



Universidad de Granada

**IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS FACTORES PRONÓSTICOS  
CLÍNICOS E INMUNOGENÉTICOS EN EL  
ADENOCARCINOMA RENAL**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III E INMUNOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO: INMUNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**Fernando Vázquez Alonso**

**GRANADA, 2013**

**Directores de la Tesis:**

José Manuel Cózar Olmo

Francisco Ruiz-Cabello Osuna

Rafael Esteban De la Rosa

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Fernando Vázquez Alonso  
D.L.: GR 736-2014  
ISBN: 978-84-9028-874-0

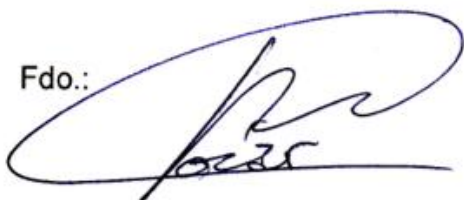
El doctorando Fernando Vázquez Alonso y los directores de la tesis Dr José Manuel Cózar Olmo, Dr Francisco Ruiz-Cabello Osuna y Dr Rafael Esteban De la Rosa, Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 17 de julio de 2013

Director/es de la Tesis

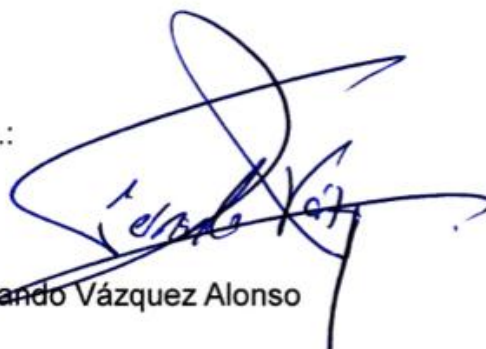
Doctorando

Fdo.:



José Manuel Cózar Olmo

Fdo.:

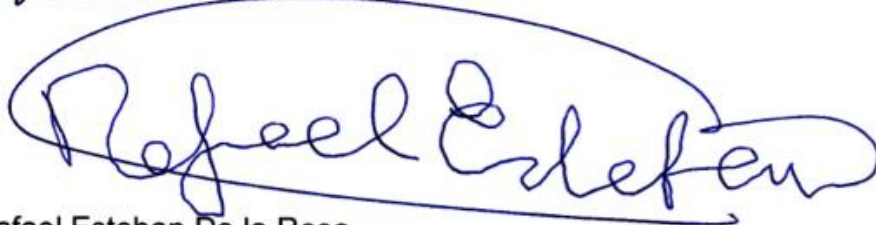


Fernando Vázquez Alonso

Francisco Ruiz-Cabello Osuna



Rafael Esteban De la Rosa



UNIVERSIDAD DE GRANADA



HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III E INMUNOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO: INMUNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

TESIS DOCTORAL

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICOS E  
INMUNOGENÉTICOS EN EL ADENOCARCINOMA RENAL

FERNANDO VÁZQUEZ ALONSO

GRANADA, 2013

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. José Manuel Cózar, director de esta tesis, por su ayuda, dedicación y orientación en la realización de esta tesis doctoral. Por ser mi modelo a seguir y ayudarme con los problemas que han ido surgiendo. Por la confianza depositada en mi.

Al Dr. Francisco Ruiz-Cabello, director de esta tesis, por todo lo que me ha enseñado. Por todos sus buenos y sabios consejos, exigencia y experiencia. Por su disponibilidad y amabilidad siempre que le necesito.

Al Dr. Rafael Esteban, director de esta tesis, por sus continuos ánimos, consejos y aportaciones.

Al Dr. Miguel Tallada, mi jefe y maestro durante mis años de residente.

A todo el Servicio de Urología y al de Análisis Clínicos e Inmunología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, sin cuya colaboración sería imposible la realización de esta tesis. A Paco Rodríguez Herrera por solucionarme los problemas informáticos de última hora, y a Pablo Sáenz-López por la colaboración en estos años.

A los pacientes que han hecho posible este estudio, a sus familias.

A mis padres, por darme la vida y enseñarme a vivirla. Por su apoyo.

A mis hermanos Rafa y Enrique, por sus ánimo, cariño y consejos. A mi cuñada Rosa, por su apoyo.

A mis suegros y cuñados por su ayuda e interés.

A mi mujer, Sandra, por compartir tu vida conmigo, por hacerme feliz.

Publicaciones en revistas científicas relacionadas con esta tesis doctoral:

**Analysis of the expression of HLA class I, proinflammatory cytokines and chemokines in primary tumors from patients with localized and metastatic renal cell carcinoma.**

Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F, Cozar JM, Canton J, Cabrera T, Tallada M, Garrido F, Ruiz-Cabello F.

Tissue Antigens 2006; 68(4):303-10.

**High incidence of CTLA-4 AA (CT60) polymorphism in renal cell cancer.**

Cozar JM, Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F, Vilchez JR, Tallada M, Garrido F, Ruiz-Cabello F.

Hum Immunol 2007; 68(8):698-704.

**A polymorphism in the interleukin-10 promoter affects the course of disease in patients with clear-cell renal carcinoma.**

Romero JM, Sáenz-López P, Cózar JM, Carretero R, Canton J, Vazquez F, Concha A, Tallada M, Garrido F, Ruiz-Cabello F.

Hum Immunol 2009; 70(1):60-4.

**Polimorfismos en genes de respuesta inflamatoria en cáncer renal metastásico.**

Pablo Sáenz-López, Fernando Vázquez Alonso, José M. Romero, Rafael Carretero, Miguel Tallada Buñuel, Francisco Ruiz Cabello, José Manuel Cózar Olmo.

Actas Urol Esp 2009; 33(5): 474-481.

**Impact of interleukin-18 polymorphisms-607 and -137 on clinical characteristics of renal cell carcinoma patients.**

Sáenz-López P, Carretero R, Vazquez F, Martin J, Sánchez E, Tallada M, Garrido F, Cózar JM, Ruiz-Cabello F.

Hum Immunol 2010; 71(3):309-13.

**VEGF polymorphisms are not associated with an increased risk of developing renal cell carcinoma in Spanish population.**

Sáenz-López P, Vázquez F, Cozar JM, Carretero R, Garrido F, Ruiz-Cabello F.

Hum Immunol. 2013;74(1):98-103. doi: 10.1016/j.humimm.2012.10.014.

*Premios obtenidos relacionados esta tesis doctoral:*

- **Premio Sayco al Mejor Trabajo de Investigación** presentado en el XX Congreso de la Asociación Andaluza de Urología por el trabajo “Relación del polimorfismo del CTLA4 con el riesgo de desarrollo de carcinoma renal” el 5 de octubre de 2007. (Vázquez F; Cózar JM; Romero JM; Tallada M; Sáenz-López P; Pascual M; Funes C, Fernández A; Rodríguez F; Martínez A; Vicente J; Espejo E; Ruiz-Cabello F).
- **Segundo Premio “Joaquín Albarrán” al mejor póster** presentado en el LXXIV Congreso Nacional de Urología por el trabajo “Análisis de los cambios de expresión celular de HLA clase I en la progresión tumoral del cáncer renal localizado a metastásico” en junio de 2009. (Vázquez F; Cózar JM; Sáenz-López P; Carretero R; Pascual M; Vicente FJ; Rodríguez AI; Gouttefangeas C; Ruiz-Cabello F; Tallada M).



Trabajos presentados a congresos regionales relacionados con esta tesis doctoral:

Presentación de las siguientes comunicaciones en XX Congreso de la Asociación Andaluza de Urología, celebrado en el Campo de Gibraltar (Cádiz) del 3 al 5 de octubre de 2007:

- Estudio del polimorfismo del gen que codifica el TNF- $\alpha$  en el cáncer renal. (Vázquez F; Cózar JM; Romero JM; Sáenz-López P; Fernández AJ; Pascual M; Funes C; Segura M; Vicente FJ; Martínez A; Rodríguez F; Espejo E; Tallada M; Ruiz-Cabello F).
- Relación del polimorfismo del CTLA4 con el riesgo de desarrollo de carcinoma renal. (Vázquez F; Cózar JM; Romero JM; Tallada M; Sáenz-López P; Pascual M; Funes C; Fernández A; Rodríguez F; Martínez A; Vicente J; Espejo E; Ruiz-Cabello F).

Presentación de las siguientes comunicaciones en el XXI Congreso de la Asociación Andaluza de Urología, celebrado en Córdoba del 8 al 10 de octubre de 2008:

- Polimorfismo de IL-10 como factor pronóstico en el cáncer renal. (Vázquez F; Cózar JM; Romero JM; Sáenz-López P; Carretero R; Pascual M; Funes C; Segura M; Fernández AJ; Rodríguez F; Martínez A; Vicente FJ; Espejo E; Ruiz-Cabello F; Tallada M).

Presentación de las siguientes comunicaciones en el XXII Congreso de la Asociación Andaluza de Urología, celebrado en Granada del 14 al 16 de octubre de 2009:

- HLA clase I en el cáncer renal (CR) localizado y metastásico: análisis de su expresión. (Vázquez F, Cózar JM, Sáenz-López P(\*), Carretero R(\*); Vicente FJ, Pascual M, Funes C, Ruiz-Cabello F(\*), Tallada M).
- Estudio de la influencia de los polimorfismos -607 y -137 de IL18 en el pronóstico del cáncer renal. (Vázquez Alonso F, Cózar Olmo JM, Carretero R(\*), Sáenz-López

P(\*), Funes Padilla C, Segura Sánchez M, Vicente Prados FJ, Ruiz-Cabello Osuna F(\*), Tallada Buñuel M).

Presentación de las siguientes comunicaciones en el XXIII Congreso de la Asociación Andaluza de Urología, celebrado en Islantilla del 6 al 8 de octubre de 2010:

- Asociación del polimorfismo de VEGF -460/VEGF +405 con las características clínicas y como factor de riesgo del cáncer renal (Fernando Vázquez Alonso, Pablo Sáenz-López Garrocha, Rafael Carretero Coca, Francisco Javier Vicente Prados, Antonio Martínez Morcillo, Francisco José Rodríguez Herrera, Francisco Ruiz-Cabello Osuna, José Manuel Cózar Olmo).

Trabajos presentados a congresos nacionales relacionados con esta tesis doctoral:

Presentación de las siguientes comunicaciones en el LXXII Congreso Nacional de Urología, celebrado en La Coruña del 8 al 12 de junio de 2007:

- Estudio del polimorfismo del gen que codifica en TNF-A en el cáncer renal. (Vázquez F; Cózar JM; Romero JM; Sáenz-López P; Fernández AJ; Tallada M, Ruiz-Cabello F).
- Influencia del polimorfismo del antígeno-4 (CTL4) del linfocito T citotóxico sobre el riesgo de desarrollo del carcinoma renal. (Cózar JM; Vázquez F; Romero JM; Tallada M; Martínez A; Vicente J; Fernández A; Pascual M; Funes C; Ruiz-Cabello F).

Presentación de la siguiente comunicación en el XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología, celebrado en Palma de Mallorca del 21 al 24 de mayo de 2008:

- El cáncer renal se asocia a un incremento en la expresión de moléculas HLA de clase I. (Sáenz-López Garrocha P; Vázquez F; Rodríguez AI; Jiménez P; Cózar JM; Tallada M)

Presentación de la siguiente comunicación en el LXXIII Congreso Nacional de Urología,

celebrado en Barcelona del 13 al 16 de junio de 2008:

- Relación del polimorfismo de IL-10 con los parámetros clínicos del carcinoma renal. (Vázquez F; Cózar JM; Romero JM; Sáenz-López P; Carretero R; Pascual M; Funes C; Segura M; Fernández AJ; Rodríguez F; Martínez A; Vicente FJ; Espejo E; Ruiz-Cabello F; Tallada M).

