

# Biomarcadores circulantes y tisulares en pacientes con Carcinoma Renal de células claras (CRcc)

## *Tissular and circulating biomarkers in patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC)*

M.E. Knott<sup>1</sup>, C. Pulero<sup>1</sup>, N. Gandur Quiroga<sup>1</sup>, M. Nuñez<sup>3</sup>, P. Rondot Radío<sup>1</sup>, M. Brzezinski<sup>1</sup>, L. Pasik<sup>1</sup>, A. Álvarez<sup>1</sup>, H. Malagrino<sup>1</sup>, G. Boggio<sup>2</sup>, J. Grasselli<sup>2</sup>, G. Gueglio<sup>2</sup>, P. Garcia Marchiñena<sup>2</sup>, L. Uria Soruco<sup>2</sup>, M. Isola<sup>2</sup>, E. Bal de Kier Joffé<sup>1</sup>, M.G. Pallotta<sup>2</sup>, L. Puricelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Universidad de Buenos Aires - <sup>2</sup>Hospital Italiano de Buenos Aires - <sup>3</sup>Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

En la Argentina, el Carcinoma de Células Renales es la 9<sup>na</sup> causa de muerte por cáncer en varones y la 13<sup>ava</sup> en mujeres. El CRcc es el tipo histológico más frecuente y comprende un grupo heterogéneo de cánceres con evolución clínica variable. A nivel molecular, se ha demostrado que el CRcc está asociado a la desregulación de vías metabólicas involucradas en el censado de la concentración de oxígeno, nutrientes y energía. En particular, la mutación del gen VHL, relacionada con el 60-80% de los casos esporádicos de CRcc, desencadena la expresión de genes relacionados con la angiogénesis y el metabolismo celular. Si bien las nuevas metodologías moleculares han permitido descubrir nuevos biomarcadores, no se conocen, hoy en día, nuevos marcadores pronósticos con utilidad clínica. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar si la expresión de moléculas específicas, a nivel tisular y sérico, se asocian con parámetros clínicos y/o patológicos relevantes en CRcc, incluyendo supervivencia.

En primer lugar, se encaró un estudio retrospectivo, donde se estudió la expresión de las moléculas VEGFR1/Flk-1, VEGFR2/Flt-4 y PDGF-A, asociadas con las vías de señalización gatilladas bajo condiciones de hipoxia, y de la molécula GLUT-1, involucrada en el metabolismo de glucosa. Se encontró que una alta expresión de VEGFR-2, a nivel citoplasmático, se asocia con la presencia de metástasis al diagnóstico. Por otro lado, el estudio univariado indicó que la expresión de GLUT-1 y VEGFR-2 están asociadas con la supervivencia global.

Basado en el conocimiento de que las moléculas circulantes pueden reflejar la biología tumoral, se estudió en forma prospectiva la expresión de 43 citoquinas angiogénicas, mediante "antibody array" en el suero de pacientes CRcc y controles sanos. Se demostró que el suero de pacientes portadores de CRcc presenta variaciones en moléculas asociadas con el fenómeno proinflamatorio, como I-309 (CCL1), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-2. Observamos que las citoquinas séricas proinflamatorias disminuyen en pacientes con tumores localizados (EI), con respecto a los individuos control, pero aumentan en pacientes con tumores avanzados (EIV). Por lo tanto, es probable que en tumores de estadios

In our country, the renal cell carcinoma (RCC) is the 9<sup>th</sup> cause of death for cancer in males and 13<sup>th</sup> in women. ccRCC is the most common histological type of RCC. The natural history of this disease is highly variable. Alterations in angiogenic molecules are a main mechanism associated with ccRCC, tumor development and progression. Also, nowadays, ccRCC has been associated with metabolic dysfunction and with the activation of pseudohypoxic pathways. Proteomic technologies have been used to discover new biomarkers of RCC that might increase survival. However, it is known that no single prognostic marker in RCC exists. So, the aim of this study was to determine whether the expression of specific molecules, at tumor tissue or serum levels, is associated with clinical and/or pathological parameters relevant to ccRCC patients, including survival.

First, we enaced a retrospective study where formalin fixed paraffin embedded ccRCC tumors were analyzed by immunohistochemistry. The expression of VEGFR1/Flk-1, VEGFR2/Flt-4 and PDGF-A receptor, associated with angiogenic pathways triggered by hypoxic conditions and Glut-1, involved with the glucose metabolism, were studied. We found that a high cytoplasmic VEGFR-2 expression could be associated with the presence of metastasis at diagnosis. On the other hand, an univariate study indicated that the expression of GLUT-1 and VEGFR-2 can be associated with overall survival.

As circulating molecules might contain a rich untapped source of disease-specific information leading to the discovery of new biomarkers, our next approach was to determine, at serum level, the expression of multiple circulating cytokines in ccRCC patients by an antibody array assay. This prospective study revealed that serum concentration of cytokines involved in inflammation (I-309, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-2) were lower in Stage I than in Stage IV patients or control subjects. This finding suggests that pro-inflammatory molecules might be controlled and reduced in small-tumor microenvironment diminishing collateral effects produced by inflammation. However, as the tumor grows, it acquires the ability to control immune and inflammatory responses generating a

bajos se origine una respuesta que provoque la disminución del perfil de moléculas proinflamatorias que se refleje en la circulación, pero a medida que el tumor progresa se cree un microambiente más hostil que induzca el aumento en la concentración de estas moléculas.

