopsia. Con la combinación de ambas proteínas, consiguieron identificar como malignas todas las lesiones CCRcc y CCRp. En cambio, 2 pacientes con CCRcr fueron clasificados como no tumorales.

En nuestro estudio, FABP7 se encontró sobre-expresado en CCRcc con respecto a “Control” y “NT” con ratios de 9 y 7,6 respectivamente. Perilipina 2, con ratios de 4.89 y 4,41, y cabe destacar que no estaba

sobre-elevada en CCRc frente a los tejidos de referencia (lo que apoya los resultados de Song<sup>116</sup>). No se consiguió detectar aquaporina 1.

A la vista de lo anteriormente expuesto, se podría concluir que el metabolismo lipídico está disminuido de forma global en CCR, si bien destaca la sobre-expresión de dos proteínas: FABP7 y perilipina 2. En cuanto a la identificación de potenciales marcadores de CCR, la sobre-expresión de FABP7 y perilipina 2, y la infra-expresión de FABP1 y PDZK1, parecerían elementos prometedores.

La cuarta parte del análisis de la comparación entre CCRcc y los tejidos de referencia se centra en proteínas reseñables independientemente de su ciclo metabólico, debido a su resultado cuantitativamente llamativo en nuestro estudio, así como a su asociación previamente publicada con CCR: NNMT, tropomiosina 1 y 2 y calponina.

En lo que respecta a **NNMT**, se trata de una proteína citoplasmática implicada en la biotransformación y detoxificación de los compuestos xenobióticos. En concreto, es la proteína que regula los niveles de nicotinamida o vitamina B3 en el interior de la célula, la cual participa en múltiples procesos biológicos, tales como el aporte energético, la resistencia celular al estrés y la longevidad. NNMT se ha asociado a otros tumores sólidos, pero está especialmente vinculada al CCR<sup>118,159,161-163</sup>.

Cabe destacar que Kim estudió NNMT, conjuntamente con plastina 2 y la proteína 1 de células no metastásicas (NM23A), en plasma de pacientes con CCR. Las tres proteínas estuvieron elevadas en el plasma de estos pacientes. Analizó la capacidad diagnóstica de NNMT por separado, frente a la combinación de las tres proteínas. Según sus resultados, el ABC de NNMT fue de 0.91, y de la combinación de las tres, de 0.93 (con VPP de 87.2% y VPN de 97%). A pesar de tan prometedores resultados, éstos no han sido validados posteriormente.

En nuestro estudio, NNMT se encontró sobre-expresada en CCRcc frente a "Control" y "NT" con ratios de 3.49 y 4.59 respectivamente. Plastina 2 con ratios de 2.92 y 3.95. No se consiguió identificar NM23A.

Por tanto, NNMT podría formar parte de un eventual panel de marcadores diagnósticos de CCRcc.

Las **tropomiosinas** son proteínas citoplasmáticas que participan en la formación de citoesqueleto<sup>135</sup>. La tropomiosina tiene múltiples isoformas derivadas de la maduración de 4 genes<sup>135</sup>. Se ha descrito la infra-expresión de estas proteínas en los tumores sólidos<sup>164</sup>, con excepciones como el cáncer de ovario<sup>153</sup>. La información de la relación de tropomiosina con el CCR es escasa, a través de un análisis de muestras de tejido con CCRcc comparándolas con "NT"<sup>165</sup>. En los resultados de este trabajo se comprobó que tropomiosina 1 estaba especialmente suprimida en tejido CCRcc, y que tenía una relación proporcional al tamaño tumoral y al grado de Fühman. En cambio, no encontraron alteraciones del resto de tropomiosinas.

Nuestros resultados son contrapuestos a lo publicado en ese estudio<sup>165</sup>, ya que se comprobó que tropomiosina 1 y 2 estaban elevadas en CCRcc frente a los tejidos de referencia, sin alteraciones en el resto de isoformas. Es decir, que nuestro estudio mantiene la controversia sobre la utilidad de las tropomiosinas como potenciales marcadores del CCR.

En cuanto a **calponina 1**, se trata de una proteína citoplasmática del citoesqueleto, al igual que las tropomiosinas<sup>135</sup>. Además de su función principal, se ha propuesto que tiene un papel como moduladora de la angiogénesis<sup>166,167</sup>, de forma que se ha encontrado disminuida en los casos de formación de vasos aberrantes e inmaduros. No se ha estudiado su presencia en tejido de CCR con anterioridad. No

obstante, cabría suponer que, dada su relación inversa con la neonagiogénesis, estaría disminuida en CCRcc. Por el contrario, en nuestros resultados calponina-1 se encontró sobre-expresada de forma significativa en CCRcc, con ratios de 4,75 y 5,37 respecto a los tejidos “Control” y “NT”.

El último comentario al respecto de las proteínas analizadas se centrará en la familia de las proteínas transportadoras de solutos (SLC). Se trata de un grupo de más de 400 proteínas de membrana, incluida la mitocondrial<sup>135</sup>. Hasta la fecha, sólo existe un trabajo que haya estudiado esta familia en relación con el CCRcc<sup>168</sup>, en 509 pacientes con ese diagnóstico, y con tejido “NT” como referencia. Encontraron 26 genes de esta familia infra-expresados y 23 sobre-expresados. En nuestro trabajo se identificaron 39 proteínas de este grupo, 23 de las cuales estaban infra-expresadas. De ellas, destacaron cuantitativamente SLC13A3, SLC5A12, SLC5A10 y SLC5A2. Sólo 1 proteína de este grupo se encontró sobre-expresada en CCRcc frente a “Control” y “NT”. El papel diagnóstico de la infra-expresión de estas proteínas es todavía incierto.

**La tercera parte de la discusión se centra en analizar las diferencias entre CCRcc y CCRcr.**

La identificación de un panel de biomarcadores que permita diferenciar CCRcc de CCRcr tendría interés en el sentido de ayudar a orientar la decisión terapéutica, atendiendo a la diferente agresividad que presentan estos tumores. No existe ninguno validado hasta la fecha con esta utilidad. Wang<sup>169</sup> estudió las diferencias de la variante granular de CCRcc en muestras de parafina mediante técnicas de IHQ, destacando dos proteínas útiles para su diferenciación: tirosín-proteín kinasa (KIT) y el regulador de la condensación cromosomal (RCC). Lamentablemente, en nuestro estudio no se detectó KIT, y RCC no mostró diferencias significativas entre ambos tumores. Pandey<sup>140</sup> estudió las diferencias metabólicas entre ambos tumores, mostrando diferencias en la glicólisis, la respiración celular y la actividad inflamatoria.

Nuestros resultados marcan diferencias importantes entre ambos tipos de tumores, encontrando 238 proteínas sobre-expresadas en CCRcc frente a CCRcr y 358 infra-expresadas. En cuanto a las **vías metabólicas**, las diferencias fueron marcadas. En relación a la producción de energía celular, el efecto Warburg se encontró mucho menos presente en el CCRcr. Esto es, la glicólisis no estaba tan elevada ni la respiración celular tan disminuida en CCRcr como en CCRcc. De hecho, 19 de las 24 proteínas del ciclo de Krebs se encontraron infra-expresadas en CCRcc frente a CCRcr.

El metabolismo de remodelado y producción de matriz extracelular también mostró diferencias significativas: el enriquecimiento del mismo fue mucho menor en CCRcr que en CCRcc.

Por otro lado, se pudo comprobar que la actividad inflamatoria fue más marcada en el CCRcc.

Centrando la atención en las **proteínas elevadas en CCRcc frente a CCRcr**, se pudo comprobar que la mayoría de las mismas también lo estaban en CCRcc frente a los tejidos sanos: enolasa 2, tropomiosina 2, periostina, haptoglobina, FABP7 y NNMT, como expresión de las diferencias metabólicas entre ambos tumores.