Presentación de la siguiente comunicación en el LXXIV Congreso Nacional de Urología, celebrado en Valencia del 12 al 15 de junio de 2009:

- Análisis de los cambios de expresión celular de HLA clase I en la progresión tumoral del cáncer renal localizado a metastásico (Vázquez F; Cózar JM; Sáenz-López P; Carretero R; Pascual M; Vicente FJ; Rodríguez AI; Gouttefangeas C; Ruiz-Cabello F; Tallada M).

Presentación de las siguientes comunicaciones en el LXXV Congreso Nacional de Urología, celebrado en Bilbao del 11 al 14 de junio de 2010:

- Relación de los polimorfismos -607 y -137 de IL18 con el pronóstico del cáncer renal. (Vázquez Alonso F, Carretero R, Sáenz-López P, Funes Padilla C, Segura Sánchez M, Vicente Prados FJ, Ruiz-Cabello Osuna F, Cózar Olmo JM).
- Asociación del polimorfismo de VEGF -460/ VEGF +405 con las características clínicas del cáncer renal. (Vázquez F, Sáenz-López P, Carretero R, Vicente FJ, Martínez A, Ruiz-Cabello F, Cózar JM).

Presentación de la siguiente comunicación en el LXXVII Congreso Nacional de Urología, celebrado en Vigo del 13 al 16 de junio de 2012:

- Análisis de la relación de los polimorfismos de VEGF como factor de riesgo y pronóstico del carcinoma de células renales. (Vázquez Alonso, F.; Sáenz-López, P; Berrio Campos, R; Carretero Coca, R.; Vicente Prados, F.J.; Garrido Torres-Puchol, F.; Ruiz-Cabello Osuna, F.; Cózar Olmo, J.M.).

Trabajos presentados a congresos internacionales relacionados con esta tesis doctoral:

Presentación de la siguiente comunicación en el 2th International Congress, Immune-mediated diseases, celebrado en Moscú (Rusia) del 10 al 14 de septiembre de 2007:

- Incidence of CTLA4 polymorphisms on the risk of development of renal cell cancer. (Romero Jose Maria; Jose Manuel Cozar; Natalia Aptsiauri; Fernando Vazquez; Jose Ramon Vilchez; Victor Garcia; Antonia Collado; Miguel Tallada; Federico Garrido; Francisco Ruiz-Cabello).

Presentación de las siguientes comunicaciones en el 2º European Congress of Immunology, celebrado en Berlín (Alemania) del 13 al 16 de septiembre de 2009:

- Impact of interleukin -18 Polymorphism -607 and -137 on clinical characteristic renal cell carcinoma. (P. Saenz-Lopez, R. Carretero, F. Vazquez, A.I. Rodriguez, J. Martin, E. Sanchez. J.M. Cozar, F. Ruiz-Cabello).
- Association between VEGF Polymorphism and renal cell cancer risk and clinical parameters. (P. Saenz-Lopez, R. Carretero, F. Vazquez, J. Canton, M. Bernal, M. Tallada, F. Garrido, J.M. Cozar, F. Ruiz-Cabello).

Presentación de las siguientes comunicaciones en el XXX Congreso de la Confederación Americana de Urología, celebrado en Santiago de Chile (Chile) del 8 al 11 de septiembre de 2010:

- Relación de los polimorfismos genéticos -607 y -137 de IL18 con el pronóstico del cáncer renal. (Cózar JM, Vázquez F, Carretero R, Sáenz-López P, Segura M, Vicente J, Ruiz-Cabello F).
- Análisis de los cambios de expresión celular de HLA clase I en la progresión tumoral del cáncer renal localizado al metastásico. (Cózar JM, Vázquez F, Sáenz-López P, Carretero R, Pascual M, Vicente J, Rodríguez AI, Gouttefangeas C, Ruiz-Cabello F).
- Asociación del polimorfismo de VEGF -460/VEGF +405 con las características clínicas y como factor de riesgo del cáncer renal. (Cózar JM, Vázquez F, Sáenz-López P, Carretero R, Vicente J, Martinez A, Ruiz-Cabello F).

Presentación de la siguiente comunicación en el XXXI Congreso de la Confederación

Americana de Urología, celebrado en Cartagena de Indias (Colombia) del 4 al 9 de septiembre de 2012:

- Polimorfismos de VEGF como factor de riesgo y pronóstico del cáncer renal. (Vázquez Alonso F, Sáenz-López P, Puche Sanz I, Berrio Campos R, Carretero Coca R, Vicente Prados FJ, Garrido Torres-Puchol F, Ruiz-Cabello Osuna F, Cózar Olmo JM).

# ÍNDICE GENERAL

<b>I. ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO</b> .....	15
<b>II. RESUMEN</b> .....	17
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	21
1. Epidemiología del cáncer renal .....	22
2. Factores de riesgo.....	23
3. Etiopatogenia	
3. 1. Oncopatogénesis del cáncer renal.....	25
3.2. Papel del gen del VHL en la oncogénesis. Importancia de la hipoxia .....	31
4. Clínica	
4.1. Manifestaciones locales.....	33
4.2. Manifestaciones sistémicas.....	34
5. Estadiaje.....	35
6. Factores pronósticos	
6.1. Factores anatómicos.....	39
6.2. Factores clínicos y analíticos.....	42
6.3. Factores anatomopatológicos.....	43
6.4. Factores moleculares.....	45
6.5. Nomogramas predictivos.....	46
7. Tratamiento del cáncer renal	
7.1. Tratamiento del cáncer renal localizado.....	49
7.2. Tratamiento del cáncer renal avanzado.....	50
7.3. Adyuvancia.....	51
7.4. Neoadyuvancia.....	52

<b>III. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b> .....	54
<b>IV. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS</b> .....	57
1. Análisis de la expresión de HLA clase I, citoquinas proinflamatorias y quimioquinas en tumores primarios de pacientes con carcinoma de células renales localizado y metastásico .....	60
2. Alta incidencia del polimorfismo CTLA-4 AA (CT60) en cáncer renal .....	85
3. Polimorfismos en genes de respuestas inflamatoria en cancer renal metastásico.....	102
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	112
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	129
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	133

## I. RELACIÓN DE LAS PRINCIPALES ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

ADN.....	Ácido DesoxiriboNucleico
CA IX .....	Carbonic anhydrase IX
CR.....	Cáncer renal
CRCC.....	Cáncer renal de células claras
HLA .....	Human Leukocyte Antigen
IL-2.....	Interleukina 2
INF.....	Interferón alfa
MSKCC.....	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
TCR.....	T cell receptor
VEGF.....	Vascular endotelial growth factor
VHL.....	Von Hippel-Lindau





## RESUMEN

Numerosas evidencias indican que la respuesta inflamatoria, desencadenada en el microambiente tumoral, juega un papel crítico en el inicio, desarrollo, crecimiento y metástasis del cáncer, siendo la infiltración tanto por células de la inmunidad innata como adaptativa, un dato bien documentado en el cáncer renal.

En nuestro trabajo hemos querido abordar dos aspectos esenciales en la interacción sistema inmune-tumor. Por una parte hemos querido conocer las características inmunogénicas del cáncer renal, analizando la expresión de antígenos HLA y la expresión de factores inmunológicos (citocinas y quimiocinas) fuertemente implicadas en la reacción inflamatoria que acompaña al cáncer. Estos análisis se han llevado a cabo tanto en tejido normal autólogo adyacente, como en el tejido tumoral. Por otra parte, se han analizado factores inmunogénicos (polimorfismos genéticos) que regulan la intensidad del proceso inflamatorio, y los hemos evaluado en el contexto del riesgo y de otros parámetros clínico-patológicos del cáncer renal.

La investigación de los cambios en la expresión de HLA-hc, B2m en el tumor con la progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer renal, se ha realizado mediante técnicas inmunohistoquímicas y RT-PCR cuantitativa. El análisis de la expresión de citocinas y quimiocinas se realizó mediante RT-PCR a tiempo real. Finalmente los polimorfismos genéticos se han investigado usando tecnología Taqman. Nuestros resultados demuestran un incremento notable tanto a nivel de ARN como a nivel protéico de los genes HLA de clase I, deduciendo que la transformación neoplásica conlleva la neoexpresión de estas moléculas. En cambio, la expresión de estos genes disminuyó significativamente en pacientes que habían desarrollado metástasis. Estos cambios se han podido correlacionar con los observados en la mayoría de las citocinas y quimiocinas analizadas con la excepción de SDF-1. En nuestro estudio, el grupo tumoral muestra una alta expresión de genes que codifican citoquinas, quimioquinas atrayentes de macrófagos y linfocitos T, moléculas implicadas en la extravasación de leucocitos desde la circulación sanguínea a los tejidos. Además es posible que algunas de las citocinas expliquen al

menos en parte los cambios cuantitativos observados en las moléculas HLA analizadas.

No hemos encontrado significación en el análisis de las citocinas de la inmunidad innata al compararlos con parámetros de riesgo o de progresión del cáncer renal. No se ha encontrado asociación con riesgo de cáncer renal en los polimorfismos estudiados de las citocinas: IL10, IL4, TNF-A, IL1-A, y en las quimiocinas: RANTES y MCP-1. Por el contrario, sí se ha observado que individuos heterocigotos para el polimorfismo -1082 de IL10(A/G), presentan tumores de mayor tamaño, afectación ganglionar y estadios tumorales más avanzados. Estos resultados pueden explicarse por la acción pleiotrópica de IL-10 sobre el crecimiento tumoral presentando a la vez un efecto antiangiogénico (antitumoral) e inmunosupresor (protumoral).

Finalmente polimorfismos genéticos que influyen en una mayor expresión de CTLA-4 en la superficie de las células T, o de la forma soluble de este receptor, se encuentran asociados a riesgo de cáncer renal. CTLA-4 juega un papel central en la regulación de la activación de las respuestas adaptativas, inhibiendo el programa de activación de los linfocitos T desde las etapas iniciales. Por tanto, nuestros resultados sugieren que una menor activación de respuestas celulares T podrían favorecer el desarrollo neoplásico. De estos resultados se puede desprender que mientras los componentes de la inmunidad innata analizados no parecen modificar el riesgo ni los parámetros clínico-patológicos de esta neoplasia, algunos de los componentes que regulan las respuestas adaptativas sí pueden influenciar el curso de esta neoplasia,



# INTRODUCCIÓN

## **1. Epidemiología del cáncer renal**

El carcinoma renal (CR) constituye el 2,6% de todas las neoplasias malignas primarias del adulto, es la undécima neoplasia más frecuente en el varón y ocupa el decimoquinto lugar en la mujer (GLOBOCAN 2008; EUROCAN 2008). Es la causa del 3% de las muertes por cáncer (Ferlay et al, 2007).

Según los registros epidemiológicos de base poblacional mas potentes como es GLOBOCAN y EUCAN, en sus últimos datos publicados en 2008 el CR presenta una tasa de incidencia en torno al 7.5 - 8 casos por cada 100.000 personas y año. La mayor incidencia se produce a partir de los 40 años, con pico entre los 50 y los 70 años (Ljungberg et al, 2011; Aron et al, 2008; Hew et al, 2012) y la incidencia según el sexo varía entre los diferentes estudios publicados, desde el 3:1 en varones respecto a la de mujeres comunicado por Ljungberg et al en 2011 hasta casi igualarse entre ambos sexos con una proporción de 1.2:1 cuando la población es mayor de 70 años, publicado por Hew et al en 2012. La variedad histológica de células claras del CR constituye el 85% de las neoplasias malignas primarias del riñón.