Finalmente, se estudió la expresión sérica de la enzima Anhidrasa Carbónica IX (CAIX) cuya función es participar en la homeostasis del pH intra y extracelular. Se observó que los pacientes portadores de CRcc presentaron valores significativamente elevados de CAIX circulante respecto a los observados en controles sanos. Considerando un valor de corte correspondiente al percentilo 85 de la población control (34,82 pg/ml), la Especificidad de CAIX para la portación de CRcc fue de 93,8% y la Sensibilidad de 73,3%. Además, se encontró que los pacientes E1 mostraron valores de CAIX sérica significativamente menores con respecto a los valores observados en pacientes con estadios más avanzados. En el 66,67% de los pacientes se observó que los valores de CAIX descendieron significativamente luego de la cirugía. Por lo tanto, la cuantificación de CAIX sérica podría ser un potencial marcador para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con CRcc.

Consideramos que estudios realizados son de relevancia, ya que para el CRcc no se cuenta, hasta el momento, con biomarcadores de utilidad clínica en el manejo del paciente.

**PALABRAS CLAVE:** Cáncer de riñón, vías angiogénicas, enzima CAIX, marcadores tumorales.

## INTRODUCCIÓN

### Biología molecular del Carcinoma Renal de células claras

El Carcinoma de Células Renales (CR) representa el cáncer urológico más letal. Las razones que explican el pobre pronóstico de este cáncer son su diagnóstico clínico tardío y la resistencia a la quimioterapia convencional, lo cual lo convierte, una vez diseminado, en una enfermedad incurable. El CR engloba a un grupo heterogéneo de subtipos tumorales, que incluyen el CR de células claras (CRcc), responsable del 70-80% de todos los CR; el carcinoma papilar (CRp tipo I y II) (11-15%); el cromóforo (5%) y otros tipos menos frecuentes<sup>1</sup>. Esta clasificación es limitada, ya que pacientes con el mismo diagnóstico histopatológico pueden evolucionar en forma muy distinta. Estudios más recientes indican que cada uno de estos subtipos histológicos se asocia a mutaciones específicas y que pueden subdividirse de acuerdo a la presencia de alteraciones moleculares particulares.

Si bien el CRcc es el subtipo predominante de CR, su historia natural es heterogénea y difícil de predecir. Este tipo del cáncer se ha asociado con la pérdida de funcionalidad del gen de von Hippel-Lindau (VHL), tanto en la forma familiar de la enfermedad como en la mayoría (~90%) de los casos esporádicos<sup>2</sup>. La herencia de una copia defectiva del gen VHL predispone a la persona portadora al desarrollo de CRcc en el marco del síndrome VHL. Sin embargo, para que se desarro-

hostile microenvironment which promotes aggressiveness and invasion. Finally, we studied the expression of serum CAIX, an enzyme involved in pH homeostasis and hypoxia, by a quantitative ELISA test. ccRCC patients showed significantly elevated values of serum CAIX respect to the levels observed in healthy controls. The assay of serum CAIX expression in our population exhibited a sensitivity of 93.8% and a specificity of 73.3% to diagnose ccRCC disease. Besides, we demonstrated that Stage I ccRCC patients showed significantly lower levels of the circulating enzyme. Serum CAIX levels significantly correlated with tumor size. Then, we investigated the usefulness of serum CAIX in the follow-up of these patients. Interestingly in 66.7% ccRCC patients values of CAIX decreased after tumor removal. We conclude that serum CAIX could be a useful diagnostic biomarker in ccRCC patients. This would be of relevant importance as there is a lack of molecular biomarkers for this pathology.

**KEY WORDS:** Renal Cell Carcinoma, angiogenic pathways, CAIX enzyme, tumoral biomarkers.

lle un cáncer es necesaria la inactivación somática del otro alelo.

En CRcc se han detectado muchas alteraciones moleculares en los mecanismos normales de homeostasis y metabolismo que ocurren en respuesta a la hipoxia, generando un estado conocido como pseudohipoxia (activación de las vías de señalización que normalmente se activan en condiciones de hipoxia, pero bajo condiciones normales de oxígeno). Esta condición se debe a la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  como consecuencia de la pérdida de funcionalidad del gen VHL lo que lleva a un aumento en la expresión de genes regulados por HIF-1 $\alpha$ .

Es sabido que en la célula tumoral predomina la glucólisis seguida por fermentación láctica en lugar de la fosforilación oxidativa, aún en condiciones normales de concentración de oxígeno. Este fenómeno se conoce como efecto Warburg y facilita la formación de un microambiente tumoral ácido beneficioso para la célula tumoral ya que, entre otros efectos, la protege del sistema inmune<sup>4</sup>. Uno de los genes regulados por HIF1 $\alpha$  es aquel que codifica para la proteína GLUT-1 (transportador de glucosa), ubicado en la membrana plasmática, lo que resulta en un aumento de la incorporación de glucosa a la célula tumoral. Además, otras enzimas claves del camino glucolítico son reguladas por HIF1 $\alpha$ , lo que en conjunto induce un aumento significativo de la glucólisis. También se encuentra regulada por HIF1 $\alpha$ , la anhidrasa carbónica IX (CAIX). Esta enzima pertenece a la familia de anhidrasas carbónicas (ACs). Algu-

nas enzimas de esta familia se expresan normalmente en muchos tejidos y controlan el pH por conversión del  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en bicarbonato. CAIX controla el pH ácido que se genera en el microambiente tumoral como resultado de un metabolismo glicolítico. Varios estudios han evaluado la expresión de esta enzima en CRcc a nivel tisular con el objetivo de asignarle un valor diagnóstico o predictivo<sup>5</sup>. Menos se conoce su valor como biomarcador de CRcc a nivel sérico.