Es interesante destacar que algunas de las proteínas que se han propuesto como marcadores de mal pronóstico del CCR en publicaciones previas, como fibronectina, NNMT, FABP7 y fibulina 5<sup>119,122,151,161</sup>, se han encontrado en nuestro trabajo infra-expresadas en CCRcr con respecto a CCRcc. Este hecho podría explicarse a través de dos hipótesis: podrían ser realmente marcadores de mal pronóstico, por lo que

estarían disminuidas en los tumores con mejor comportamiento (como el CCRcr). Pero también podrían haber sido erróneamente identificadas como marcadores de mal pronóstico precisamente por estar infra-expresadas en un tumor con comportamiento más favorable.

A la hora de **identificar posibles marcadores que diferenciaran CCRcc de CCRcr**, se identificaron en nuestro trabajo dos proteínas prometedoras: NNMT y el transportador de piruvato mitocondrial (BRP44L o MPC1).

BRP44L está vinculada al ciclo aeróbico<sup>135</sup>, aunque también se ha postulado que tenga una función relacionada con las metaloproteasas 7 y 9<sup>141</sup>, además de propuesto como marcador de buen pronóstico en CCR<sup>141</sup>.

NNMT se encontró especialmente elevada en CCRcc (frente a los tejidos de referencia "Control" y "NT", así como frente a CCRcr), y especialmente disminuida en CCRcr (frente a los tejidos "sanos").

BRP44L, por el contrario, mostró estar especialmente elevada en CCRcr (frente a CCRcc y frente a los tejidos de referencia), y especialmente disminuida en CCRcc (frente a los tejidos "sanos").

Por tanto, a la luz de nuestros resultados, las proteínas más prometedoras como marcadores diferenciales de CCRcc frente a CCRcr serían NNMT y BRP44L.

La **última parte de la discusión** se centrará en las fortalezas y debilidades de nuestro trabajo, así como en los resultados más relevantes.

En relación con las **limitaciones del estudio**, se deben hacer varias consideraciones. En primer lugar, el estudio no está diseñado para detectar marcadores pronósticos ni de respuesta a tratamiento, y sólo puede aportar información sobre marcadores diagnósticos en tejido, al no haber estudiado muestras plasmáticas o de orina.

Además, el tipo de isquemia fue diferente entre las muestras obtenidas durante cirugía de tumores renales (tejidos "NT", CCRcc y CCRcr) y las extraídas para el tejido "Control". Éstas últimas se obtuvieron en contexto de isquemia fría, con utilización de soluciones de preservación. Por otro lado, los cambios producidos durante la muerte encefálica desencadenan un aumento de la actividad inflamatoria, que estarían presentes en el tejido "Control". Pero en nuestros resultados se encontró como hallazgo más relevante en la comparación entre "NT" y "Control" una activación de las rutas de inflamación en "NT". A nuestro juicio, el resultado es concluyente, pues sería de esperar que el tejido "Control" tuviera más actividad inflamatoria que un tejido verdaderamente sano.

Otra limitación de nuestro estudio es que no se ha realizado una validación de los resultados en muestras de parafina de una colección de pacientes con CCRcc.

En cuanto a las **fortalezas de este trabajo** cabe destacar que se trata del estudio que ha identificado un mayor número de proteínas en tejido de CCRcc. Este hecho es expresión de que las muestras fueron conservadas de forma adecuada, y de que el análisis experimental fue correcto. Esto permitió establecer un punto de corte más selectivo que el habitual, seleccionando proteínas que estuvieran sobre-expresadas al menos con un ratio de 2 entre los tejidos comparados.

Por otra parte, es el primer estudio que ha analizado la validez de las muestras "NT" como tejido de referencia en los estudios de detección de marcadores en CCRcc. Y esto tiene interés no sólo para



establecer si se trata de un adecuado tejido de comparación, sino que podría ofrecer información sobre los cambios producidos en el microambiente del tejido cercano a un tumor.

Por último, cabe destacar que el número de muestras incluidas es elevado considerando el diseño del estudio.

Los **resultados más relevantes del trabajo** se centran en las modificaciones del tejido “NT”, en las diferencias metabólicas y proteicas del tejido CCRcc frente a los tejidos de referencia y al tejido CCRcc.

El tejido “NT” presenta mayor actividad de las rutas de inflamación y reacción de fase aguda que el tejido “Control”, con aumento de las proteínas de estas rutas metabólicas. Estos cambios podrían ser expresión de modificaciones en el ambiente del tejido sano en un órgano con tumor.

En cuanto a las modificaciones del tejido CCRcc, nuestros resultados muestran que presenta un cambio significativo en la forma de producción de energía celular, que se realiza básicamente a través de la glicólisis aeróbica, disminuyendo muy significativamente el metabolismo mitocondrial. Esta modificación, en cambio, es mucho menos patente en CCRcc.

Además, en el tejido CCRcc se evidencia una importante actividad de remodelación de la matriz extracelular en relación con la transición epitelio-mesenquimal, con aumento de proteínas como galectina, metaloproteasa 9, periostina, fibronectina y trombospondinas 1 y 2.

Por último, el tejido CCRcc presenta una disminución marcada del metabolismo lipídico, expresada en una menor presencia de FABP1. Pese a esto, dos proteínas de estos ciclos metabólicos están muy sobre-expresadas en el tejido CCRcc: perilipina 2 y FABP7.

Las proteínas que tendrían más interés en el desarrollo de un panel de biomarcadores de CCR serían las siguientes:

En relación al aumento de glicólisis aeróbica, la elevación de enolasa-2.

En relación al aumento de movilidad celular y producción de matriz extracelular, dentro del proceso de transición epitelio-mesenquimal, la elevación de galectina, metaloproteasa 9, periostina, fibronectina y trombospondinas 1 y 2.

En el seno del metabolismo lipídico, la elevación de FABP7 y perilipina-2 y la disminución de FABP1.

Como expresión de las modificaciones metabólicas citoplasmáticas, la elevación de NNMT.

Y por último, en el de la actividad inflamatoria, la elevación de haptoglobina.

En consecuencia, las proteínas que podrían tener utilidad como marcadores diferenciales de CCRcc frente a CCRcr serían las proteínas NNMT (elevada en CCRcc y disminuida en CCRcr) y la BRP44L (elevada en CCRcr y disminuida en CCRcc).

A la luz de los resultados de este trabajo, se abren **futuras vías de investigación**, que permitan la validación de estos resultados en un amplio grupo de pacientes, así como la detección de estas proteínas en plasma u orina de pacientes sanos y pacientes con CCRcc. Esto podría permitir validar un panel de biomarcadores diagnósticos. Por otro lado, abre la posibilidad a investigar los cambios producidos en el contexto del daño por isquemia-reperfusión a través de técnicas de proteómica.