La incidencia del CR ha aumentado progresivamente en las últimas cuatro décadas en España y en el resto del mundo occidental, a razón de un 3% anual (Chow et al, 1999; Mathew et al, 2002; Pascual et al, 2008). Este aumento puede estar motivado, en gran parte, por la mejor disponibilidad de técnicas radiológicas para el diagnóstico de otros

procesos abdominales, generalmente digestivos, lo que ha conllevado un aumento de la detección de tumores renales incidentales. Sin embargo, añadido a la mayor detección de tumores en estadios precoces, también se observa un incremento en el diagnóstico de CR en estadios avanzados, esta mayor incidencia afecta a ambos sexos, y la detección incidental de tumores por estudios radiológicos abdominales no explica por completo el incremento mencionado en la incidencia.

La incidencia por Comunidades Autónomas en España (Cozar et al, 2012), con una media entorno a 10/100.000/año, es la siguiente:

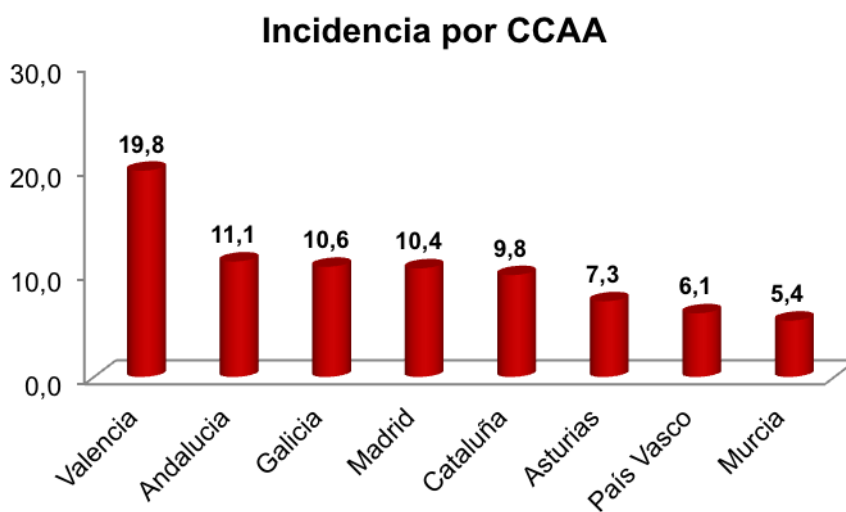


Fig.1.- Incidencia del CR por 100.000 hab y año en las 8 CCAA estudiadas.

## 2. Factores de riesgo

Varios factores de riesgo tienen demostrada su influencia en el desarrollo del carcinoma renal, aunque los mecanismos de esta relación no son bien conocidos.

### - Tabaco

El tabaquismo se considera el factor de riesgo más claramente relacionado con el CR. Se ha propuesto como mecanismo añadido a la exposición de los compuestos carcinógenos del tabaco, el efecto de la hipoxia crónica causada por el monóxido de carbono y la disminución de la función pulmonar (Sharifi et al, 2006).

La relación es dosis-dependiente acumulativa, y el riesgo parece disminuir tras el



cese del hábito, pero sólo a partir de al menos 10 años tras la interrupción. El riesgo es proporcional al número de cigarrillos diarios consumidos. El riesgo relativo se incrementa desde 1.6 en los fumadores de 1-9 cigarrillos al día, a 2.03 en los varones que fuman más de 20 cigarrillos al día (Jay et al, 2005). Se ha comunicado un incremento del 38% del riesgo de padecer CR en los expuestos al tabaco (Cho et al, 2001).

### - Obesidad

Existe una relación entre CR y obesidad demostrada en estudios de cohortes. Existe un metaanálisis de 17 estudios, encontrando que el tabaco incrementa el riesgo de CR en un 24% para los hombres y en un 34% para las mujeres (Renehan et al, 2008). En un estudio de cohortes sobre más de 160000 pacientes, el riesgo aparece en mujeres a partir de un índice de masa corporal de 25, y en varones a partir de 30kg/m<sup>2</sup> (Setiawan et al, 2007). Se ha comunicado una asociación entre la obesidad y el pronóstico de la enfermedad a largo plazo (Waalkes et al, 2001).

Como mecanismos patogénicos se han propuesto cambios hormonales inducidos por la obesidad que producen elevados niveles de insulina y esteroides sexuales. La peroxidación lipídica y el estrés oxidativo que acompaña a la obesidad pueden causar daños en el DNA. Las adipokinas, como la adiponectina, pueden estar conectadas con mecanismos relacionados con la tumorigénesis. Este polipéptido tiene un demostrado efecto antiangiogénico (Brakenhielm et al, 2004). Por razones no bien conocidas, sus valores plasmáticos están descendidos en los individuos con sobrepeso (Arita et al, 1999).

El tabaco y la obesidad son dos factores de riesgo clínicamente relevantes; así en las Guías Clínicas de la Asociación Europea de Urología se recomiendan como medidas preventivas del CR no fumar y evitar la obesidad (Ljungberg et al, 2010).

### - Hipertensión

Los niveles de tensión arterial sistólica superiores a 160 mmHg y tensión arterial diastólica superiores a 100 mmHg suponen un riesgo dos veces superior al de la población general para padecer CR.

Estudios en ratas han relacionado el uso de furosemida e hidroclorotiazida con el crecimiento de tumores renales (McLaughlin et al, 2000). Aunque se ha intentado vincular el uso de fármacos hipertensivos con el desarrollo de la enfermedad, la propia hipertensión supone un factor de confusión y no se ha demostrado. El mecanismo

patogénico que relaciona el CR con la hipertensión es desconocido.

- Insuficiencia renal crónica y diálisis

El 45% de los pacientes en diálisis por insuficiencia renal crónica terminal desarrollan enfermedad renal quística adquirida, independientemente del tipo de diálisis al que hayan sido sometidos, de la edad o del origen de la enfermedad renal (Bretan et al, 1986). La incidencia de la afección aumenta con la duración de la diálisis, alcanzando casi el 80% en pacientes en tratamiento durante más de tres años (Ishikawa, 1991). El hecho de padecer enfermedad quística adquirida de la diálisis es un factor de riesgo por sí solo para desarrollar cáncer renal (Stewart et al, 2003). Las neoplasias son generalmente de pequeño tamaño (menores de 3 cm) y frecuentemente bilaterales y multifocales, siendo la tasa de metástasis del 20%.

- Factores ocupacionales

Varios estudios epidemiológicos han buscado relación entre el CR y exposición a determinados productos industriales. Se ha estudiado el posible papel de determinados productos, como el asbesto (Sali et al, 2000), derivados del petróleo (Lohi et al, 2008) y pesticidas. Sin embargo, los datos son contradictorios y son necesarias nuevas investigaciones.

- Hábitos alimenticios

La diferencia de incidencia del CR entre los países occidentales y Asia sugiere que pueda existir una influencia dietética. Varios estudios casos y control han sugerido que existe una relación entre la ingesta de grasas y proteínas y el desarrollo de cáncer renal. Sin embargo, estos efectos no han sido claramente establecidos (Lee et al, 2008).

- Riesgo genético y carcinoma renal hereditario

Alrededor del 4% de los carcinomas renales están asociados a síndromes hereditarios. En la enfermedad esporádica, el riesgo de padecer CR se incrementa un 50% si el familiar afectado es el padre o la madre y hasta cuatro veces si es un hermano (Dong et al, 2001).

### 3. Etiopatogenia

#### 3.1. Oncopatogénesis del cáncer renal

El estudio epidemiológico del CR demuestra que éste puede presentarse de dos formas, esporádico o familiar, diferenciándose en que mientras el primero suele ser unifocal, unilateral y de aparición entre la cuarta y sexta década de la vida, el segundo suele ser multifocal, bilateral y de aparición en edades más tempranas de la vida. Las formas de presentación de cáncer renal hereditario más conocidas son:

- a) el carcinoma renal asociado a la enfermedad de Von Hippel Lindau (VHL)
- b) el carcinoma renal de células claras hereditario
- c) el carcinoma renal papilar hereditario
- d) el oncocitoma renal hereditario.

En las últimas dos décadas, conforme se han ido desarrollando y mejorando las técnicas de inmunohistoquímica y de biología molecular, se han estudiado las alteraciones citogenéticas que se producen tanto en el CR de aparición esporádica como en el de presentación familiar, así como en los distintos tipos histológicos: carcinoma renal de células claras (CRCC), carcinoma renal papilar y carcinoma renal de células cromóforas. A lo largo de estos años, numerosos estudios clínicos y cito-genéticos han ido aportando información sobre las piezas que componen el puzzle de las alteraciones genéticas y mecanismos moleculares que conducen a su carcinogénesis y, aunque dicho puzzle no esté totalmente terminado, los conocimientos generados son actualmente útiles y aplicables en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del CR.

En el CRCC, todos los estudios realizados han confirmado que la pérdida de ADN en el brazo corto del cromosoma 3 es el evento más importante y característico para el desarrollo del mismo, encontrándose dicha alteración en el 75% de los casos. Por el contrario, no se han encontrado pérdidas de ADN en el cromosoma 3p en el carcinoma renal papilar, ni en los oncocitomas, pero sí en el 25% de los carcinomas de células cromóforas (Cózar et al, 2004).

Históricamente, en el estudio del CRCC de presentación esporádica o familiar la pérdida de material genético en el cromosoma 3 (Fig.2), fue la alteración genética más característica descrita en la década de los 80 (Knudson, 1985; Zbar et al, 1987). La hipótesis que postularon estos autores fue que en el brazo corto del cromosoma 3p podría encontrarse un gen supresor de este tumor, que estando presente sería capaz de prevenir el desarrollo del tumor, mientras que su pérdida lo permitiría. Un gen tumoral supresor es un gen cuya función normal es la de regular o controlar el crecimiento celular, existiendo dos copias de cada gen, por lo que es preciso que muten o se pierdan ambas copias para provocar una desregulación del crecimiento celular y desarrollarse el tumor. A la luz de estos hallazgos, Knudson propuso la teoría “two-hit” para explicar la carcinogénesis del cáncer renal en sus dos formas de presentación, esporádica y familiar (Fig. 3):

- A) CRCC esporádico, en el que las células son genéticamente normales y para que se desarrolle el tumor deben producirse dos mutaciones para inactivar las dos copias del gen tumoral supresor existentes en el cromosoma 3p (Fig. 2A). Estas mutaciones son inducidas por agentes exterior, medioambientales y ocurre en tejidos maduros. La inactivación puede ocurrir por mutación o hipermetilación del gen. Como tal hecho es relativamente infrecuente (dos mutaciones sobre el mismo gen) suele suceder en una sola célula y lleva un largo periodo de tiempo, lo que explicaría que el CRCC esporádico fuese unifocal y de presentación en edades tardías (4<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> década).
  