El CRcc se caracteriza por ser un tumor altamente angiogénico. Los genes involucrados en la angiogénesis y en la respuesta a hipoxia también son regulados por HIF1 $\alpha$ . Un ejemplo es el VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor), cuya actividad es crucial en la progresión tumoral. VEGF se une a sus receptores de membrana con actividad tirosina quinasa VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 los cuales al activarse gatillan varios caminos de señalización que resultan en la proliferación de la célula endotelial, la migración y la degradación de componentes de la matriz extracelular<sup>6</sup>. El VEGF, en particular, está sobreexpresado en la mayoría de los CR, principalmente en aquellos asociados con la inactivación del gen supresor tumoral VHL. Otra molécula moduladora del proceso angiogénico desregulada en CRcc es el PDGF (Platelet-derived Growth Factor), quimioattractante para los precursores de los pericitos<sup>7</sup>, involucrados en la formación de nuevos vasos.

### **Biomarcadores tumorales**

Un biomarcador tumoral se define como un indicador, objetivamente medido y evaluado, generalmente característico de un proceso biológico normal, pero que se encuentra cuali o cuantitativamente alterado en el cáncer. El marcador puede estar relacionado, entre otros, con la expresión de características biológicas involucradas en la transformación celular, en el crecimiento y/o progresión tumoral. El mismo puede ser producido por el tumor o por otras células en respuesta a la presencia tumoral y puede detectarse, a nivel celular o molecular, en tejidos, células circulantes, fluidos biológicos (sangre, orina u otros), etc.

En el caso del CR, en la actualidad no hay ningún marcador validado para la detección, pronóstico, monitoreo o selección del tratamiento. Sin embargo, hay varios trabajos que describen posibles marcadores con potencialidad clínica para CRcc, pero que necesitan ser estudiados más profundamente. Las investigaciones basadas en la búsqueda de marcadores en fluidos como orina, plasma o suero podrían llevar a la detección de aquellos que, obtenidos en forma poco o no invasiva,

permitan monitorear la respuesta del paciente a lo largo del(los) tratamiento(s) de su enfermedad. También podrían facilitar el seguimiento de los pacientes a fin de detectar tempranamente una posible recaída.

Los marcadores de diagnóstico se utilizan para determinar la presencia o no de cáncer, establecer el origen de un tumor indiferenciado, o bien para conocer el origen de metástasis cuyo tumor primario es desconocido. Pueden clasificarse, según la técnica que se utilice para su detección, en inmunohistoquímicos, genéticos, moleculares, entre otros.

Para la mayoría de las neoplasias renales, el diagnóstico se basa en la observación de la morfología celular mediante histología tradicional (cortes histológicos teñidos con hematoxilina/eosina). No obstante, la inmunohistoquímica es indispensable para subclasificar histológicamente variantes de CR, para diagnosticar las biopsias cuando el material es escaso, o para identificar metástasis en órganos distantes. Sin embargo, los diferentes subtipos de CR comparten la expresión positiva o negativa de varios de estos marcadores inmunohistoquímicos, lo que hace que sea necesario evaluar la expresión simultánea de varios antígenos para clasificar los distintos tipos tumorales con mayor precisión.

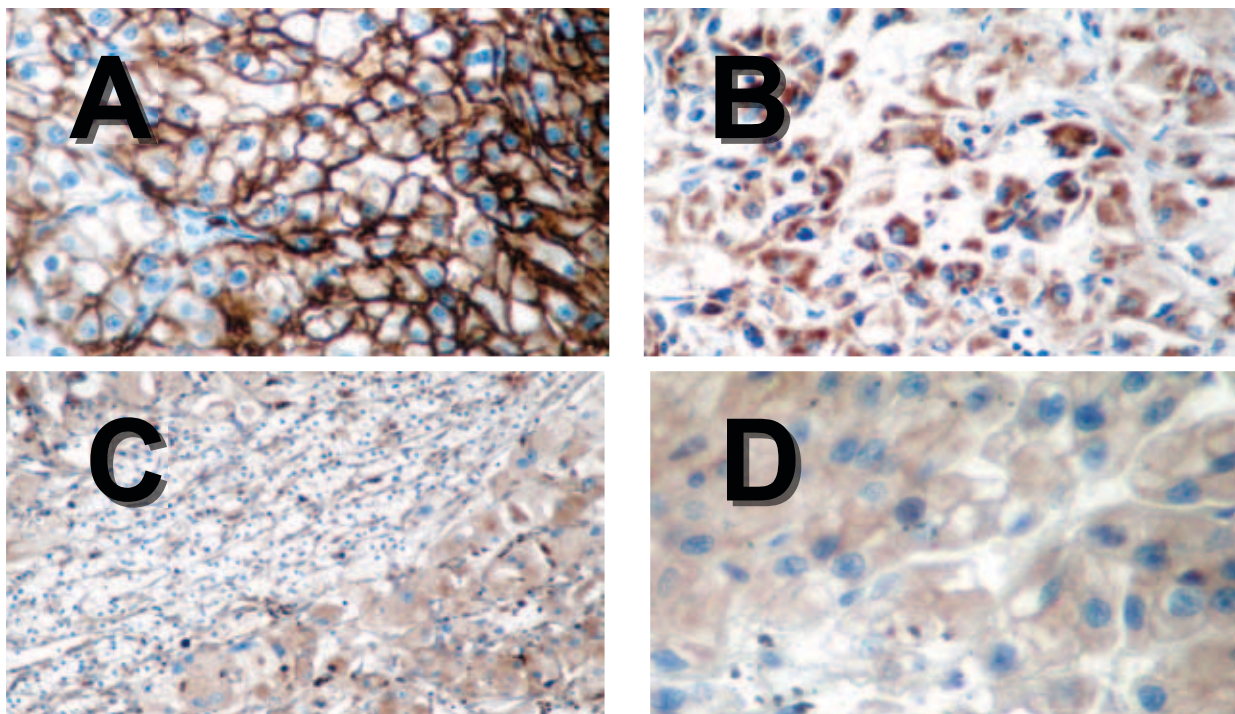
Los marcadores de pronóstico se utilizan para determinar el comportamiento de un tumor y predecir su agresividad, lo que permite delinear grupos de pacientes más homogéneos. Estos biomarcadores informan, en el momento del diagnóstico, sobre la evolución clínica que tendrá el paciente, lo que permite determinar las probabilidades de supervivencia libre de enfermedad (SLE: período de tiempo desde el diagnóstico tumoral hasta la recaída) o de supervivencia global (SG ó SVG: período de tiempo desde el diagnóstico tumoral hasta la muerte). Los marcadores de pronóstico pueden ayudar a estratificar pacientes en grupos de riesgo en relación a su evolución, y también a guiar las decisiones terapéuticas.