## DISCUSIÓN

PROTEÍNA	Metabolismo	Bibliografía	Modelo de estudio	Resultados	Pronóstico	Otros datos	Otras proteínas
ENOLASA 2	Glicólisis	Sanders <sup>139</sup>	Revisión bibliográfica	Elevada			PFK, Aldolasa, PK
		Rengui <sup>142</sup>	Muestras CCR				GLDC disminuida en CCR
		Kaneko <sup>119</sup>	Plasma periférico CCR	Elevada		Disminución tras cirugía	
GALECTINA	Proliferación Diferenciación celular	Von Klot <sup>110</sup>	Muestras CCR (ARNm)	Elevada	No asociación		
		Aboulhagag <sup>108</sup>	IHQ muestras CCR	Elevada			
		Kaneko <sup>119</sup>	Plasma periférico CCR	Elevada			
METALOPROTEASA 9	Matriz extracelular	Mikami <sup>147</sup>	Revisión bibliográfica	Elevada			
PERIOSTINA	Matriz extracelular	Castronovo <sup>98</sup>	Muestras CCR	Elevada			
		Bakhtyar <sup>113</sup>	Muestras CCR	Elevada			
		Morra <sup>148</sup>	Muestras CCR + IHQ			Peor pronóstico	
FIBRONECTINA	Matriz extracelular	Waalkes <sup>122</sup>	Muestras CCR	Elevada	Peor pronóstico		
TROMBOSPONDINA 1 Y 2	Matriz extracelular	Teng <sup>121</sup>	Muestras CCR	Elevada			Enolasa 2, NNMT, Galectina 1, Anexina A4, Ferritina, CD14
		Zubac <sup>109</sup>	Muestras CCR + IHQ	Dispar	Mejor pronóstico		
FABP7	Lipídico	Nagao <sup>107</sup>	IHQ muestras CCR	Elevada	Peor pronóstico		
		Bensaad <sup>155</sup>	Modelo murino			Disminución con Bevacizumab	
		Zhou <sup>158</sup>	Muestras CCR	Elevada	Peor pronóstico		
FABP1	Lipídico	Zheng <sup>156</sup>	Muestras CCR (ITRAQ)	<b>Disminuida</b>			PDZK1
PERILIPINA 2	Lipídico	Hu <sup>115</sup>	Orina pacientes CCR	Elevada		Proporcional a masa renal	
		Song <sup>116</sup>	Orina pacientes CCR	Elevada			
NNMT	Proteína citoplasmática	Zhang <sup>118</sup>	IHQ muestras CCR	Elevada	Peor pronóstico		
		Kim <sup>161</sup>	Plasma periférico CCR	Elevada			Plastina 2
		Song <sup>159</sup>	Muestras CCR	Elevada			Anexina A4, LDHA, perilipina 2
HAPTOGLOBINA	Reacción de fase aguda	Sandim <sup>117</sup>	Orina pacientes CCR	Elevada			
		Tolson <sup>114</sup>	Plasma periférico CCR	Elevada			

**Tabla 37.** Proteínas con potencial valor de biomarcador en CCR. Resumen de los resultados destacados en nuestro grupo comparados con la bibliografía existente. Son proteínas sobre-expresadas en tejido CCRcc, salvo FABP-1, que está disminuida.

FABP-7: fatty acid binding protein 7; FABP-1: fatty acid binding protein 1; NNMT: N nicotin-metil transferasa; GLDC: glicin deshidrogenasa; PDZK1: cofactor NHE-RF· regulador del intercambio de sodio; LDHA: lactato deshidrogenasa; PFK: fosfofructokinasa; PK: piruvatokinasa.

# **CONCLUSIONES**



## 7. CONCLUSIONES.

### 7.1. Conclusiones respecto a los objetivos primarios.

#### 7.1.1. Describir el proteoma de los tejidos seleccionados como referencia: "NT" y "Control", y analizar sus diferencias metabólicas y proteicas.

Las rutas metabólicas de actividad inflamatoria y respuesta de fase aguda están más activadas en el tejido "NT" que en el "Control". Las proteínas de estas rutas están sobre-expresadas en "NT", destacando haptoglobina, las apolipoproteínas 1 y 2 y las proteínas del complemento.

#### 7.1.2. Describir el proteoma del CCRcc, y analizar sus diferencias metabólicas y proteicas con respecto a los tejidos de referencia.

El tejido de CCRcc muestra un aumento de la actividad metabólica de la glicólisis aeróbica y una disminución de los ciclos de respiración celular.

Así mismo, el tejido de CCRcc presenta un aumento del movimiento y comunicación intercelular en relación con la transición epitelio-mesenquimal y la remodelación de la matriz extracelular.

El metabolismo lipídico está disminuido en el tejido de CCRcc. FABP7 y perilipina 2, pese a ser proteínas del metabolismo lipídico, están sobre-expresadas en CCRcc.

El aumento de glicólisis aeróbica se ilustró a través de la sobre-expresión de enolasa 2. La remodelación de la matriz extracelular se mostró por la elevación de periostina, metaloproteasa 9, fibronectina y trombospondinas 1 y 2.

La disminución del metabolismo lipídico se expresó por una infra-expresión muy marcada de FABP1 y de PDZK1.

### 7.2. Conclusiones respecto a los objetivos secundarios.

#### 7.2.1. Describir el proteoma de CCRcr, y analizar sus diferencias metabólicas y proteicas con respecto a CCRcc.

El CCRcr tiene menos aumento de la glicólisis aeróbica y menos disminución de los ciclos de respiración celular que CCRcc.

NNMT está muy elevada en CCRcc, y la proteína transportadora de piruvato mitocondrial está muy elevada en CCRcr.

### 7.2.2. Proponer una firma de proteínas como biomarcadores de diagnóstico y/o pronóstico en CCR.

Las proteínas que tienen mayor potencial como posibles biomarcadores de CCR son la elevación de enolasa-2, galectina, metaloproteasa 9, periostina, fibronectina, trombospondina 1 y trombospondina 2, FABP7, perilipina-2, NNMT y haptoglobina, así como la disminución de FABP1.


# **ANEXOS**





## 8. ANEXOS.

## 8.1. Anexo 1. Consentimiento informado para la inclusión en el estudio.

	APELLIDOS:
	NOMBRE:
	SERVICIO:
	CAMA:
<b>CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	Fecha Ingreso: <input type="text" value="N.H.C."/>
<b>OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO TUMORAL, SANGRE Y ORINA PARA SU ALMACENAMIENTO EN EL BIOBANCO</b>	
<b>SERVICIO:</b> <b>MÉDICO QUE INFORMA: APELLIDOS..... NOMBRE.....</b>	
<p>Usted ha sido diagnosticado de un cáncer de células renales (CCR). El único tratamiento curativo aceptado en el momento actual para el CCR es la cirugía.</p> <p>El disponer de muestras de pacientes con esta patología es imprescindible para seguir avanzando en el conocimiento y tratamiento de esta patología. Necesitamos su colaboración porque en la actualidad, en la investigación biomédica el ciudadano libre es un agente esencial para el progreso.</p> <p>Dado el carácter voluntario y libre de la cooperación que se le solicita, su negación a participar no condiciona la calidad de la asistencia que usted precisa.</p> <p><b>¿Cuál es la colaboración que se le solicita?</b> Autorizar la obtención una muestra de sangre (10 ml) y orina antes de la cirugía y una pequeña muestra, 1-2 mm<sup>3</sup>, de tejido tumoral y de tejido renal sano.</p> <p><b>¿Cuáles son los riesgos?</b> La toma de muestras de sangre se hará coincidiendo con la extracción de la analítica que usted precisa para su tratamiento (preoperatorio). No tendrá más molestias que las habituales que acompañan a un pinchazo de la piel o la aparición de pequeños hematomas. La toma de la muestra de orina no conlleva ningún riesgo asociado y la muestra de tejido tumoral se realizará en el momento de la cirugía y no comprometerá el análisis y diagnóstico por el Servicio de Anatomía Patológica.</p> <p>Cumpliendo con la LEY 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica, se le pide su consentimiento para:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><u>Almacenar por un tiempo indefinido las muestras cedidas junto con los datos clínicos y analíticos asociados, para que puedan ser utilizadas gratuitamente en estudios de investigación futuros.</u></b></li> </ul> <p>En todo momento, se cumplirán los principios de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Se garantiza por tanto, el mantenimiento de la confidencialidad de la información obtenida. Sólo si se obtuviera información que pudiera ser importante para la salud de Ud. o la de su familia, se activarían los mecanismos para identificarle y poder informarle.</p> <p>Las muestras serán almacenadas en el Biobanco del Hospital Ramón y Cajal para su utilización en futuros proyectos de investigación, previa aprobación de los comités científico y de ética a los que está adscrito el Biobanco.</p> <p>Podrá ejercer el derecho de oposición, de rectificación y de cancelación de los datos, así como, el derecho de solicitar la retirada, destrucción o anonimización de la muestra y, o los datos. Para ello puede ponerse en contacto con nosotros en los teléfonos 913368760 (S<sup>o</sup> Urología), 913367955 (Biobanco), o bien en la dirección de correo electrónico: biobanco@salud.madrid.org</p> <p><b>¿Cuáles son los beneficios?</b> Usted puede no obtener un beneficio directo de su participación en este estudio. Sin embargo, algunos de los cuidados y medicaciones de los que Ud. se beneficiará durante su ingreso han sido posibles por la colaboración previa de otras personas. De la misma manera su colaboración hoy, puede ayudar a otros pacientes en el futuro. En cualquier caso su colaboración no tiene ninguna consecuencia negativa para usted.</p> <p>Antes de firmar este documento, si desea más información o tiene cualquier duda, no tenga reparo en preguntarnos. Le atenderemos con mucho gusto.</p>	