- B) CRCC de presentación familiar, en éste existe una alteración genética congénita, esto es, la primera mutación o pérdida de una de las copias del gen supresor es inherente, ocurre durante la embriogénesis precoz y afecta a todas las células de un órgano dado. Posteriormente, será precisa sólo una mutación del único gen supresor restante, causada por cualquier agente externo medioambiental, para producir la inactivación o pérdida completa del gen supresor, permitiendo el desarrollo del tumor (Fig. 2B). Como la probabilidad de que ocurra una sola mutación es mayor que la probabilidad de dos mutaciones en el mismo locus de la misma célula, y suele ocurrir sobre múltiples células,

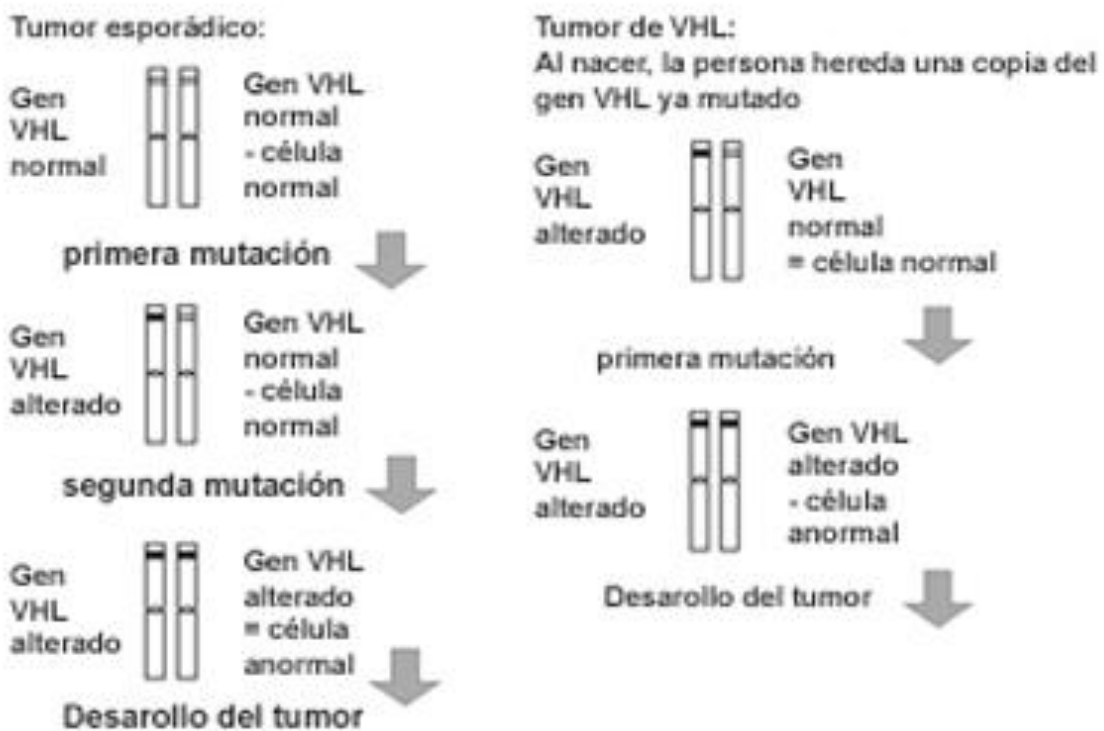
## Introducción

explicaría el hecho de que los CRCC familiares sean multifocales y bilaterales, sincrónicos o no, y se presenten a edades más tempranas (la mayoría antes de los 50 años).

Fig. 2. Gen VHL



Fig. 3. Oncogénesis del cáncer renal



El estudio del cariotipo y los análisis más recientes de la genética molecular mediante métodos como el de RFLP (restriction-fragment-length-polymorphism), o de LOH (loss of heterocigosity), que estudia la pérdida de heterocigosidad o pérdida de alelos (ambos métodos indican si existe o no pérdida de secuencias de ADN), confirman estos hallazgos, demostrando que la pérdida o delección de material genético (gen supresor tumoral) a nivel del brazo corto del cromosoma 3 es la alteración genética más típica del CRCC, jugando un papel crítico en su carcinogénesis.

Posteriores estudios han intentado delimitar las localizaciones o regiones específicas de estas pérdidas, revelando que las pérdidas o delecciones intersticiales se pueden producir en distintas bandas del cromosoma 3p: desde 3p11 hasta 3p21 (Fig.1), y en la región 3p25-26, lo que indicaría que cada pérdida o delección contendría un locus del gen o genes tumorales supresores del CRCC, desencadenando dichas pérdidas la carcinogénesis (Anglard et al, 1991; Lubensky et al, 1996).

La hipótesis que comparten la mayoría de los autores es que existirían al menos dos genes supresores tumorales, uno situado en la región 3p25-26 o gen supresor tumoral VHL (Linehan et al, 1995), y otro más proximal al centrómero, situado en la región 3p14 o entre 3p13-21 (Kaye, 1999). Su mutación por traslocación o su delección serían responsables del desarrollo de un CRCC esporádico o familiar.

En el CRCC familiar o hereditario se han descrito dos tipos de alteración genética a nivel del cromosoma 3:

- 1) El CRCC hereditario caracterizado genéticamente por presentar una mutación por traslocación a nivel del cromosoma 3. En general, el 50% de los miembros de la familia desarrollaron un CRCC (Enquist et al, 1999).

- 2) El CRCC hereditario asociado con la enfermedad de Von Hippel-Lindau (VHL), enfermedad hereditaria de transmisión autosómica dominante, en la que los pacientes afectados desarrollan quistes o carcinomas renales múltiples y bilaterales, y además pueden presentar múltiples hemangiomas de retina y sistema nervioso central, y tumores

pancreáticos benignos o malignos. Se estima que el 50% de estos pacientes desarrollarán quistes renales múltiples y un 30% desarrollarán un CRCC (similar al observado en los pacientes con cáncer renal esporádico). El estudio genético demostró que la anomalía presente en la mayoría de los casos era la pérdida o delección genética a nivel del brazo corto del cromosoma 3 (3p), por lo que se profundizó en el estudio de esta región, encontrando que en la región 3p25-26 se sitúa un gen supresor de la enfermedad de VHL, que se denominó gen VHL, (Fig.1), y cuya pérdida sería responsable de la iniciación del CRCC (Linehan et al, 1995).

Aunque la alteración del gen VHL puede ser igualmente responsable de la aparición del CRCC esporádico no familiar, encontrándose pérdida de la heterocigosidad del gen VHL en el 84% de ellos, hay autores que creen que las mutaciones del gen VHL observadas en el CRCC esporádico son distintas de las observadas en el CRCC familiar, diferenciándose en el número del exón del gen en el que se produce la mutación (en el CRCC esporádico suele ser en el 2º exón) (Gnarra et al, 1994).

Además de esta típica alteración genética del cromosoma 3p, se han encontrado otras alteraciones cromosómicas en el CRCC que en orden de frecuencia son las siguientes:

Tabla1

Tipo histológico	Alteraciones moleculares
CR de células claras	3p(25); 5q; 8p; 9p; 14p
CR papilar tipo I	7q(31); 17p; 9p; 11q; Y
CR papilar tipo II	1q(42); 14q, 17p,21 q
CR cromóforo	17p (11); 1p; 2p; 6p; 13q; 21q; Y
CR de los ductos colectores	18; Y, 1q; 6p; 8p; 13q;21p

Tabla 2; síndromes hereditarios asociados a CR

Síndrome	Tipo de CR	Alteración genética
----------	------------	---------------------

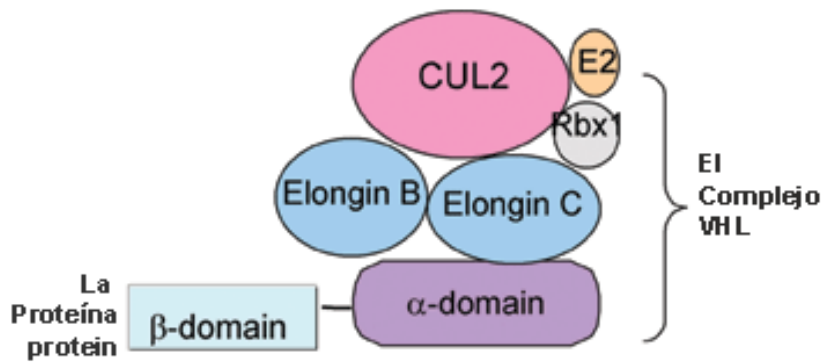
Sd. Von Hippel-Lindau	CR células claras bilateral y múltiple	VHL (3p25-26)
Translocaciones Cr 3	“	Desconocida, probable VHL
CR de células claras familiar	CR células claras solitarios y unilaterales	Desconocidas
Paraganglioma hereditario	CR células claras	SDHB (1p36)
Esclerosis Tuberosa	Angiomiolipomas y CR células claras	TSC1(9q34), TSC2 (16p13)
CR papilar hereditario	CR papilar múltiple y bilateral	c-MET (7q31)
Sd Reed o leiomiomatosis uterina	CR papilar solitario y unilateral	FH (1q42-43)
Sd hiperparatiroideo	CR papilar, hamartomas renales y tm. Wilms	HRPT (1q25-32)
Sd Birt-Hogg-Dube	CR células claras, oncocitoma y cromóforos	BHD (17p11)
Cancer tiroides familiar papilar	CR papilar y oncocitomas	Desconocido

### 3.2. Papel del gen VHL en la oncogénesis. Importancia de la hipoxia.

La función de la proteína del VHL radica en la participación en un complejo supresor tumoral, el complejo VHL, que interacciona con el factor inducido por hipoxia (HIF $\alpha$ ) y que fisiológicamente funciona de forma diferente en presencia o ausencia de oxígeno (Fig.4).

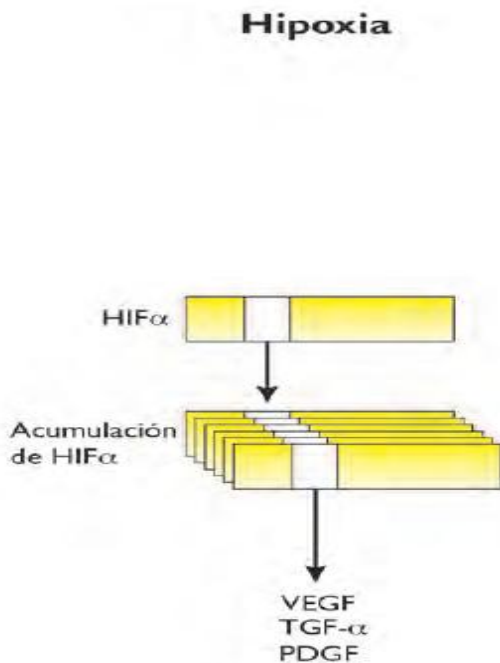


Fig.4



En presencia de O<sub>2</sub>, la proteína del VHL permite la degradación por el proteosoma del HIF $\alpha$  hidroxilado (Fig.5).

Fig.5

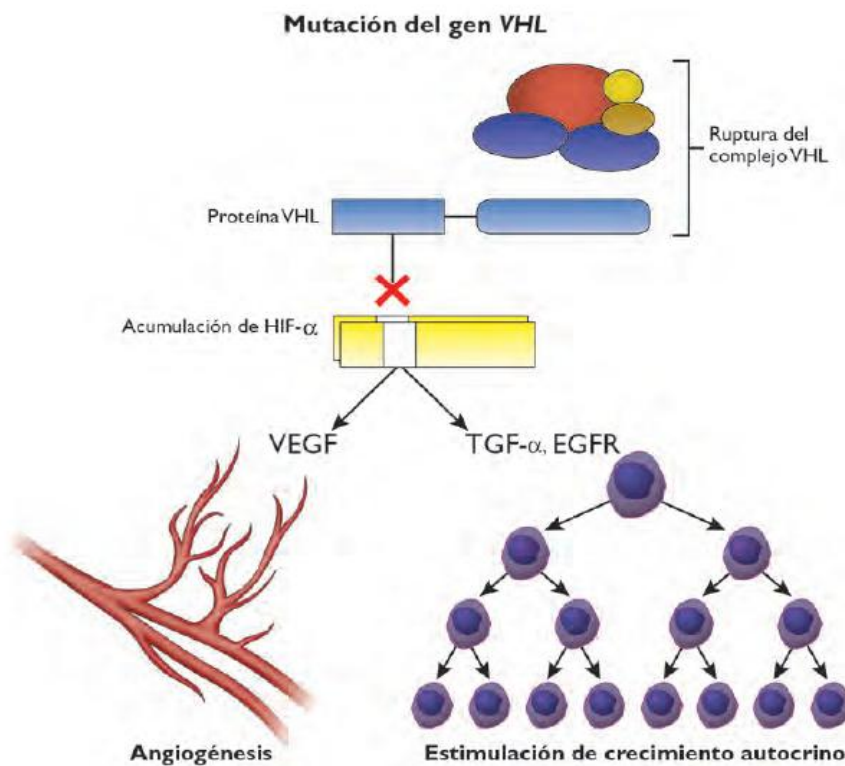


En condiciones de hipoxia, dicho marcaje o ubiquitinización no se produce (no actúa la proteína del VHL) y la subunidad  $\alpha$  del HIF se une a la  $\beta$  y pasa al núcleo, donde activa diferentes genes que activan la angiogénesis.