### **OBJETIVOS**

El objetivo de nuestro grupo de trabajo consistió en analizar, en pacientes con CRcc, vírgenes de tratamiento, la expresión de moléculas, tanto a nivel tisular como circulante, a fin de encontrar biomarcadores con valor diagnóstico y pronóstico.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para este trabajo se realizaron dos tipos de estudios: uno retrospectivo y otro prospectivo. Ambos estudios



**Figura 1.** Fotos representativas de las IHQ. A: GLUT-1 a nivel de membrana (A=400x); B: VEGF-R2 a nivel citoplasmático (A=400x); C: VEGF-R3 a nivel citoplasmático y de membrana (A=100x); D: PDGF a nivel citoplasmático (A=400x).

fueron aprobados por el Comité de Docencia e Investigación del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo (IOAHR) siguiendo la declaración de Helsinki. Además, el estudio retrospectivo fue aprobado por el CEPI [(Comité de Ética de Protocolos de Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA))].

Los tumores fueron clasificados morfológicamente utilizando la clasificación de WHO (2004). Se incluyeron pacientes vírgenes de tratamiento sistémico y se excluyeron pacientes que hubieran padecido otro cáncer previo o durante el tratamiento o seguimiento de su enfermedad renal. La información clínica de los pacientes se obtuvo por revisión de las Historias Clínicas.

#### Estudio retrospectivo:

**Población:** Se analizaron cortes histológicos de piezas quirúrgicas correspondientes a tumores CRcc de 49 pacientes del IOAHR. Se estudiaron 27 hombres [edad: mediana 54 (rango 46-72)] y 22 mujeres [edad 64 (44-82)]. Según el estadio se incluyeron 7 pacientes estadio I, 18 estadio II, 7 estadio III y 16 estadio IV. 26 pacientes presentaron factores de riesgo (obesidad, hipertensión o hábito de fumar). Salvo 4 pacientes, todos los individuos presentaron Performance Status de entre 80 y 100%.

**Inmunohistoquímica (IHQ):** Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: GLUT-1 (Thermo Scientific) y VEGFR-2, VEGFR-3 y la isoforma de

PDGF, PDGF-A de Santa Cruz Biotechnology, Inc. La expresión de los marcadores moleculares fue analizada por dos observadores independientes, que desconocían los datos clínicos y de evolución de los pacientes. Para cada corte se determinó el porcentaje de células positivas sobre el total de células del tumor.

**Análisis estadístico:** Se estableció un valor de corte para dividir los valores en “alta” o “baja” expresión: 50% para GLUT-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 y 10% para PDGF-A tanto a nivel de membrana como citoplasma. Para el análisis estadístico se utilizaron los tests de Spearman, Chi-cuadrado y Fisher. Para el análisis multivariado se realizó Análisis de Corres-

Antígeno	Localización	Nº de tumores con alta expresión/total (%)
GLUT-1	Membrana	26/48 (54,2)
	Citoplasma	11/46 (23,9)
VEGFR-2	Membrana	19/47 (40,4)
	Citoplasma	14/47 (29,3)
VEGFR-3	Membrana	22/47 (46,8)
	Citoplasma	16/47 (42,6)
PDGF	Membrana	20/47 (42,6)
	Citoplasma	18/47 (38,3)

**Tabla 1.** Número de tumores con alta expresión de los marcadores estudiados, según su localización citoplasmática o de membrana.

pondencia Múltiple. Las curvas de Kaplan-Meier y el Log Rank test se utilizaron para evaluar la supervivencia global (SVG). El análisis multivariado de la SVG se realizó mediante el test de Cox. En todos los casos se consideró que la diferencia es estadísticamente significativa cuando  $p < 0,05$ .

#### Estudio prospectivo:

##### A) Estudio de 43 citoquinas séricas mediante "Antibody Array"

**Población:** Las muestras de suero fueron obtenidas siguiendo un estricto protocolo y fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Se incorporaron 14 controles sanos (CS), 14 pacientes CRcc Estadio (E) I (EI) y 13 EIV, luego de la firma del consentimiento informado. Este proyecto está asociado al "Biobanco Público de Muestras Séricas Oncológicas" del IOAHR y se realizó en forma conjunta con el HIBA.