HOJA DE INFORMACION Y CONSENTIMIENTO PARA OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER DE CÉLULAS RENALES

PAG 1 de 2

CI-BIOB-013.01

Rev-01

FECHA: 11/05/2011

El paciente D./Dña. ...., o su representante legal, declara que:

- **HE LEIDO Y ENTENDIDO LA HOJA DE INFORMACIÓN QUE ME HA SIDO ENTREGADA.** Comprendo que mi participación es voluntaria y desinteresada. Renuncio a cualquier remuneración económica por la donación y a cualquier derecho sobre los resultados obtenidos de la investigación con las muestras.
- **ESTOY SATISFECHO** con la información recibida y he tenido posibilidad de aclarar todas las dudas sobre el tema.
- **CONCEDO MI CONSENTIMIENTO PARA CEDER MIS MUESTRAS** y conozco mi derecho a revocar dicho consentimiento total o para determinados fines en cualquier momento previo a la realización del mismo, sin necesidad de tener que explicar sus causas.

Madrid, ..... de ..... de .....

Fdo: Fdo:  
 EL INTERESADO O RESPONSABLE LEGAL EL MEDICO INFORMANTE

Si en un futuro requiriéramos más muestras de usted para continuar el estudio,  
 ¿aceptaría volver a ser contactado? SI  NO

Teléfono:.....

¿Querría usted recibir información derivada de los datos del estudio que pudiera ser relevante para su salud o la de sus familiares? SI  NO

Teléfono:.....

---

**REVOCO** el consentimiento previamente concedido

Madrid, ..... de ..... de.....

Fdo: Fdo:  
 EL PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL EL MEDICO INFORMANTE

## 8.2. Anexo 2. Aprobación del CEIC.

 SaludMadrid	Hospital Universitario Ramón y Cajal Comité Ético de Investigación Clínica	 Comunidad de Madrid
--	--	--

Dra. ITZIAR DE PABLO LÓPEZ DE ABECHUCO, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Ramón y Cajal

**CERTIFICA**

Que el Comité Ético de Investigación Clínica, ha evaluado el **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

Título:

**Identificación de biomarcadores mediante técnicas de proteómica cuantitativa para el diagnóstico y pronóstico de cáncer de células renales.**

Investigador Principal: **Javier Francisco Burgos Revilla**

Servicio: **Urología**

Y ha decidido su **APROBACIÓN.**

Lo que firmo en Madrid a 11 de mayo de 2011





Fdo.: Dra. Itziar de Pablo López de Abechuco  
Secretaria del CEIC

C/Avda. Arzobispo, s/n. 28034 MADRID (Plaza) 2. Dto. C  
Tlf.: 91 374 8222

E-mail: [ceic@saludmadrid.org](mailto:ceic@saludmadrid.org)

### 8.3. Anexo 3. Hoja para envío de muestras a Anatomía Patológica.

#### PROYECTO DE CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES (CCR).

SERVICIO DE UROLOGÍA / SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA.

La muestra de tejido que se envía se utilizará en el Proyecto de Investigación de Proteómica del Carcinoma de Células Renales, y no será procesado para su análisis en Anatomía Patológica.

**PACIENTE:**

Pegatina del paciente

**FECHA:** martes, 14 de julio de 2020

**MUESTRAS:**

1. BOTE 1: Tejido del tumor.
2. BOTE 2: Tejido sano renal.

**DIAGNÓSTICO:** Tumor renal.

**PROCESAMIENTO.** El tejido remitido será procesado por la Dra. Eva Cristóbal Lana o el Dr. Constantino Varona Crespo.

Por favor, al recibir la muestra:

1. **Avisar a Eva Cristóbal o a Constantino Varona.**
2. El tejido se congelará en fresco en el menor tiempo posible desde su extracción en quirófano.

### 8.4. Anexo 4. Hoja de identificación de las muestras. Documento de trazabilidad.



8.5. ANEXO 5. Beca de Investigación en Uro-Oncología de la Sociedad Urológica Madrileña y Astra Zéneca.

12º Congreso de la  
Sociedad Urológica Madrileña  
**SUM**

**PREMIOS  
2011**

Beca de Investigación en Uro-Oncología,  
patrocinada por Astra Zeneca y por la SUM  
con una cuantía de 9.000 €

**Detección de Marcadores de Cáncer de Células Renales  
mediante técnicas de Proteómica cuantitativa**

**Víctor Díez Nicolás**  
Hospital Ramón y Cajal

**CUENCA**  
6 y 7 de mayo de 2011

12º Congreso  
Sociedad Urológica Madrileña  
S.U.M.

AstraZeneca 

Sociedad Urológica Madrileña  
S.U.M.

# **BIBLIOGRAFÍA**





## 9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Ljungberg, B; Bensalah, K; Bex, A; Canfield S et. al. *Guidelines on Renal Cell Carcinoma.*; 2015.
2. Znaor A, Lortet-Tieulent, Laversanne M, Al E. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol.* 2015;67(3):519.
3. Chow WH, Dong LM DS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol.* 2010;7:245.
4. Siegel RL, Miller KD JeA. Cancer Statistics 2017. *Cancer J Clin.* 2017;67:7.
5. Ferlay J, Steliarova-Foucher E L-TJ. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013;49:1374.
6. Souza DLB BM. Incidencia, prevalencia y mortalidad del cáncer renal en España: estimaciones y proyecciones para el periodo 1998-2022. *Actas Urológicas Españolas.* 2012;36(9):521-526.
7. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol.* 2017;19(7):799-825. doi:10.1007/s12094-016-1607-9.
8. Instituto de Salud Carlos III. *Mortalidad Por Cáncer En España. Servidor Interactivo de Información ARIADNA.*; 2015.
9. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, et al. Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3:17009. doi:10.1038/nrdp.2017.9.
10. Ljünberg B, Campbell SC, Yong H, et al. The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *E Urol.* 2017;60(2011):615-621. doi:10.1016/j.eururo.2011.06.049.
11. Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S HB. Rising incidence of small renal masses: a need to reassess treatment effect. *J Natl Cancer.* 2006;98:1331.
12. Medina-Rico M, López-Ramos H, Lobo M, Romo J, Guillermo Prada J. Epidemiology of renal cancer in developing countries: Review of the literature. *Can Urol Assoc J.* 2017;12(3). doi:10.5489/cuaj.4464.
13. Siegel R, Ward E, Brawley O JA. The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:212.
14. Siemer S, Hack M, Lehmann J et. al. Outcome of renal tumors in young adults. *J Urol.* 2006;175:1240.
15. Thompson RH, Ordonez MA, Iasonos A et. al. Renal Cell Carcinoma in young and old patients. *J Urol.* 2008;180:1262.
16. Pantuck AJ, Zisman A BA. The changing natural history fo renal cell carcinoma. *J Urol.* 2001;166:1611.
17. Ries LA, Eisner MP Kosary CL E al. *SEER Cancer Statistics Review.*; 2000.
18. SEER stat fact sheets: Kidney and Renal Pelvis. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html>.
19. Levi F, Ferlay J, Galeone C, et al. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int.* 2008;101(8):949-958. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.07451.x.