Si el gen del VHL está mutado, pese a condiciones de normoxia, se desencadena

del mismo modo la angiogénesis; este modelo corresponde a lo que ocurre en el CR y otros tumores (Fig.6):

Fig. 6: mutación del gen VHL (en normoxia)



#### 4. Clínica

La manifestación clínica del CR es extraordinariamente diversa; con cierta frecuencia permanece silente, siendo descubierto de manera casual en distintas exploraciones o durante una autopsia. Puede también presentarse con alteraciones muy sugestivas de proceso expansivo renal, y en otras ocasiones, debuta con manifestaciones clínicas derivadas de la presencia de metástasis. Se pueden clasificar las manifestaciones clínicas del CR según sea la afectación local o sistémica. Dentro de estas últimas se incluyen los síndromes paraneoplásicos y aquellas manifestaciones ocasionadas por

enfermedad metastásica.

#### 4.1. Manifestaciones locales

Aunque la presentación clásica del CR incluye la triada de Guyon de dolor en el flanco, hematuria y masa abdominal palpable, pocos pacientes se presentan ahora de esta manera. De manera aproximada la mitad de los casos se detectan incidentalmente durante la realización de pruebas de imagen. Otra forma de presentación común viene dada por la presencia de sintomatología inespecífica como fatiga, pérdida de peso y anemia.

- Otros signos

Ocasionalmente se produce de manera aguda la denominada triada de Wunderlich (dolor lumbar agudo, shock hipovolémico y masa en flanco), causada por la existencia de un hematoma perirrenal secundario a rotura tumoral. Las manifestaciones provocadas por la oclusión completa de la vena cava inferior pueden producir, en ocasiones, edemas en miembros inferiores, circulación colateral, estos últimos aquellos causados por sustancias producidas, o no, normalmente por los riñones.

- Manifestaciones secundarias a enfermedad metastásica

Las manifestaciones clínicas son muy variadas, incluyendo el dolor pleurítico, hemoptisis, epistaxis, hemorragia gastrointestinal, dolor óseo, fracturas patológicas, priapismo, hemorragias vaginales, lesiones cutáneas, nódulos tiroideos, cefalea, alteraciones mentales, etc...

#### 4.2. Manifestaciones sistémicas

- Síndrome paraneoplásico

Se define como el complejo sintomático que se presenta en los pacientes que tiene cáncer y que no puede explicarse por diseminación local o distante del tumor, o por elaboración de hormonas del tejido del que procede el tumor (Stolinski et al, 1980). El CR es la neoplasia urológica que más frecuentemente se asocia a síndromes paraneoplásicos. Los síndromes paraneoplásicos pueden ser inespecíficos y específicos, comprendiendo estos últimos aquellos causados por sustancias producidas, o no, normalmente por los riñones.

Dentro de los inespecíficos, están la anemia, fiebre, neuropatía y la disfunción

hepática; en los específicos están descritos la hipertensión, eritrocitosis y la hipercalcemia.

- *Manifestaciones secundarias a enfermedad metastásica*

Las manifestaciones clínicas son muy variadas, incluyendo el dolor pleurítico, hemoptisis, epistaxis, hemorragia gastrointestinal, dolor óseo, fracturas patológicas, priapismo, hemorragias vaginales, lesiones cutáneas, nódulos tiroideos, cefalea, alteraciones mentales, etc.

## 5. Estadiaje

El estadiaje clínico de los tumores renales es muy importante para establecer su pronóstico evolutivo, la elección terapéutica y la estrategia quirúrgica. En la actualidad se utilizan dos sistemas de estadiaje, la clasificación de Robson y el sistema TNM. La clasificación de Robson (Robson et al, 1969) es menos utilizada actualmente, y aunque es sencilla y clara, en su contra se aduce que no tiene en cuenta el volumen del tumor primario y que combina estadios que pueden tener pronósticos muy diferentes.

Tabla 3. Clasificación de Robson.

<b>Etapa</b>	<b>Características</b>
I	Confinado al parénquima renal
II	Invade grasa perirrenal
IIIA	Afecta vena renal o vena cava inferior
IIIB	Invade ganglios linfáticos regionales
IIIC	Afecta vasos locales y ganglios regionales
IVA	Invade órganos vecinos
IVB	Metástasis a distancia

Fig. 7. Clasificación de Robson.



La clasificación TNM es la que se recomienda para el uso clínico y científico. Sin embargo, la clasificación TNM requiere mejoras continuas; la versión 2009 es la más reciente, con una serie de mejoras como la subclasificación de los tumores T1 y T2, y los cambios con respecto a la invasión de la vena renal (pasa de T3b a T3a) y la invasión de la glándula suprarrenal (de T3a a T4), de manera que queda de este modo (Ljungberg et al, 2010):

Tabla 4. Clasificación TNM 2009.

<b>T- Tumor primario</b>			
TX	No se puede evaluar el tumor primario		
T0	Ausencia de datos de tumor primario		
T1	Tumor ≤ 7 cm en su dimensión máxima, limitado al riñón		
	T1a	Tumor ≤ 4 cm en su dimensión máxima, limitado al riñón	
	T1b	Tumor > 4 cm pero ≤ 7 cm en su dimensión máxima	
T2	Tumor > 7 cm en su dimensión máxima, limitado al riñón		
	T2a	Tumor > 7 cm pero ≤ 10 cm en su dimensión máxima	
	T2b	Tumor > 10 cm limitado al riñón	
T3	El tumor se extiende a venas importantes o invade directamente las glándulas suprarrenales o los tejidos perirrenales, pero no la glándula suprarrenal ipsolateral ni sobrepasa la fascia de Gerota		
	T3a	El tumor se extiende macroscópicamente a la vena renal o sus ramas segmentarias (con músculo) o el tumor invade la grasa perirrenal o del seno renal (peripélvica) pero no sobrepasa la fascia de Gerota	
	T3b	El tumor se extiende macroscópicamente a la vena cava por debajo del diafragma	
	T3c	El tumor se extiende macroscópicamente a la vena cava por encima del diafragma o invade la pared de la vena cava	
T4	El tumor invade sobrepasando la fascia de Gerota (incluida la extensión por contigüidad a la glándula suprarrenal ipsolateral)		
<b>N- Ganglios linfáticos regionales</b>			
NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales		
N0	Ausencia de metástasis ganglionares regionales		
N1	Metástasis en un sólo ganglio linfático regional		
N2	Metástasis en más de un ganglio linfático regional		
<b>M- Metástasis a distancia</b>			
M0	Ausencia de metástasis a distancia		
M1	Metástasis a distancia		
<b>Agrupación en estadios TNM</b>			
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Estadio IV	T4	Cualquier T	M0
	Cualquier T	N2	M0
	Cualquier T	Cualquier T	M1

## 6. Factores pronósticos

La determinación adecuada de factores pronósticos ayudaría a plantear la estrategia terapéutica más apropiada en cada caso, dirigir futuros tratamientos y desarrollar esquemas específicos de seguimiento para cada paciente.

Se pueden clasificar los diferentes factores pronósticos estudiados hasta el momento en cuatro grupos: Anatómicos, clínicos, histológicos y moleculares.

## FACTORES PRONÓSTICOS DEL CARCINOMA RENAL

### ANATÓMICOS

Tamaño tumoral

Extensión tumoral

Afectación cápsula renal

Afectación sistema colector

Afectación suprarrenal

Afectación linfática

Afectación vascular

Metástasis a distancia

### CLÍNICOS y ANALÍTICOS

Sintomatología

Performance status

Trombocitosis

Caquexia

Neutrofilia

### HISTOLÓGICOS

Grado tumoral

Tipo histológico

Rasgo sarcomatoide

Necrosis

### MOLECULARES



Introducción

CA IX

VEGF

Ki67

p53

Con ellos, diferentes grupos de trabajos han desarrollado nomogramas, a modo de algoritmos pronósticos, con el objetivo de facilitar la toma de decisiones en el paciente con CR.

### 6.1. Factores anatómicos

Estos factores quedan globalmente recogidos en la clasificación TNM 2009 y por tanto en el sistema de estadiaje comúnmente utilizado en la práctica diaria.

#### Estadio Tumoral

Como es evidente, los pacientes con tumores organoconfinados presentan un mejor pronóstico en relación a los que sufren enfermedad diseminada. Evaluando la implicación pronóstica del estadiaje establecido por la clasificación TNM, un análisis multivariante publicado en 2000 muestra que la supervivencia se encuentra significativamente relacionada con él. De esta forma, la supervivencia cáncer específica a los 5 años para los pacientes en estadio I se sitúa en el 94%, 74% para el II, 67% para el III y 32% para el estadio IV (Tsui et al, 2000).

En relación a este sistema y sus implicaciones pronósticas han surgido diferentes críticas, sugiriendo su reevaluación, dada la discrepancia en los límites marcados para el tamaño tumoral en comparación con estudios más recientes, y la importancia fundamental de la existencia de trombo tumoral, afectación perirrenal y de la grasa del seno, así como de la afectación ganglionar (Ljunberg, 2007; Park et al, 2007).

### Tamaño tumoral

Siguiendo lo pautado en la clasificación TNM 2009, el límite de 4 cm clasificará al tumor como T1a ó T1b, con las correspondientes implicaciones en las decisiones quirúrgicas y de seguimiento posterior, dado que la seguridad y eficacia de la cirugía ahorradora de nefronas parece demostrada para tumores menores de 4 cm (Patard et al, 2004). En este sentido, existen estudios que establecen diferencias de supervivencia cáncer-específica a los 5 años en relación al tamaño tumoral, situándola en el 97% para los T1a (< 4 cm), 87% para los T1b (4-7 cm) y 71% para los T2 (> 7 cm) (Knight et al, 2007; Frank et al, 2005).

En líneas generales, en estudios multivariantes, el tamaño tumoral suele mostrarse como una variable pronóstica independiente (Dall'Oglio et al, 2007)

### Extensión Tumoral

Es evidente que el grado de extensión del CR compromete su pronóstico. Múltiples estudios muestran datos sobre las diferencias pronósticas en relación a la afectación de la cápsula renal, del sistema colector o de la grasa perirrenal (T3a), vascular (T3b-c), glándula suprarrenal (T4), o ganglionar (N1-2).