**Antibody Array:** Para el análisis de la expresión de 43 citoquinas séricas, relacionadas con el proceso angiogénico, se utilizó el kit RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array C Series 1000. La técnica se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor. Se evaluó la intensidad de la señal de los resultados utilizando el programa Gel-Pro Analyzer 4.0 para Windows.

##### B) Estudio de Anhidrasa Carbónica IX (CAIX) mediante el "Test de Elisa"

**Población:** Las extracciones se realizaron en el momento del diagnóstico [Muestra (M)=1] y después de la cirugía (M=2) ( $n=30$ , 10 EI, 4 EII, 6 EIII y 10 EIV). Los resultados se compararon con los obtenidos en 16 CS.

**Test de Elisa:** Mediante este ensayo se analizó, en las muestras séricas de controles y pacientes, la expresión de la molécula CAIX (Kit R&D System).

**Análisis estadístico:** El análisis multivariado de la expresión de las moléculas se realizó por Análisis por Componentes Principales (ACP). Se realizó un test no paramétrico (Kruskal-Wallis) comparando los tres grupos (CS, EI y EIV) y contrastes a posteriori. Para la molécula CAIX se calcularon la especificidad (Es) y la sensibilidad (S) del marcador. En todos los casos se consideró que la diferencia es estadísticamente significativa cuando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Expresión de los antígenos en estudio a nivel tisular y su asociación con parámetros clínico-patológicos

En la **Figura 1** se muestran fotos representativas de la expresión de los distintos marcadores estudiados empleando IHQ. En todos ellos se observó marcación tanto a nivel de membrana (40-55%) como citoplasmática (24-40%) (**Tabla 1**).

En la **Tabla 1** se listan la cantidad de tumores que expresan altos niveles de los distintos marcadores, tanto a nivel citoplasmático como de membrana.

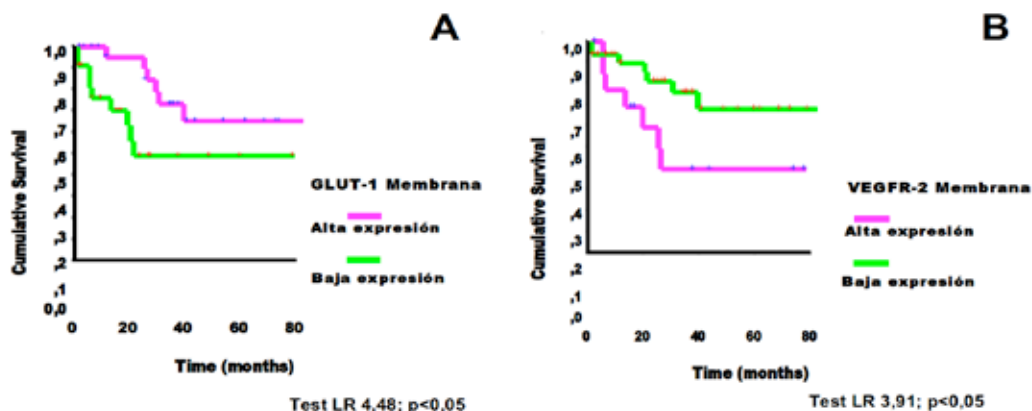
Más del 50% de los tumores CRcc presentaron una elevada marcación de GLUT-1 a nivel de membrana, alrededor del 40% tuvieron alta expresión de VEGFR2 o VEGFR3 y un 40% expresaron PDGF a nivel de membrana. Se observó una elevada expresión de GLUT-1, VEGFR-3 y PDGF-A desde los primeros estadios de la enfermedad, lo cual indicaría una temprana disregulación de las vías angiogénicas y del metabolismo de la glucosa.

Se encontró una correlación significativa entre la expresión citoplasmática y de membrana para los antígenos GLUT-1 y PDGF ( $p < 0,001$  y  $p < 0,008$  respectivamente). También se halló una correlación significativa entre la inmunomarcación de VEGFR-2 y VEGFR-3, tanto a nivel de membrana ( $p < 0,001$ ) como citoplasmática ( $p < 0,008$ ). Además, se halló una asociación inversa entre la marcación de PDGF en membrana celular y la edad ( $p < 0,05$ ). Así, un mayor número de tumores CRcc provenientes de pacientes jóvenes presentaron una mayor expresión de PDGF, a nivel de membrana, en comparación con tumores de pacientes con mayor edad.

Por otro lado, una alta expresión citoplasmática de VEGFR-2 se asoció con la presencia de metástasis al diagnóstico. Se observó una mayor expresión citoplasmática de VEGFR-2 en los tumores de pacientes con diseminación metastásica al diagnóstico (53,3%) respecto de tumores de pacientes no metastásicos (16,1%) ( $p < 0,01$ ). Esto sugiere que la alta expresión de esta molécula, involucrada en la angiogénesis, podría ser importante para determinar la extravasación de la célula tumoral.

El análisis de los datos por este método multivariado reveló las siguientes asociaciones:

• Los tumores de pacientes que estaban vivos al finalizar el estudio, portadores de tumores T1, sin metástasis al diagnóstico y con un PS de inicio de 100%, presentaron mayoritariamente baja expresión de VEGFR-2, VEGFR-3 y de PDGF-A a nivel citoplasmático.