20. De Angelis, R; Sant, M; Coelman M et. al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age. *Lancet Oncol.* 2014;15:23-34.
21. Kane CJ, Mallin K, Rithcey J E al. Renal cell cancer stage migration: analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer.* 2008;113:78.
22. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JW E al. The role of tobacco smoke in bladder and kidney carcinogenesis. *Eur Urol.* 2016;70(458).
23. Tsvian M, Moreira DM, Caso JR E al. Cigarette smoking is associated with advanced renal carcinoma. *J Clin Oncol.* 2011;(29):2027.
24. Hunt, JD; van der Hel, OL; McMillan, GP; Bofetta, P; Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer.* 2005;114:101-108.
25. Kidayat K, Du X, Zou SY SB. Blood pressure and kidney cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *J Hypertens.* 2017;35(7):1333-1344.
26. Adams KF, Leitzmann MF, Albanes D, Kipnis V et al. Body size and renal cell cancer incidence in a large US cohort study. *Am J Epidemiol.* 2008;168(3):268-277.
27. Renehan, AG; Tyson, M; Egger, M; Heller, RF; Zwahlen M. Body-mass index and incidence fo cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008;371:569-578.
28. Brennan JF, Stilmant MM, Babayan RK SM. Acquired renal cystic disease: implications for the urologist. *Br J Urol.* 1991;67(4):342.
29. Theis R, Dolwick S, Burr D, Al. E. Smoking, enviromental tobacco smoke and risk or renal cell cancer. *BMC Cancer.* 2008;8:387.
30. Albiges L. Body mass index and metastatic renal cell carcinoma: clinical and biological correlations. *J Clin Oncol.* 2016;34:3655-3663.
31. Montironi R, Cheng L, Scarpelli M, et al. Platinum Priority – Guidelines The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs — Part A : Renal , Penile , and Testicular Tumours. *Eur Urol.* 2017;70(1):93-105. doi:10.1016/j.eururo.2016.02.029.
32. Presti JC, Rao PH, Chen Q E al. Histopathological, cytogenetic and molecular characterization of renal cortical tumor. *Cancer Res.* 1991;51:1544.
33. Durinck S, Stawiski EW, Pavía Jiménez A E al. Spectrum of diverse genomic alterations define non-clear renal carcinoma subtypes. *Nat Genet.* 2015;47:13.
34. Volpe, A; Novara, G; Antonelli A et. al. Chromophobe renal cell carcinoma: oncological outcomes and prognostic factors in a large multicentre series. *BJU Int.* 2012;110:76.
35. Tokuda, N; Naito, S; Matsuzaki O et. al. Colectin duct renal cell carcinoma: a nationwide survey in Japan. *J Urol.* 2006;176:40.
36. Rioux-Leclercq N, Ferran A, Mahul A, et al. Les tumeurs rénales : recommandations de la conférence de consensus de l'International Society of Urologic Pathology (ISUP) 2012. *Ann Pathol.* 2014;34(6):448-461. doi:10.1016/j.annpat.2014.10.003.
37. Palacín Esteban AM. Desarrollo de modelos predictivos en el carcinoma de células renales. 2014.
38. Leibovich B, Lohse C, Crispen P, et al. Histological subtype is an independet predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma. *J Urol.* 2010;183:1309-1315.

39. Lang H, Lindner V, de Fromont M, Molinié V, Et.al. Multicenter Determination of Optimal Interobserver Agreement Using the Fuhrman Grading System for. *Cancer*. 2004;(December):625-629. doi:10.1002/cncr.20812.
40. Delahunt B, Sika-paotonu D, Bethwaite PB, et al. Fuhrman Grading is not Appropriate for Chromophobe Renal Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(6):957-960.
41. Keegan K, Schupp C, Chamie K, Hellenthal N, Evans C, Koppie T. Histopathology of surgically treated renal cell carcinoma: survival differences by subtype and stage. *J Urol*. 2012;188:391-397.
42. Novara G, Ficarra V, Antonelli A, Artibani W, Et.al. Validation of the 2009 TNM version in a large multi-institutional cohort of patients treated for renal cell carcinoma: are further improvements needed? *Eur Urol*. 2010;58:588-595.
43. Gerlinger M et. al. Intra-tumor heterogeneity and branched evolution revealed by multi-region sequencing. *N Eng J Med*. 2012;366:883-892.
44. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y E al. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell tumors. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4726.
45. Eichelberg C, Junker K. Diagnostic and Prognostic Molecular Markers for Renal Cell Carcinoma : A Critical Appraisal of the Current State of Research and Clinical Applicability. *Eur Urol*. 2009;55:851-863. doi:10.1016/j.eururo.2009.01.003.
46. Ngo T, Wood C, Karam J. Biomarkers of renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin*. 2014;32(3):243-251.
47. Guo G, Gui Y, Gao S E al. Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Genet*. 2011;44:17.
48. Peña-Llopis S, Vega-Rubín de Celis S, Liao A E al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet*. 2012;44:751.
49. Varela I, Tarpey P, Raine K E al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature*. 2011;469:539.
50. Dalgliesh GL, Furge K, Greenman C et. al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature*. 2010;463:360.
51. Oda H, Nakatsuru Y IT. Mutations of the p53 gene and p53 protein overexpression are associated with sarcomatoid transformation in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1995;49:43.
52. Cancer Genome Atlas Research Network T. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. 2013. doi:10.1038/nature12222.
53. Network CGAR. Comprehensive molecular characterization of papillary renal cell carcinoma. *N Eng J Med*. 2016;374:135.
54. K Y, M S, T O, et.al. Overexpression of KIT in chromophobe renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2003;22:847.
55. Hegemann M, Kroeger N, Stenzl A, Bedke J. Rare and changeable as a chameleon: paraneoplastic syndromes in renal cell carcinoma. *World J Urol*. February 2018:1-6. doi:10.1007/s00345-018-2215-9.
56. Sanz Mayayo E, Hevia Palacios V, Arias Funez F, et al. BIBLIOGRAPHIC REVIEW ABOUT THE USEFULNESS OF ULTRASOUND CONTRAST MEDIA IN THE STUDY OF RENAL MASSES. <http://aeurologia.com/pdfs/articulos/125-eng.pdf>. Accessed March 15, 2018.