#### Afectación de la cápsula/sistema colector

En un estudio se analizó la influencia pronóstica de estos dos factores en los tumores en estadio I y II en una serie de 519 casos, llegando a la conclusión, mediante un análisis multivariante, que la afectación de la cápsula renal (invasión pero sin penetración) y del sistema colector son factores pronósticos independientes, hasta tal punto que cuando existe alguna de ellas la supervivencia de los T1N0M0 y los T2N0M0 llega a no alcanzar diferencias significativas en relación a los T3aN0M0.

En relación a la invasión capsular, la proporción de pacientes libres de enfermedad a los 5 años varía del 75.6% de aquellos con invasión al 86.9% en los que no la presentan. En cuanto a la afectación del sistema colector, esta proporción varía del 56.9%

en los que la sufren al 86.3% en los que no está presente (Klatte et al, 2007).

#### Afectación grasa perirrenal/glándula suprarrenal.

Analizados de forma global, la supervivencia de los CR T3a se sitúa según diferentes grupos entre el 50-75% a los 5 años (Frank et al, 2005; Ortiz et al, 2005).

Dado que la afectación de la glándula suprarrenal tiene peor pronóstico que la afectación de la grasa perirrenal, la afectación de ésta primera se considera como T4 en la clasificación TNM 2009 (era T3a en la TNM 2002).

#### Afectación Vascular.

La invasión vascular puede ser micro o macroscópica.

La existencia de invasión microscópica se muestra como un factor pronóstico independiente desfavorable. Posee un pronunciado efecto negativo sobre el periodo libre de recurrencia, incluso en los pacientes con estadios bajos, pudiendo, en estos casos, descender la supervivencia a los cinco años desde el 90% de aquellos que no la presentan hasta el 45% de los que la poseen (Dall'Oglio et al, 2007).

En relación al desarrollo de metástasis, un 50% de los afectados por invasión microvascular las desarrolla frente al 5% de los casos con ausencia de la misma (Madbouly et al, 2007).

La afectación vascular macroscópica viene dada por la tendencia del CR a crecer intraluminalmente en el sistema venoso, fundamentalmente hacia la vena renal y cava inferior. Puede afectar en torno al 10% de los casos al diagnóstico, y su existencia clásicamente se ha asociado a mayor recurrencia y disminución de la supervivencia tras la cirugía, aunque existen publicaciones en pro y en contra de esta afirmación (Moinzadeh et al, 2004; Vázquez et al, 2009).

#### Afectación Ganglionar.

La afectación ganglionar produce indudablemente impacto en la supervivencia de los pacientes afectos de CR. La incidencia de ganglios positivos (N1-2) aumenta con el

estadio T, y se asocia con metástasis a distancia y afectación venosa (Pantuck et al, 2003).

Los pacientes con afectación ganglionar y sin metástasis podrían ser encuadrados en un grupo pronóstico de riesgo intermedio, pues presentan una supervivencia francamente inferior a los pacientes sin afectación ganglionar, pero superior a los que tienen metástasis a distancia (Karakiewicz et al, 2007).

### Metástasis a distancia

La diseminación metastásica podríamos calificarla como el peor factor pronóstico. La supervivencia cáncer-específica se situaría entre el 5-10% a los 5 años y el 0-7% a los 10 años (Lohse et al, 2005).

## 6.2. Factores clínicos y analíticos

En este grupo de factores se incluyen un gran número de variables, no anatomopatológicas, que van desde la esfera de la sintomatología y características del paciente hasta multitud de parámetros analíticos. Los que presentan mayor evidencia pronóstica son:

### Forma de presentación

Los tumores diagnosticados de forma incidental presentan una mayor supervivencia: 81%-97% vivos a los 5 años frente al 65-75% de los sintomáticos, diferencia estadísticamente muy significativa (Pantuck et al, 2001).

### Estado funcional del paciente

El performance status (PS) es reconocido como factor pronóstico independiente en análisis multivariantes. Este indicador pronóstico no quedaría limitado a los tumores localmente avanzados y/o metastásicos, sino también para los tumores localizados (Zisman et al, 2001).

## Trombocitosis

La existencia de trombocitosis podría ser un factor pronóstico independiente, de tal forma que los pacientes con un nivel plaquetario normal presentan mayor supervivencia que aquellos que poseen una cuantificación superior a  $400.000/\text{mm}^3$  (O'Keefe et al, 2002).

Se ha descrito una relación directamente proporcional de la trombocitosis con el tamaño tumoral, la invasión ganglionar, la existencia de metástasis y el grado de Fuhrman, e inversamente proporcional a la supervivencia (70% a los 5 años en aquellos pacientes con nivel plaquetario  $< 450.000/\text{mm}^3$ , frente al 38% en aquellos con un nivel superior) (Bensalah et al, 2006).

## Otros factores clínicos

Por último, son considerados, con mayor o menor peso, variables como la anemia, la disfunción hepática, incremento de la velocidad de sedimentación globular, aumento de fosfatasa alcalina, la neutrofilia o la pérdida de peso (Atzpodien et al, 2003).

### 6.3. Factores anatomopatológicos

Dentro de estos factores incluimos determinados aspectos histopatológicos que han demostrado tener relevancia en la evolución de la enfermedad, y fundamentalmente con la progresión y supervivencia de la misma. No incluiremos en este apartado la invasión microscópica vascular, por habernos referido a ella anteriormente aunque, obviamente, podría quedar incluido en este grupo de factores pronósticos.

## Grado nuclear

El sistema de gradación nuclear más extendido en la actualidad es el de Fuhrman. Este sistema clasifica a los CR según la morfología nuclear en cuatro grados. En relación a dicho grado nuclear la supervivencia varía de forma significativa, pero con amplias diferencias según las series analizadas; de esta forma la supervivencia a los cinco años

puede oscilar de la siguiente forma:

- 50-100%: Grado 1
- 30-94%: Grado 2
- 10-80%: Grado 3
- 9-66%: Grado 4

Estas diferencias podrían estar justificadas por varias razones, como son la variabilidad interobservadores, la existencia de más de un grado nuclear en un mismo tumor y las variadas formas y protocolos de procesamiento de las muestras.

No obstante, a pesar de esta disparidad de datos, el grado nuclear ha demostrado ser un factor pronóstico independiente en estudios multivariantes (Rioux-Leclercq et al, 2006).

#### Tipo histológico

El carcinoma cromóforo clásicamente ha sido considerado de mejor pronóstico que el carcinoma de células claras, al igual que el carcinoma papilar (Mejean et al, 2003). Sin embargo, existen trabajos actuales que encuentran similar supervivencia en los diferentes tipos histológicos, con la salvedad de los que poseen diferenciación sarcomatoide, en los que existe consenso en relación a su peor evolución (Patard et al, 2005).

#### Necrosis tumoral

La presencia de necrosis en el CR ha sido considerada un importante factor predictor de supervivencia, asociándose a mayor tamaño tumoral, afectación ganglionar y metástasis, así como grados indiferenciados y peor performance status. La supervivencia cáncer-específica a los cinco años desciende del 75% en aquellos tumores sin necrosis hasta el 36% en los que la poseen (Lam et al, 2005).

#### 6.4. Factores moleculares

La incorporación de nuevas tecnologías en estudios genéticos han abierto un

amplio horizonte en el campo de la tumorigénesis y progresión del CR. Por otro lado, el desarrollo de nuevos tratamientos basados en dianas terapéuticas ha estimulado la búsqueda de marcadores moleculares; estos marcadores podrían facilitar la estratificación del riesgo de los tumores renales.

Actualmente han demostrado, en análisis multivariante, ser factores pronósticos independientes para el CR:

- Inductores de hipoxia: CA IX (carbonic anhydrase IX) y VEGF (vascular endothelial growth factor)
- Factor de proliferación Ki67
- Regulador del ciclo celular p53

La CA IX juega un importante papel en la regulación del pH celular, y se ha comprobado que más del 80 % de los CR primarios y metastásicos la expresan, a diferencia del riñón normal. Por tanto, se podría considerar un factor de mal pronóstico (Bui et al, 2003).

Parece que el VEGF se expresa de distinta forma según el tipo celular de CR. Los expresión elevada en el CR de células claras se correlacionaría con supervivencias más cortas, al igual que en los de tipo papilar, identificando de esta manera a los tumores con pronóstico más adverso (Ljungberg et al, 2006).

Ki67 es un antígeno de expresión nuclear expresado en las fases G1, G2, G3 y M del ciclo celular, pero no en la G0, por lo tanto, evalúa la proliferación celular. Por ello, un índice proliferativo elevado determinado mediante la expresión de Ki67 se asociaría a estadios avanzados, pobre diferenciación histológica y mal pronóstico (Yildiz et al, 2004).

El oncogen p53, regulador del ciclo celular mediante la producción de la proteína p53, es capaz de producir una parada de dicho ciclo en su fase G1, permitiendo la reparación del ADN o estimulando la apoptosis de células dañadas. Las mutaciones de dicho gen favorecerían la progresión de tumor (Martignoni et al, 2007).

## 6.5. Nomogramas predictivos

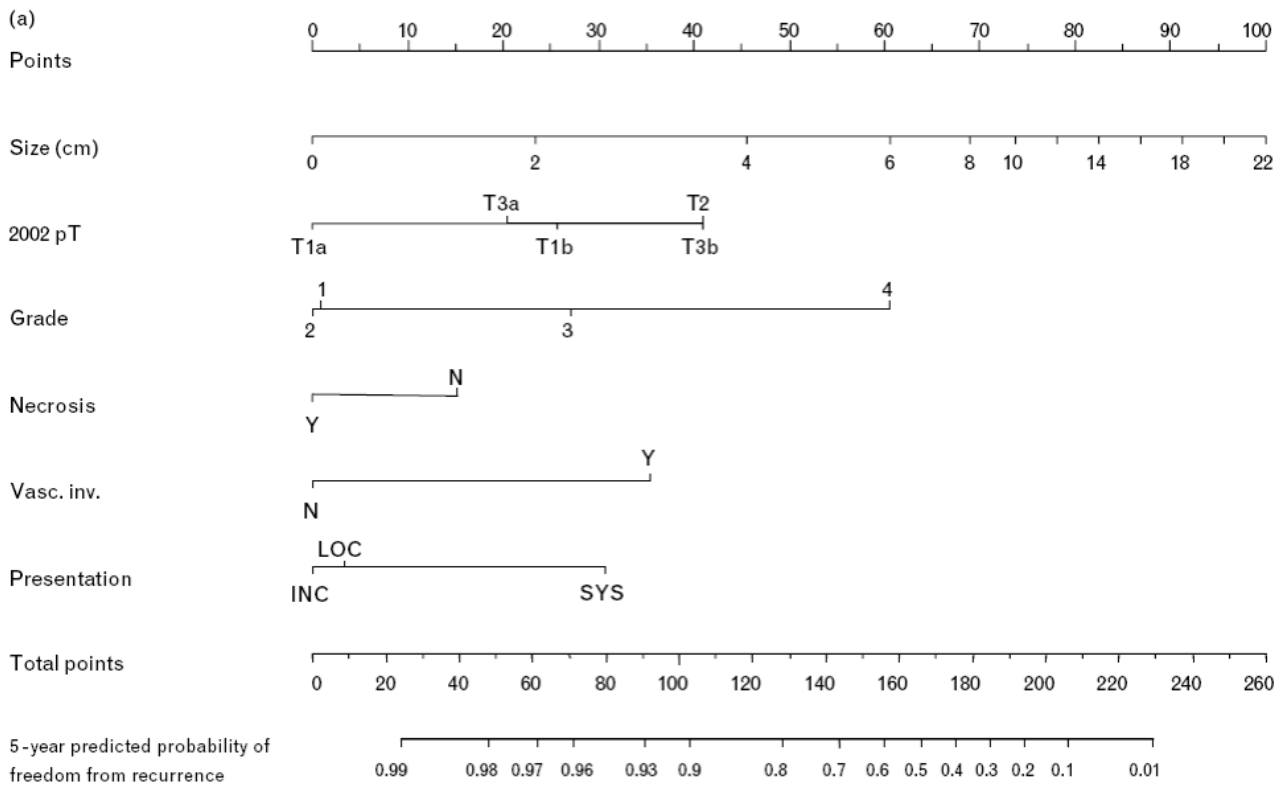
En la actualidad disponemos de modelos pronósticos elaborados por diferentes grupos de trabajo para pacientes afectados de CR, cuyo objetivo es facilitar su manejo y orientación terapéutica adyuvante. Estos nomogramas o algoritmos integran un número determinado de factores pronósticos (anatómicos, clínicos e histológicos), obteniendo resultados predictivos en relación a la evolución de la enfermedad.