**Figura 2.** Curvas de Kaplan-Meier para los marcadores GLUT-1 y VEGFR-2 en membrana.

• Los tumores de pacientes >70 años con tumores T3 y GIII, presentaron metástasis al diagnóstico y fallecieron durante el seguimiento del estudio mostraron principalmente elevada expresión de VEGFR-2 en citoplasma. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con el test de Chi-cuadrado.

• Los tumores provenientes de mujeres de edad entre 51 y 60 años, con PS de inicio de 80% y que presentaban al menos un factor de riesgo mostraron, en su mayoría, alta marcación en citoplasma de VEGFR-3 y PDGF-A.

### Asociación entre la expresión de los antígenos en estudio y la supervivencia global

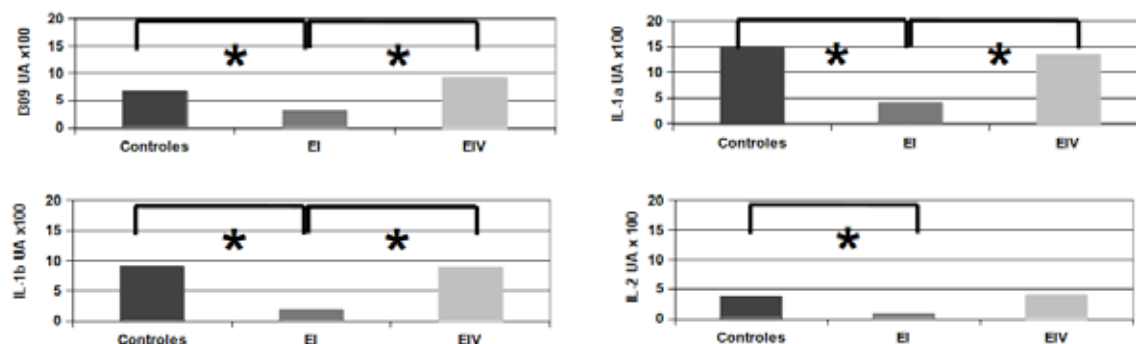
El análisis univariado mostró que una baja expresión en membrana del antígeno GLUT-1 y alta de VEGFR-2 se asocian a mal pronóstico. En la **Figura 2** se muestran las curvas de Kaplan-Meier para estos dos marcadores. Sin embargo, el test multivariado de Cox indicó que esta asociación significativa se pierde al incluir en el análisis otras variables pronósticas relevantes para CRcc (datos no mostrados), por lo cual no se pueden considerar marcadores independientes de supervivencia.

### Expresión de las moléculas en estudio a nivel circulante

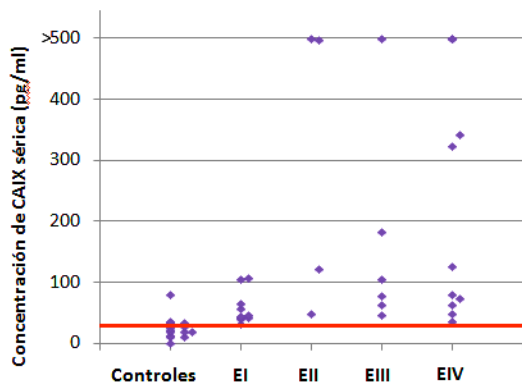
Aquellas citoquinas que presentaron la mayor variabilidad de expresión en todos los grupos estudiados fueron las moléculas asociadas al proceso inflamatorio I-309, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 y IL-4. En la **Figura 3** se muestra la expresión de estas moléculas en los tres grupos en estudio (Controles, Pacientes EI y Pacientes EIV).

Se observó que la concentración de las moléculas circulantes I-309, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  disminuye significativamente en estadios iniciales de la enfermedad y aumentan en los más avanzados. Para la molécula IL-2 no se observaron diferencias significativas entre el EIV con respecto al control o al EI.

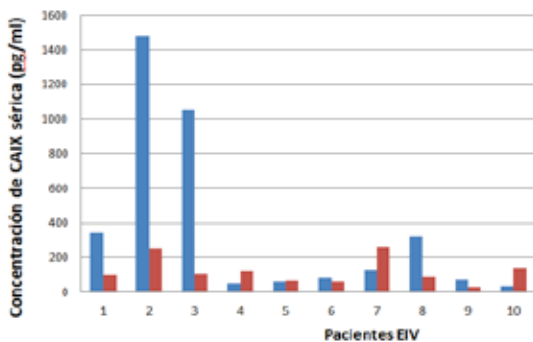
La inflamación asociada a los tumores es un proceso complejo, donde intervienen células inflamatorias, así como también una serie de mediadores que incluyen citoquinas, quemoquinas y enzimas, quienes en conjunto establecen un microambiente particular que facilita la angiogénesis y promueve el crecimiento, la invasión y la metástasis de la célula tumoral. Por lo tanto, es probable que en tumores de estadios bajos se origine una respuesta que provoque la disminución del perfil de moléculas proinflamatorias que se refleje en la circulación, pero a medida que el tumor progresa se cree un



**Figura 3.** Gráficos de expresión de I-309, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-2 (\*) Significancia en la expresión entre las diferentes moléculas.



**Figura 4.** Expresión de los niveles circulantes de CAIX en individuos controles y en pacientes con CRcc según el estadio. La línea roja representa el valor de corte seleccionado.