57. Thomsen HS, Morcos SK. Contrast media and the kidney: European Society of Urogenital Radiology (ESUR) Guidelines. *Br J Radiol.* 2003;76(908):513-518. doi:10.1259/bjr/26964464.
58. Park JW, Jo MK, Lee HM. Significance of <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography/computed tomography for the postoperative surveillance of advanced renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2009;103(5):615-619. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08150.x.
59. Marconi L, Dabestani S, Lam TB, et al. Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Accuracy of Percutaneous Renal Tumour Biopsy. *Eur Urol.* 2016;69(4):660-673. doi:10.1016/j.eururo.2015.07.072.
60. Lane BR, Tiong H-Y, Campbell SC, et al. Management of the Adrenal Gland During Partial Nephrectomy. *J Urol.* 2009;181(6):2430-2437. doi:10.1016/j.juro.2009.02.027.
61. Kutikov A, Uzzo RG. The R.E.N.A.L. Nephrometry Score: A Comprehensive Standardized System for Quantitating Renal Tumor Size, Location and Depth. *J Urol.* 2009;182(3):844-853. doi:10.1016/j.juro.2009.05.035.
62. Wang AJ, Bhayani SB. Laparoscopy and Robotics Robotic Partial Nephrectomy Versus Laparoscopic Partial Nephrectomy for Renal Cell Carcinoma: Single-Surgeon Analysis of >100 Consecutive Procedures. *URL.* 73:306-310. doi:10.1016/j.urology.2008.09.049.
63. Marszalek M. Positive surgical margins after nephron sparing surgery. *Eur Urol.* 2012;61:757-763.
64. Kim SP, Abouassaly R. Treatment of Patients with Positive Margins after Partial Nephrectomy. *J Urol.* 2016;196(2):301-302. doi:10.1016/j.juro.2016.05.078.
65. STEPHENSON AJ, HAKIMI AA, SNYDER ME, RUSSO P. Complications of Radical and Partial Nephrectomy in a Large Contemporary Cohort. *J Urol.* 2004;171(1):130-134. doi:10.1097/01.ju.0000101281.04634.13.
66. Lane BR, Abouassaly R, Gao T, et al. Active treatment of localized renal tumors may not impact overall survival in patients aged 75 years or older. *Cancer.* 2010;116(13):3119-3126. doi:10.1002/cncr.25184.
67. Volpe A, Panzarella T, Rendon RA, Haider MA, Kondylis FI, Jewett MAS. The natural history of incidentally detected small renal masses. *Cancer.* 2004;100(4):738-745. doi:10.1002/cncr.20025.
68. El Dib R, Touma N, Kapoor A. Cryoablation vs radiofrequency ablation for the treatment of renal cell carcinoma: a meta-analysis of case series studies. *BJU Int.* 2012;110:510-516.
69. Xu J, Latif S, Wei S. Metastatic renal cell carcinoma. Review of literature. *Int J Surg Case Rep.* 2012;3(12):601-604.
70. Sandim V, Pereira D, Ornellas A, Alves G. Renal Cell Carcinoma and proteomics. *Urol Int.* 2010;84:373-377.
71. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1(11):845-867. doi:10.1074/mcp.R200007-MCP200.
72. Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen J V, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol.* 2006;7.
73. Wiesener M, Muchenhagen P, Berger I, Et.al. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor 1-alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res.* 2001;61:5215-5222.
74. Divgi C. Positron emission tomography / computed tomography identification of clear cell renal cell carcinoma: results from the REDECT trial. *J Clin Oncol.* 2013;31:187-191.

75. Gofrit ON, Orevi M. Diagnostic Challenges of Kidney Cancer: A Systematic Review of the Role of Positron Emission Tomography-Computerized Tomography. *J Urol*. 2016;196(3):648-657. doi:10.1016/j.juro.2016.02.2992.
76. Zhao A, Li G, Péoc'h M, Genin C, Gigante M. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2013;(94):115-120.
77. Redova M, Et.al. Circulating miR-378 and mi-R451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Trans Med*. 2012;10:55.
78. Mustafa A, Gupta S, Hudes G, Egleston B, Uzzo R, Kruger W. Serum amino acid levels as a biomarker for renal cell carcinoma. *J Urol*. 2011;186(4):1206-1212.
79. Kaneko N, Gotoh A, Okamura N, Matsuo E, Ai E. Potential tumor markers of renal cell carcinoma: galectin-1 and galectin-3 for primary detection. *J Urol*. 2013;20:530-535.
80. Su Kim D, Choy Y, Moon M, Kang S, Et.al. Composite three-markers assay for early detection of kidney cancer. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev*. 2013;22:390-398.
81. Wu X, Weng L, Li X, Guo C, Ai E. Identification of a 4-miRNA signature for renal cell carcinoma metastasis and prognosis. *PLoS One*. 2012;7:e35661.
82. Jiang Z, Chu PG, Woda BA, et al. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol*. 2006;7(7):556-564. doi:10.1016/S1470-2045(06)70732-X.
83. Hoffmann N, Sheinin Y, Lohse C, Et.al. External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker for metastatic progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2008;112:1471-1479.
84. Michigan A, Johnson T, Master V. Preoperative C-reactive protein level adjusted for comorbidities and lifestyle factors predicts overall mortality in localized renal cell carcinoma. *Mol Diagn Ther*. 2011;15:229-234.
85. Cross B, Brian W, Et.al. Preoperative erythrocyte sedimentation rate independently predicts overall survival in localized renal cell carcinoma. *Int J Surg Oncol*. 2012:524981.
86. Definición de inhibidor de puntos de control inmunitario - Diccionario de cáncer - National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/inhibidor-de-puntos-de-control-inmunitario>. Accessed May 3, 2018.
87. Herráez Sánchez A. Biomodel UAH. <http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>.
88. Mattsson A. Protein Purification. <https://slideplayer.com/slide/15251956/>.
89. Madrid E de I de MUP de. Magnetismo. <http://www2.montes.upm.es/dptos/digfa/cfisica/magnet/espectrometro.html>.
90. Banks RE, Craven RA, Harnden P, Madaan S, Joyce A, Selby PJ. Key clinical issues in renal cancer : a challenge for proteomics. *World J Urol*. 2007:537-556. doi:10.1007/s00345-007-0199-y.
91. Wiese S, Reidegeld K, Meyer H, Warscheid B. Protein labeling by ITRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*. 2007;7:340-350.
92. Chinello C, L'Imperio V, Stella M, James Smith A, Et.al. The proteomics landscape of renal tumors. *Expert Rev Proteomics*. 2016;12:1103-1120.
93. Poznanovic S, Wozny W, Schwall G, Sastri C, Et.Al. Differential radioactive proteomic analysis of microdissected renal cell carcinoma tissue by 54cm isoelectric focusing in serial immobilized pH

- gradient gels. *Proteome Res.* 2005;4:2117-2125.
94. Lichtenfels R, Dressler S, Zodawa M, Et.al. Systematic comparative protein expression profiling of clear cell renal cell carcinoma. *Mol Cell Proteomics.* 2009;12:2827-2842.
  95. Sun, CY; Zang YC; San, YX; Sun, W; Zhang L. Proteomic analysis of clear cell renal cell carcinoma. *Saudi Med J.* 2010;512:525-532.
  96. Gribaldi, G; Barbero, G; Mandili G et. al. Proteomic identification of reticulocalbin 1 as a potential tumor marker in renal cell carcinoma. *J Proteomics.* 2013;91:385-392.
  97. Unwin R, Craven R, Harnden P, Hanrahan S, Et.al. Proteomic changes in renal cancer and coordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics.* 2003;3:1620-1623.
  98. Castronovo V, Waltregny D, Kischel P, Roesli C, Al. E. A chemical proteomics approach for the identification of accessible antigens expressed in human kidney cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5:2083-2091.
  99. Zhang L, Jiang H, Xu G, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals potential early diagnostic markers of clear-cell Renal cell carcinoma. *Bioscience trends.* 2016;10(3):210-219. doi:10.5582/bst.2016.01055.
  100. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: The long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol.* 2006;24(8):971-983. doi:10.1038/nbt1235.
  101. Anderson L. Candidate-Based Plasma Proteomics. In: *Plasma Proteome Institute.* ; 2006:8.
  102. Kline KG, Frewen B, Bristow MR, Maccoss MJ, Wu CC. High quality catalog of proteotypic peptides from human heart. *J Proteome Res.* 2008;7:5055-5061.
  103. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009;6:359-362.
  104. Akkina SK, Zhang Y, Nelsestuen GL, Oetting WS, Ibrahim HN. Temporal Stability of the Urinary Proteome after Kidney Transplant : More Sensitive than Protein Composition ? research articles. 2009:94-103.
  105. Siu KWM, Desouza L V, Scorilas A, et al. Differential Protein Expressions in Renal Cell Carcinoma : New Biomarker Discovery by Mass Spectrometry research articles. 2009:3797-3807.
  106. Li XB, Gu JD, Zhou QH. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thorac Cancer.* 2015;6(1):17-24. doi:10.1111/1759-7714.12148.
  107. Nagao K, Shinohara N, Smit F, et al. Fatty acid binding protein 7 may be a marker and therapeutic targets in clear cell renal cell carcinoma 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. *BMC Cancer.* 2018;18(1). doi:10.1186/s12885-018-5060-8.
  108. Aboulhagag NA, El-Deek HEM, Sherif MF. Expression of galectin-1 and galectin-3 in renal cell carcinoma; immunohistochemical study. *Ann Diagn Pathol.* 2018;36(2018):31-37. doi:10.1016/j.anndiagpath.2018.06.005.
  109. Zubac DP, Bostad L, Kihl B, Seidal T, Wentzel-Larsen T, Haukaas SA. 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.* 2009;182(5):2144-2149. doi:10.1016/j.juro.2009.07.015.
  110. Von Klot CA, Kramer MW, Peters I, et al. Galectin-1 and Galectin-3 mRNA expression in renal cell carcinoma. *BMC Clin Pathol.* 2014;14(1):1-7. doi:10.1186/1472-6890-14-15.



111. Kawakami K, Enokida H, Chiyomaru T, et al. The functional significance of miR-1 and miR-133a in renal cell carcinoma. 2011. doi:10.1016/j.ejca.2011.06.030.
112. Zhou J, Deng Z, Chen Y. Overexpression of FABP7 promotes cell growth and predicts poor prognosis of clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2015;33(3):113. <https://www-clinicalkey-com.m-hryc.a17.csinet.es/#!/content/playContent/1-s2.0-S1078143914002786?returnurl=null&referrer=null>. Accessed March 31, 2020.
113. Bakhtyar N, Wong N, Kapoor A, et al. Clear cell renal cell carcinoma induces fibroblast-mediated production of stromal periostin. *Eur J Cancer*. 2013;49:3537-3546. doi:10.1016/j.ejca.2013.06.032.
114. Tolson J, Bogumil R, Brunst E, et al. Serum protein profiling by SELDI mass spectrometry: Detection of multiple variants of serum amyloid alpha in renal cancer patients. *Lab Invest*. 2004;84(7):845-856. doi:10.1038/labinvest.3700097.
115. Hu R, Gupta R, Wang Z, et al. Bioplasmonic paper-based assay for perilipin-2 non-invasively detects renal cancer. *Kidney Int*. 2019;96(6):1417-1421. doi:10.1016/j.kint.2019.08.020.
116. Song JB, Morrissey JJ, Mobley JM, et al. Urinary aquaporin 1 and perilipin 2: Can these novel markers accurately characterize small renal masses and help guide patient management? *Int J Urol*. 2019;26(2):260-265. doi:10.1111/iju.13854.
117. Sandim V, De D, Pereira A, et al. Proteomic analysis reveals differentially secreted proteins in the urine from patients with clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2016;34. doi:10.1016/j.urolonc.2015.07.016.
118. Zhang J, Xie XY, Yang SW, Wang J, He C. Nicotinamide N-methyltransferase protein expression in renal cell cancer. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010;11(2):136-143. doi:10.1631/jzus.B0900249.
119. Kaneko N, Gotoh A, Okamura N, et al. Potential tumor markers of renal cell carcinoma:  $\alpha$ -Enolase for postoperative follow up, and galectin-1 and galectin-3 for primary detection. *Int J Urol*. 2013;20(5):530-535. doi:10.1111/j.1442-2042.2012.03206.x.
120. Craven RA, Banks RE. Understanding and Managing Renal Cell Carcinoma : Can Proteomic Studies Contribute to Clinical Practice ? 2008;160:88-106.
121. Teng PN, Hood BL, Sun M, Dhir R, Conrads TP. Differential proteomic analysis of renal cell carcinoma tissue interstitial fluid. *J Proteome Res*. 2011;10(3):1333-1342. doi:10.1021/pr101074p.
122. Waalkes S, Atschekzei F, Kramer MW, et al. Fibronectin 1 mRNA expression correlates with advanced disease in renal cancer. *BMC Cancer*. 2010;10:503. doi:10.1186/1471-2407-10-503.
123. Chinello C, L'imperio V, Stella M, et al. The proteomic landscape of renal tumors. *Expert Rev Proteomics*. 2016;13(12):1103-1120. doi:10.1080/14789450.2016.1248415.
124. Seliger B, Dressler SP, Lichtenfels R, Kellner R. Candidate biomarkers in renal cell carcinoma. 2007;(i):4601-4612. doi:10.1002/pmic.200700415.
125. White NMA, Masui O, DeSouza L, et al. Relative quantification of protein expression in metastatic renal cell carcinoma using iTRAQ LC-MS/MS analysis reveals galectin-1 as a potential prognostic marker and therapeutic target. *J Clin Oncol*. 2013;31(6\_suppl):412. doi:10.1200/jco.2013.31.6\_suppl.412.
126. Nijboer WN, Schuurs TA, Van Der Hoeven JAB, et al. Effects of Brain Death on Stress and Inflammatory Response in the Human Donor Kidney. 2005. doi:10.1016/j.transproceed.2004.12.262.
127. Malagrino PA, Venturini G, Yogi PS, et al. Metabolomic characterization of renal ischemia and

- reperfusion in a swine model. *Life Sci.* 2016;156:57-67. doi:10.1016/j.lfs.2016.05.025.
128. Maltby S, Khazaie K, McNagny KM. Mast Cells in Tumor Growth: Angiogenesis, Tissue Remodeling and Immune-modulation. doi:10.1016/j.bbcan.2009.02.001.
  129. Kinouchi T, Mano M, Saiki S, et al. Incidence rate of satellite tumors in renal cell carcinoma. *Cancer.* 1999;86(11):2331-2336. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10590375>. Accessed February 8, 2019.
  130. Gohji K, Hara I, Gotoh A, et al. Multifocal renal cell carcinoma in Japanese patients with tumors with maximal diameters of 50 mm. or less. *J Urol.* 1998;159(4):1144-1147. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9507818>. Accessed February 8, 2019.
  131. Sargin SY, Ekmekcioglu O, Arpali E, Altinel M, Voyvoda B. Multifocality Incidence and Accompanying Clinicopathological Factors in Renal Cell Carcinoma. *Urol Int.* 2009;82(3):324-329. doi:10.1159/000209366.
  132. Whang M, O'Toole K, Bixon R, et al. The incidence of multifocal renal cell carcinoma in patients who are candidates for partial nephrectomy. *J Urol.* 1995;154(3):968-70-1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7637103>. Accessed February 8, 2019.
  133. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and Cancer. *Nature.* 2002;420:860-867. [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature). Accessed March 15, 2020.
  134. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(8):618-631. doi:10.1038/nrc2444.
  135. The UniProt Consortium. Uniprot.org. <https://www.uniprot.org>.
  136. Ye B, Cramer DW, Skates SJ, et al. *Haptoglobin-Subunit As Potential Serum Biomarker in Ovarian Cancer: Identification and Characterization Using Proteomic Profiling and Mass Spectrometry 1.*; 2003.
  137. Oh SK, Very DL, Walker J, Raam S, Ju ST. An analogy between fetal haptoglobin and a potent immunosuppressant in cancer. *Cancer Res.* 1987;47(19):5120-5126. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3621198>. Accessed March 18, 2020.
  138. Se-Kyung Oh S-HKJEW. Interference With Immune Response at the Level of Generating Effector Cells by Tumor-Associated Haptoglobin. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2008;37(5):1-9. doi:10.1093/jnci.
  139. Sanders E, Diehl S. Analysis and interpretation of transcriptomic data obtained from extended Warburg effect genes in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncoscience.* 2015;2(2):151-186. doi:10.18632/oncoscience.128.
  140. Pandey N, Lanke V, Vinod PK. Network-based metabolic characterization of renal cell carcinoma. *Sci Rep.* 2020:1-13. doi:10.1038/s41598-020-62853-8.
  141. Tang XP, Chen Q, Li Y, et al. Mitochondrial pyruvate carrier 1 functions as a tumor suppressor and predicts the prognosis of human renal cell carcinoma. *Lab Invest.* 2019;99(2):191-199. doi:10.1038/s41374-018-0138-0.
  142. Li R, Wang L, Wang X, Geng RX, Li N, Liu XH. Identification of hub genes associated with outcome of clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2020;19(4):2846-2860. doi:10.3892/ol.2020.11389.
  143. Fang J, Sawa T, Akaike T, Maeda H. Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer Res.* 2002;62(11):3138-3143.