**Figura 5.** Valores de CAIX sérico para los 10 pacientes EIV estudiados, antes (M1 color azul) y luego de la cirugía (M2 color rojo).

microambiente más hostil que induzca el aumento en la concentración de estas moléculas.

Por otro lado, los pacientes CRcc presentaron valores significativamente elevados de CAIX circulante (Md 75,89 pg/ml, rango 30,8-1482,9) respecto a los observados en controles (Md 23,29 pg/ml; rango 0,0-79,9) (MW test:  $p < 0,001$ ). Considerando un valor de corte correspondiente al percentilo 85 de la población control (34,82 pg/ml), la Es de CAIX para la portación de CRcc fue de 93,8% y la S 73,3%. Por otro lado, se encontró que los pacientes EI mostraron valores de CAIX sérica significativamente menores respecto de los pacientes con estadios más avanzados [Por ejemplo: EI=45,25 (30,8-107,9) vs. EIV=102,93 (36,2-1482,9), expresados en pg/ml, MW  $p < 0,001$ ] (Figura 4).

Además, se observó que en 20/30 (66,67%) de los pacientes CRcc los valores de CAIX descendieron significativamente luego de la cirugía (M2), mientras que en 4 los valores no se modificaron y en 6 aumentaron. En la Figura 5 se muestra los valores de la enzima obtenidos antes y después de la cirugía para los pacientes EIV.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio retrospectivo indicarían que una elevada expresión citoplasmática de VEGFR-2 en el tejido tumoral podría relacionarse con la presencia de metástasis al diagnóstico. Sin embargo, un número mayor de pacientes es necesario para confirmar estos resultados.

En el estudio prospectivo se determinó que el suero de pacientes portadores de CRcc presenta variaciones en moléculas asociadas con el fenómeno proinflamatorio, como I-309 (CCL1), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-2. Observamos que las citoquinas I-309 (CCL1), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  disminuyen en pacientes con tumores localizados (EI) pero aumentan en pacientes con tumores avanzados (EIV). Estas alteraciones nos estimulan a continuar este estudio a fin de determinar su valor como biomarcadores en CRcc.

La cuantificación de CAIX sérica podría ser un potencial marcador para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con CRcc. Los valores de esta enzima se incrementan con la presencia de tumor, son más elevados en los estadios más avanzados y descienden en más del 60% de los pacientes después de la cirugía. Estos datos son de relevancia, ya que para el CRcc no se cuenta, hasta el momento, con marcadores moleculares de utilidad clínica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 353(23):2477-90.
2. Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, y cols. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res* 2006; 66(4):2000-11.
3. Calzada MJ, Esteban MA, Feijoo-Cuaresma M, y cols. von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates the assembly of intercellular junctions in renal cancer cells through hypoxia-inducible factor-independent mechanisms. *Cancer Res* 2006; 66(3):1553-60.
4. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; 4(11):891-9.
5. Tostain J, Li G, Gentil-Perret A, Gigante M. Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment. *Eur J Cancer* 2010; 46(18):3141-8.

6. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 2001; 106(4):148-56.
7. Wood, C.G. Molecular markers of prognosis in renal cell carcinoma: Insight into tumor biology helps define risk and provides targets for therapy. *J Surg Oncol* 2006; 94(4):264-5.

## COMENTARIO EDITORIAL

El trabajo presentado por la Dra. Puricelli describe los resultados de un estudio enfocado a la identificación de biomarcadores del Carcinoma Renal de células claras (CRcc), desarrollado por su equipo de investigación del Instituto Roffo en colaboración con miembros del Hospital Italiano de la Ciudad de Buenos Aires. El estudio presentado tiene gran relevancia en relación al manejo de esta patología, especialmente si se tienen en cuenta: 1) los datos epidemiológicos actualizados que describen su incidencia actual y crecimiento futuro, 2) su sintomatología y características clínicas, y 3) las herramientas actuales para su diagnóstico y seguimiento así como el pronóstico de esta enfermedad. A continuación se comentan algunos aspectos respecto de los tres puntos presentados.

Respecto a los aspectos epidemiológicos, el cáncer de riñón es el séptimo cáncer más común en los hombres y el noveno en las mujeres. Mundialmente se ha estimado que su incidencia es de 0,6 a 14,7 por 100.000 individuos<sup>1</sup>. En un estudio reciente se estimó que específicamente el Carcinoma Celular Renal representaría el 3,8% de las enfermedades de los adultos y el 90-95% de los neoplasmas del riñón en 2010<sup>2</sup>. Contrastando con otros cánceres genitourinarios, su incidencia crece rápidamente (2,5 %/año). El aumento en la incidencia observado puede parcialmente ser explicado por el incremento en el uso del diagnóstico por imágenes (MRI, tomografía computada y ecografía), estudios que han revelado un aumento en la incidencia de los cánceres localizados. De todas maneras, el aumento en las tasas de mortalidad estaría indicando que el aumento de la incidencia no podría justificarse solo por un incremento en la detección de tumores pequeños<sup>3</sup>.

En referencia a su sintomatología y características clínicas, se ha reportado que el Carcinoma Celular Renal se destaca por la ausencia de signos de alarma, así como por sus manifestaciones clínicas diversas y variables y por la resistencia a la radiación y quimioterapia. Si bien ha aumentado la detección de tumores en pacientes asintomáticos por el uso de estudios con imágenes, en 30% de los casos, la enfermedad se presenta en

estadios avanzados; asimismo, el 40% de los pacientes que se someten a resección quirúrgica curativa presenta recurrencia<sup>2,4</sup>.