144. Chuanyu S, Yuqing Z, Chong X, Guowei X, Xiaojun Z. Periostin promotes migration and invasion of renal cell carcinoma through the integrin/focal adhesion kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway. *Tumour Biol.* 2017;39(4):1010428317694549. doi:10.1177/1010428317694549.
145. Landolt L, Eikrem Ø, Strauss P, et al. Clear Cell Renal Cell Carcinoma is linked to Epithelial-to-Mesenchymal Transition and to Fibrosis. *Physiol Rep.* 2017;5(11). doi:10.14814/phy2.13305.
146. Jordà M, Olmeda D, Vinyals A, et al. Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci.* 2005;118(15):3371-3385. doi:10.1242/jcs.02465.
147. Mikami S, Oya M, Mizuno R, et al. Recent advances in renal cell carcinoma from a pathological point of view. *Pathol Int.* 2016;66(9):481-490. doi:10.1111/pin.12433.
148. Morra L, Rechsteiner M, Casagrande S, et al. Relevance of periostin splice variants in renal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2011;179(3):1513-1521. doi:10.1016/j.ajpath.2011.05.035.
149. Albig AR, Schiemann WP. Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells. *DNA Cell Biol.* 2004;23(6):367-379. doi:10.1089/104454904323145254.
150. Ohara H, Akatsuka S, Nagai H, et al. Stage-specific roles of fibulin-5 during oxidative stress-induced renal carcinogenesis in rats. *Free Radic Res.* 2011;45(2):211-220. doi:10.3109/10715762.2010.523702.
151. Miyata Y, Sakai H. Thrombospondin-1 in urological cancer: Pathological role, clinical significance, and therapeutic prospects. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):12249-12272. doi:10.3390/ijms140612249.
152. Bienes-Martínez R, Ordóñez A, Feijoo-Cuaresma M, et al. Autocrine stimulation of clear-cell renal carcinoma cell migration in hypoxia via HIF-independent suppression of thrombospondin-1. *Sci Rep.* 2012;2:1-8. doi:10.1038/srep00788.
153. Tang H-Y, Beer LA, Tanyi JL, Zhang R, Liu Q, Speicher DW. Protein isoform-specific validation defines multiple chloride intracellular channel and tropomyosin isoforms as serological biomarkers of ovarian cancer. 2013. doi:10.1016/j.jprot.2013.06.016.
154. Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J.* 2012;279(15):2610-2623. doi:10.1111/J.1742-4658.2012.08644.X@10.1002/(ISSN)1742-4658(CAT)MINIREVIEWSERIES(VI)METABOLICALTERATIONSINCANCERCELLS.
155. Bensaad K, Favaro E, Lewis CA, et al. Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 $\alpha$  contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. *Cell Rep.* 2014;9(1):349-365. doi:10.1016/j.celrep.2014.08.056.
156. Zheng J, Wang L, Peng Z, Yang Y, Feng D, He J. Low level of PDZ domain containing 1 (PDZK1) predicts poor clinical outcome in patients with clear cell renal cell carcinoma. *EBioMedicine.* 2017;15:62-72. doi:10.1016/j.ebiom.2016.12.003.
157. van der Mijn JC, Fu L, Khani F, et al. Combined Metabolomics and Genome-Wide Transcriptomics Analyses Show Multiple HIF1 $\alpha$ -Induced Changes in Lipid Metabolism in Early Stage Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Transl Oncol.* 2020;13(2):177-185. doi:10.1016/j.tranon.2019.10.015.
158. Zhou J, Deng Z, Chen Y, et al. Overexpression of FABP7 promotes cell growth and predicts poor prognosis of clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2015;33(3):113.e9-113.e17. doi:10.1016/j.urolonc.2014.08.001.
159. Song Y, Zhong L, Zhou J, et al. Data-Independent Acquisition-Based Quantitative Proteomic Analysis Reveals Potential Biomarkers of Kidney Cancer. *Proteomics - Clin Appl.* 2017;11(11-

- 12):1-10. doi:10.1002/prca.201700066.
160. Cao Q, Ruan H, Wang K, et al. Overexpression of PLIN2 is a prognostic marker and attenuates tumor progression in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2018;53(1):137-147. doi:10.3892/ijo.2018.4384.
161. Su Kim D, Choi YD, Moon M, et al. Composite three-marker assay for early detection of kidney cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(3):390-398. doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-1156.
162. Tang SW, Yang TC, Lin WC, et al. Nicotinamide N-methyltransferase induces cellular invasion through activating matrix metalloproteinase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2011;32(2):138-145. doi:10.1093/carcin/bgq225.
163. Campagna R, Cecati M, Pozzi V, et al. Involvement of transforming growth factor beta 1 in the transcriptional regulation of nicotinamide N-methyltransferase in clear cell renal cell carcinoma. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2018;64(7):51-55.
164. Bharadwaj S, Prasad GL. *Tropomyosin-1, a Novel Suppressor of Cellular Transformation Is Downregulated by Promoter Methylation in Cancer Cells*. www.elsevier.com/locate/canlet. Accessed April 2, 2020.
165. Wang J, Guan J, Lu Z, et al. Clinical and tumor significance of tropomyosin-1 expression levels in Renal cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2015;33(3):1326-1334. doi:10.3892/or.2015.3733.
166. Manjurul Islam AHM, Ehara T, Kato H, et al. CALPONIN H1 EXPRESSION IN RENAL TUMOR VESSELS: CORRELATIONS WITH MULTIPLE PATHOLOGICAL FACTORS OF RENAL CELL CARCINOMA. 2004. doi:10.1097/01.ju.0000101969.34419.57.
167. Kinouchi T, Mano M, Matsuoka I, et al. IMMATURE TUMOR ANGIOGENESIS IN HIGH-GRADE AND HIGH-STAGE RENAL CELL CARCINOMA. 2003. doi:10.1016/S0090-4295(03)00512-0.
168. Fangning W, Chunguang M, Hailiang Z, et al. Identification and validation of soluble carrier family expression signature for predicting poor outcome of renal cell carcinoma. *J Cancer*. 2017;8(11):2010-2017. doi:10.7150/jca.18257.
169. Wang HY, Mills SE. KIT and RCC are useful in distinguishing chromophobe renal cell carcinoma from the granular variant of clear cell renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(5):640-646. doi:10.1097/01.pas.0000157943.33903.92.