En relación a las herramientas para su diagnóstico y seguimiento, hasta el presente no se cuenta con métodos objetivos y sensibles para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico del Cáncer Renal, por lo que la identificación de BIOMARCADORES es clave en el manejo de esta enfermedad. Por lo expuesto, la identificación de biomarcadores con valor diagnóstico y pronóstico para el Carcinoma Celular Renal es **altamente relevante**.

Los estudios presentados en este trabajo se han enfocado en la evaluación de un conjunto de proteínas en pacientes con Carcinoma Celular Renal para identificar biomarcadores con valor diagnóstico y pronóstico. Específicamente, los estudios se realizaron sobre muestras de Carcinoma Renal de células claras (CRcc), siendo éste el más frecuente entre los carcinomas celulares renales (70-80%).

Los autores realizaron estudios retrospectivos sobre cortes de tejido de archivo y estudios prospectivos sobre suero de pacientes afectados con la enfermedad. Para los estudios se eligió el seguimiento de proteínas relacionadas con procesos relevantes para este cáncer, como lo refleja un reporte reciente<sup>5</sup>. Los estudios retrospectivos involucraron procedimientos de inmunohistoquímica para una proteína relacionada al proceso de glucólisis (GLUT-1, transportador de glucosa) característico del microambiente tumoral ácido y para 3 proteínas relacionadas a la angiogénesis (VEGFR-2, VEGFR-3, receptores de factor de crecimiento vascular endotelial 2 y 3; PDGF-A, factor de crecimiento derivado de plaquetas-A). Los estudios prospectivos involucraron la evaluación de un conjunto de 43 citoquinas empleando un arreglo de anticuerpos y la cuantificación de una enzima relacionada a la glucólisis (CAIX, anhidrasa carbónica IX) por el método de ELISA. En relación a los casos incluidos en el análisis, los estudios retrospectivos incluyeron muestras de pacientes en diferentes estadios de la enfermedad; por su parte, en los prospectivos también se incluyeron controles sanos y en algunos casos, muestras obtenidas luego del tratamiento quirúrgico terapéutico.

De los resultados obtenidos, se podría proponer a la **anhidrasa carbónica IX sérica** como biomarcador diagnóstico y de seguimiento del CRcc, dado que la evaluación de sus niveles séricos mostró diferencias significativas entre los valores para los controles sanos y los pacientes enfermos, siendo más elevados los correspondientes a los estadios más avanzados, y disminuyendo en más del 60% de los pacientes después de



la cirugía terapéutica. Asimismo, las **citoquinas séricas I-309 (CCL1), IL-1alfa e IL-1beta** podrían proponerse como biomarcadores de estadio del CRcc, dado que los estudios revelaron niveles mayores en los estadios avanzados de la enfermedad respecto de los controles, determinándose además que eran menores al control en los correspondientes a los estadios tempranos de este cáncer. Finalmente, el **VEGFR-2** podría proponerse como biomarcador pronóstico del CRcc, dado que su detección citoplasmática por inmunohistoquímica en secciones de tejido al momento del diagnóstico reveló una asociación entre su detección y la presencia de metástasis.

Debe destacarse que para la evaluación de las proteínas potenciales biomarcadores de diagnóstico y pronóstico del CRcc, el equipo de investigación ha utilizado muestras no invasivas (suero) (biomarcadores de diagnóstico y seguimiento) o muestras obtenidas como parte del proceso de rutina del tratamiento (tejido procesado para evaluación anatómico-patológica) (biomarcador pronóstico). Asimismo, los estudios realizados en el suero para los marcadores de diagnóstico y seguimiento emplearon técnicas estandarizables utilizando “kits” comerciales e involucraron evaluaciones objetivas y cuantificables.

Si bien las evaluaciones reportadas fueron realizadas sobre un número limitado de casos, los autores identifican proteínas con un alto potencial diagnóstico y pronóstico del CRcc, anticipando que los hallazgos podrán consolidarse con un número mayor de muestras y aportar al actual manejo de esta patología.

**Los estudios reportados en el presente trabajo han llevado a la identificación de potenciales biomarcadores para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico del Cáncer Renal de células claras.**

Mónica Vazquez-Levin  
Investigadora Principal  
Consejo Nacional de Investigaciones  
Científicas y Técnicas de Argentina.  
Directora  
Laboratorio de Estudios de Interacción Celular  
en Modelos de Reproducción y Cáncer  
Instituto de Biología y Medicina Experimental  
(IBYME-CONICET).  
[www.ibyme.org.ar](http://www.ibyme.org.ar) - [mbvazl@gmail.com](mailto:mbvazl@gmail.com)

## BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80:827-41.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010; 60:277-300.
3. Chow WH, Devesa SS, Warren JL, y cols. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* 1999; 281:1628-31. [PubMed: 10235157]
4. Janzen NK, Kim HL, Figlin RA, Belldegrun AS. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. *Urol Clin North Am.* 2003; 30:843-52.
5. Biswas S, Charlesworth PJ, Turner GD, Leek R, Thamboo PT, Campo L, Turley H, Dildey P, Protheroe A, Cranston D, Gatter KC, Pezzella F, Harris AL. CD31 angiogenesis and combined expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  are prognostic in primary clear-cell renal cell carcinoma (CC-RCC), but HIF $\alpha$  transcriptional products are not: implications for antiangiogenic trials and HIF $\alpha$  biomarker studies in primary CC-RCC. *Carcinogenesis* 2012; 33(9):1717-25.