El grupo del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) propone un nomograma para los pacientes con CR de células claras localizado, que incluye el tamaño tumoral, estadio tumoral T, grado nuclear, existencia de necrosis, invasión vascular y forma de presentación, con el que predice la probabilidad de encontrarse libre de enfermedad a los 5 años (Kattan et al, 2001).

Fig. 8. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC): Nomograma para los pacientes con CR de células claras localizado.



## Introducción



En la Universidad de California, Los Ángeles (UCLA) han elaborado un modelo (Integrate Staging System-UISS) que clasifica a los pacientes en grupos de riesgo con diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia cáncer-específica. Este modelo integra el estadio T, el grado nuclear y el performance status (ECOG), diferenciando metastásicos de no metastásicos, con lo que consigue agrupar a los pacientes en riesgo bajo, intermedio o alto. Para los no metastásicos ofrece una supervivencia a los 5 años del 83.8%, 71.9% ó 44% según sean de bajo, intermedio o alto riesgo, respectivamente; mientras que para los metastásicos sería del 30%, 19.3% ó 0% según se clasifiquen como bajo, intermedio o alto riesgo, respectivamente (Zisman et al, 2002).

Tabla 5. Nomograma pronóstico UISS (UCLA)

Nonmetastatic patients (NM)									
T stage	1		2	3		4			
Grade	1-2		3-4		↓	1	>1		↓
ECOG PS	0	≥1	0	≥1	↓	0	≥1	0	≥1
Risk	Low	Intermediate						High	

Metastatic patients (M)									
Stage	N1M0	N2M0/M1							
Grade	↓	1		2		3		4	
ECOG PS	↓	0	≥1	0	≥1	0	≥1	0	≥1
Risk	Low	Intermediate	Low	Intermediate				High	

En la *Mayo Clinic* han desarrollado un nomograma que predice la supervivencia, tras calcular un score del 1 al 10 (SSING), desde el primero hasta el décimo año. Este modelo integra el estadio, tamaño, grado nuclear y la existencia de necrosis (Frank et al, 2002).

Tabla 6. Nomograma de la Mayo Clinic

## Introducción

TABLE 5. *SSIGN score algorithm*  
The scores in this table are added together and the total is used to determine survival using table 6.

Feature	Score
T stage	
pT1	0
pT2	1
pT3a	2
pT3b	2
pT3c	2
pT4	0
N stage	
pNx	0
pN0	0
pN1	2
pN2	2
M stage	
pM0	0
pM1	4
Tumor size (cm)	
Less than 5	0
5 or greater	2
Nuclear grade	
1	0
2	0
3	1
4	3
Necrosis	
Absent	0
Present	2

TABLE 6. *Estimated cancer-specific survival following radical nephrectomy for clear cell renal carcinoma by SSIGN score*

SSIGN score	No. (%)	% Estimated cancer specific survival (SE, No. at risk)				
		Year 1	Year 3	Year 5	Year 7	Year 10
0-1	402 (22.3)	100.0 (0.0, 378)	97.7 (0.3, 340)	99.4 (0.4, 303)	98.7 (0.6, 235)	97.1 (1.1, 165)
2	235 (13.0)	99.1 (0.6, 221)	95.9 (1.4, 191)	94.8 (1.5, 162)	90.3 (2.2, 131)	85.3 (2.9, 89)
3	199 (11.0)	97.4 (1.1, 185)	90.3 (2.2, 153)	87.8 (2.5, 127)	81.8 (3.1, 95)	77.9 (3.5, 62)
4	206 (11.4)	95.4 (1.5, 182)	87.1 (2.5, 147)	79.1 (3.1, 116)	70.8 (3.6, 86)	66.2 (3.9, 53)
5	153 (8.5)	91.1 (2.4, 131)	71.3 (3.8, 92)	65.4 (4.1, 70)	57.1 (4.5, 48)	50.0 (5.0, 33)
6	88 (4.9)	87.0 (3.7, 73)	69.8 (5.1, 55)	54.0 (5.6, 37)	46.4 (5.8, 30)	38.8 (6.0, 18)
7	200 (11.1)	90.3 (2.9, 152)	52.4 (3.7, 89)	41.0 (3.8, 61)	34.0 (3.7, 45)	28.1 (3.7, 27)
8	61 (3.4)	65.1 (6.1, 39)	38.9 (6.4, 21)	23.6 (5.8, 10)	12.7 (5.1, 4)	12.7 (5.1, 4)
9	100 (5.6)	60.5 (5.0, 57)	26.8 (4.7, 23)	19.6 (4.3, 14)	18.1 (4.2, 12)	14.8 (4.0, 8)
10 or greater	157 (8.7)	36.2 (4.0, 53)	11.9 (2.8, 14)	7.4 (2.4, 8)	4.6 (1.9, 5)	4.6 (1.9, 4)

En relación a los CR metastásicos, Motzer et al establecen un nomograma, basado en el performance status según la escala de Karnofsky, siendo diferenciador si éste se sitúa por debajo del 80%, además de otras variables clínicas y analíticas (Motzer et al, 2004).

Las actuales Guías Europeas de CR no recomiendan el uso rutinario de nomogramas o modelos predictivos (Ljungberg et al, 2009), y además, aún queda por delante el integrar en estos modelos los factores moleculares que, como hemos visto, parecen tener un importante papel en la determinación del pronóstico del CR.

## 7. Tratamiento del cáncer renal

### 7.1. Tratamiento del cáncer renal localizado

El tratamiento quirúrgico representa la opción curativa del CR. La nefrectomía parcial por un CR localizado presenta un resultado oncológico semejante al de la cirugía radical, por lo que en los tumores T1 ha de practicarse una nefrectomía parcial siempre que sea posible; en los casos en que no sea posible técnicamente, la nefrectomía radical sigue siendo el tratamiento curativo de referencia.

Dentro de las indicaciones electivas, la cirugía conservadora de nefronas en tumores de pequeño diámetro (T1a) proporciona unas tasas de recidiva y de supervivencia similares a los observados tras la cirugía radical; para tumores más grandes (T1b), se ha demostrado que la nefrectomía parcial es factible y presenta seguridad oncológica en pacientes cuidadosamente seleccionados.

Por tanto, la cirugía conservadora de nefronas representa el gold standard de los tumores Ta/b siempre que sea posible técnicamente. Se ha asociado a una tasa de complicaciones quirúrgicas mayor que con la nefrectomía radical, aunque existe evidencia de que, probablemente debido a la mayor preservación de la función renal, la cirugía conservadora se asocia a una mayor supervivencia global en comparación con la nefrectomía radical.

Como alternativas a la cirugía, se encuentran las técnicas ablativas, dentro de las cuales las más usadas y recomendadas son la ablación con radiofrecuencia y la crioterapia, estando recomendadas en casos de tumores renales pequeños y/o pacientes con una co-morbilidad significativa que no son candidatos a cirugía.

Otra alternativa es la vigilancia, en pacientes con masas renales pequeñas, precisando tratamiento si se evidencia progresión del tumor (Ljungberg et al, 2010).

## 7.2. Tratamiento del cáncer renal avanzado

El tratamiento del CR avanzado ha experimentado una revolución en los últimos años con la aparición de las llamadas terapias diana o antiangiogénicos.

A partir de 1940 se comenzó a tratar el cáncer renal avanzado con quimioterapia, con diversas pautas, pero con escasas tasas de respuesta inferiores al 6% y con una toxicidad considerable, por lo que se considera que el cáncer renal es quimiorresistente. También

se probó con hormonoterapia y con radioterapia, con malos resultados.

A partir de 1990 surge la era de la inmunoterapia; aparecen los primeros ensayos clínicos usando citocinas, concretamente la interleukina 2 (IL-2) y el interferón alfa 2 (INF), apareciendo la inmunoterapia en las guías de práctica clínica como el tratamiento de elección (Bukowski et al, 2000). Actualmente la inmunoterapia todavía tiene su papel en el tratamiento del cáncer renal avanzado, en aquellos cánceres de buen pronóstico, con metástasis preferiblemente de localización pulmonar, como alternativa a los antiangiogénicos; la citokina recomendada es la IL-2 a altas dosis vía intravenosa (Ljungberg et al, 2010).

Con el mayor conocimiento de la biología molecular del CR surgen las llamadas terapias diana o antiangiogénicos. En diciembre de 2005 es aprobado el primer antiangiogénico, sorafenib, y un mes más tarde se aprueba el sunitinib. Progresivamente han sido aprobados bevacizumab + INF, temsirolimus, everolimus, pazopanib, siendo el último antiangiogénico incorporado el axitinib, hasta la fecha (Calvo et al, 2012).

### 7.3. Adyuvancia

Debido al pronóstico del CR se han realizado estudios de tratamiento en adyuvancia con citoquinas, no habiendo demostrado un aumento de la supervivencia en el CR no metastásico, por lo que la inmunoterapia adyuvante no está recomendada.

También se han usado vacunas tumorales en adyuvancia, pudiendo aumentar el período libre de progresión en un subgrupo de pacientes sometidos a nefrectomía por un carcinoma T3, aunque todavía no se demostrado el impacto que puedan tener sobre la supervivencia global (Ljungberg et al, 2010).

En la actualidad se están llevando a cabo varios estudios para evaluar la eficacia de la adyuvancia en el CR con antiangiogénicos, aunque no dispondremos de resultados hasta dentro de varios años.

#### 6.4. Neoadyuvancia

La neoadyuvancia o la terapia prequirúrgica es una estrategia terapéutica novedosa que está empezando a ser investigada en el tratamiento del CR de forma paralela al desarrollo de las terapias diana.

Los efectos de los antiangiogénicos sobre el tumor renal primario son poco conocidos, y los escasos estudios publicados tienen datos sobre pacientes con cáncer renal metastásico. (Vázquez et al, 2013).

Actualmente se están llevando a cabo estudios en neoadyuvancia con antiangiogénicos, aunque al igual que los estudios en adyuvancia, no dispondremos de los resultados hasta dentro de varios años.



## HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS



La determinación de los factores pronósticos es importante para establecer una adecuada estrategia terapéutica en cada paciente con CR, para poder decidir un tratamiento adyuvante en un futuro ante un paciente de mal pronóstico, y para poder individualizar el seguimiento de cada paciente.

Actualmente la mayoría de factores pronósticos que disponemos en el CR son clínicos, estando los factores pronósticos biológicos todavía en fase de desarrollo e implementación.

Como objetivo general nos planteamos la identificación de nuevos factores pronósticos biológicos en el CR.

Como objetivos concretos nos planteamos:

1. Estudio de la respuesta inflamatoria en el CR, analizando los cambios en inmunogenicidad que se producen en el CR localizado a metastásico.
2. Demostrar la posible asociación de polimorfismos genéticos relacionados con la modulación de la respuesta inflamatoria y la angiogénesis, en el desarrollo y progresión del CR así como predecir el pronóstico en pacientes portadores de estos polimorfismos.



# MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

La descripción de los materiales y métodos empleados, así como de los resultados obtenidos, se encuentran descritos en los artículos originales publicados en relación con cada uno de los objetivos planteados y que han sido incluidos en esta sección. Cada uno de ellos, va precedido por un breve resumen que pretende facilitar una revisión rápida de la información más relevante contenida en los mismos. Las publicaciones científicas realizadas fruto de este trabajo incluyen:

- En relación con el objetivo 1 (Estudio de la respuesta inflamatoria en el CR, analizando los cambios en inmunogenicidad que se producen en el CR localizado a metastásico):

1- Analysis of the expression of HLA class I, proinflammatory cytokines and chemokines in primary tumors from patients with localized and metastatic renal cell carcinoma

J.M. Romero, N. Aptsiauri, F. Vázquez, J.M. Cózar, J. Cantón, T. Cabrera, M. Tallada, F. Garrido, F. Ruiz-Cabello

Tissue Antigens 2006 Oct;68(4):303-310. (Factor de impacto: 2.934).

- En relación con el objetivo 2 (Demostrar la posible asociación de polimorfismos genéticos relacionados con la modulación de la respuesta inflamatoria y la angiogénesis, en el desarrollo y progresión del CR así como predecir el pronóstico en pacientes portadores de estos polimorfismos):

2- High incidence of CTLA-4 (CT60) polymorphism in renal cell cancer

Jose M. Cózar, José M. Romero, Natalia Aptsiauri, Fernando Vázquez, José R. Vílchez, Miguel Tallada, Federico Garrido, Francisco Ruiz-Cabello

Human Immunology 2007; 68, 698-794. (Factor de impacto:2.298).

3- Polimorfismos en genes de respuesta inflamatoria en cáncer renal metastásico

Pablo Sáenz López, Fernando Vázquez Alonso, José M. Romero, Rafael Carretero, Miguel Tallada Buñuel, Francisco Ruiz Cabello, José Manuel Cózar Olmo

Actas Urol Esp 2009; 33(5):474-481. (Factor de impacto: 1.144).

## **1.- Análisis de la expresión de HLA clase I, citoquinas proinflamatorias y quimioquinas en tumores primarios de pacientes con carcinoma de células renales localizado y metastásico**

### INTRODUCCIÓN

Se cree que la inmunovigilancia puede ser un mecanismo clave en el reconocimiento del tumor y en el inicio de la reacción inmune contra las células malignas que llevan a la eliminación del tumor. Sin embargo, en muchos casos, el papel protector del sistema inmune falla, facilitando el crecimiento tumoral y la diseminación a distancia.

El carcinoma de células renales (CR) es un cáncer altamente angiogénico caracterizado por una alta infiltración con linfocitos y alta producción de citoquinas.

En este estudio, evaluamos aspectos relacionados con la inmunogenicidad del CR analizando la expresión de las moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA) clase I, en las células tumorales y de citoquinas y de quimioquinas en el estroma tumoral de los de pacientes con CR.

En los tumores humanos es frecuente encontrar una disminución de la expresión de moléculas HLA clase I y se cree que pueda estar asociado con el escape tumoral de los linfocitos T citotóxicos. En contraste otros tumores como el melanoma, cáncer de cuello uterino o el cáncer colorrectal, existe muy poca información sobre la expresión de HLA clase I en el CR y estos son a su vez contradictorios. En los tumores primarios de CR y en las líneas celulares de cáncer renal se han demostrado un menor grado y una menor frecuencia de alteraciones en la expresión de HLA clase I.

Recientes estudios sugieren que las interacciones entre quimioquinas y su receptor intervienen en el proceso de invasión metastásica determinando en algunos casos el lugar donde se producen las metástasis. Aparte de su papel como mediador en el reclutamiento de leucocitos infiltrantes de tumor, las quimioquinas también pueden afectar a la proliferación neoplásica, neovascularización.

Dado que muchas citoquinas proinflamatorias tienen una potente actividad promotora del

tumor mediante la inducción de la angiogénesis tumoral y del crecimiento de las células tumorales, en este estudio también se investiga la expresión génica de varias citoquinas proinflamatorias en el tejido tumoral. Se estudió el nivel de expresión de ARNm de la cadena pesada del HLA (HLAhc), beta-2-microglobulina (B2m), y el de varias citoquinas y quimiocinas (IP-10(CXCL10), I-TAC(CXCL11), SDF-1(CXCL12), MIP-1-a(CCL3), RANTES(CCL5), VEGF-c, IFN-gamma, IL-10 y TGF-B) mediante técnicas de RT-PCR cuantitativa. Se compararon los niveles de expresión de los genes extrayendo ARN del tumor y del tejido renal normal adyacente de los mismos pacientes con cáncer renal. También se analizó la asociación de la expresión HLAhc, citoquinas y quimiocinas con diversos parámetros clínico-patológicos del cáncer renal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Obtuvimos 29 muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer renal de células claras, de los cuales 23 eran CR localizados y 6 CR metastásicos, y 14 muestras de tejido renal normal adyacente al tumor. Todas las muestras se obtuvieron a partir de las piezas de nefrectomía radical de pacientes intervenidos en el Servicio de Urología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada entre 2002 y 2003. Las muestras se conservaron en parafina para el examen histopatológico o ser criopreservaron para realizar la microdissección y/o el análisis inmunohistoquímico. Los pacientes se estadificaron acorde a la clasificación TNM.

La microdissección manual se llevó a cabo con secciones de tejidos con un grosor de entre 4 y 8 micras usando un estereomicroscopio (Leica, modelo MS5) y un micromanipulador mecánico (Leica, modelo M).

Las técnicas inmunohistoquímicas se realizaron sobre las muestras congeladas de tumor con el sistema supersensitive Multilink-HRP/DAB (BioGenex).

La reacción contra los diferentes anticuerpos monoclonales se graduó, conforme a las recomendaciones de la 12th IHW, como negativo (<25% de células marcadas), heterogéneo (25-75% de células marcadas) o positivo (>75% de células marcadas).

El ARN total se extrajo a partir de los fragmentos microdisseccionados usando el Absolutely RNA Nanoprep Kit (Stratagene, LaJolla, CA).

Para analizar la expresión de varios genes (HLAhc, B2m, IP-10, I-TAC, RANTES, MIP-1-a, SDF-1, IFN-gamma, TGF-B, VEGF-c y IL-10) se usó la RT-PCR cuantitativa; y para

controlar las variaciones en el ARNm se usó como control el gen G6PDH.

La RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo en un instrumento LightCycler, usando LC-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics, Manheim, Germany),

Los datos se expresaron como media +/- desviación standard, y fueron analizados con el test de t de Student, y los de Kolmogorov-Smirnov y de Mann-Whitney.

## RESULTADOS

Los niveles de expresión de HLAhc y B2m fueron más altos en el tejido tumoral de CR primario que en el correspondiente tejido renal normal. La expresión de HLAhc y B2m en tumores de CR metastásico fue significativamente más baja que en las muestras de tumor obtenidas de pacientes con CR localizados. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de HLAhc y B2m entre el tejido normal y el tejido tumoral de pacientes con CR metastásico.

El estudio inmunohistoquímico reveló la ausencia en un 6% de casos de expresión de HLA de clase I, esta expresión fue variable en un 39% de casos y en el resto no se observaron aparentemente alteraciones en la expresión HLA de clase I con una expresión homogénea. Los porcentajes de alteración en la expresión de antígenos HLA de clase I han sido inferiores en un estudio realizado posteriormente sobre una serie mayor (Sáenz-López et al, 2010).

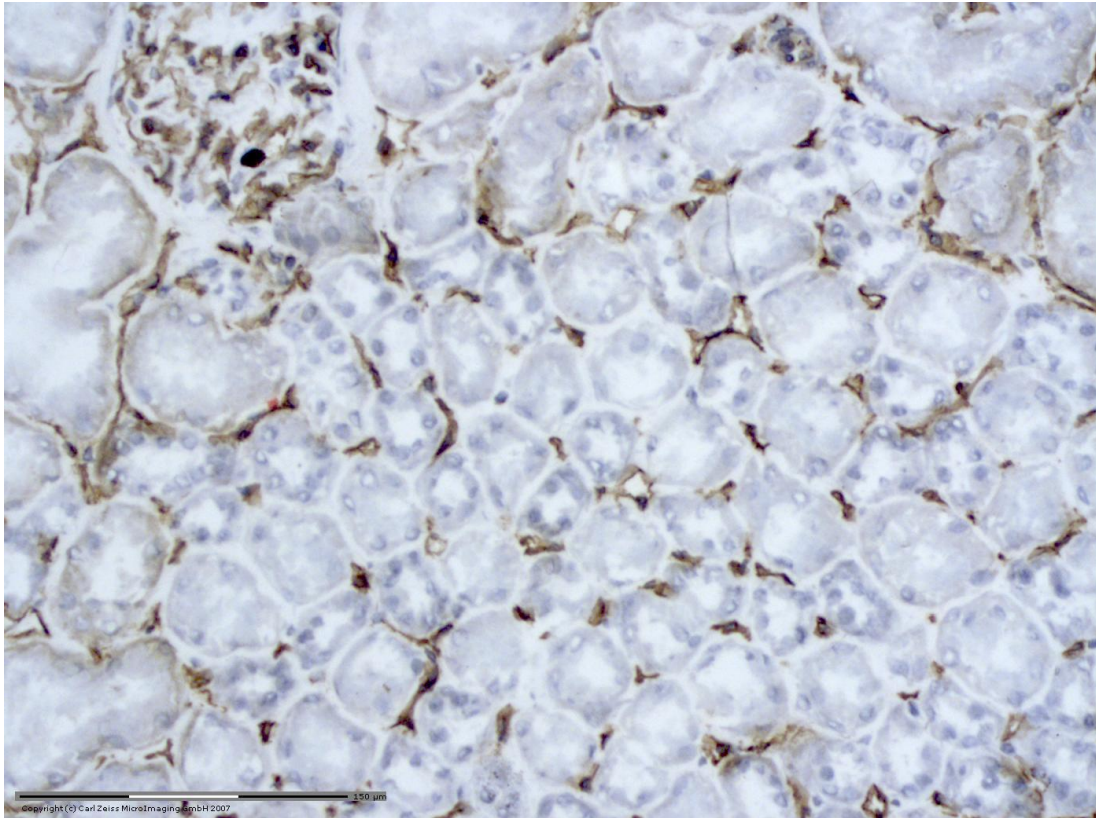
El análisis RT-PCR mostró un aumento significativo de las citoquinas y quimiocinas investigadas (todas excepto la SDF-1) en las muestras de tumor primario comparadas con las muestras de tejido normal adyacente. Las diferencias más notables se observaron en los niveles de IP-10 (CXCL10) y I-TAC (CXCL11). Aunque el mRNA del IFN-gamma no se detectó en el tejido normal, en muchas muestras tumorales sí se pudo medir. Los niveles de MIP-1-alfa, TGF-B, RANTES VEGF-c y IL-10 fueron significativamente más altos en los tumores.

Entre los 29 pacientes con CR, 6 correspondían a CR metastásicos. Encontramos que la expresión de IFN-gamma, IP-10, VEGF-c y SDF-1 era más baja en los tumores primarios de pacientes con CR metastásicos que en los tumores de pacientes con cáncer localizado (TABLA 2 y FIGURA3b). IFN-gamma fue indetectable en cinco de las seis muestras

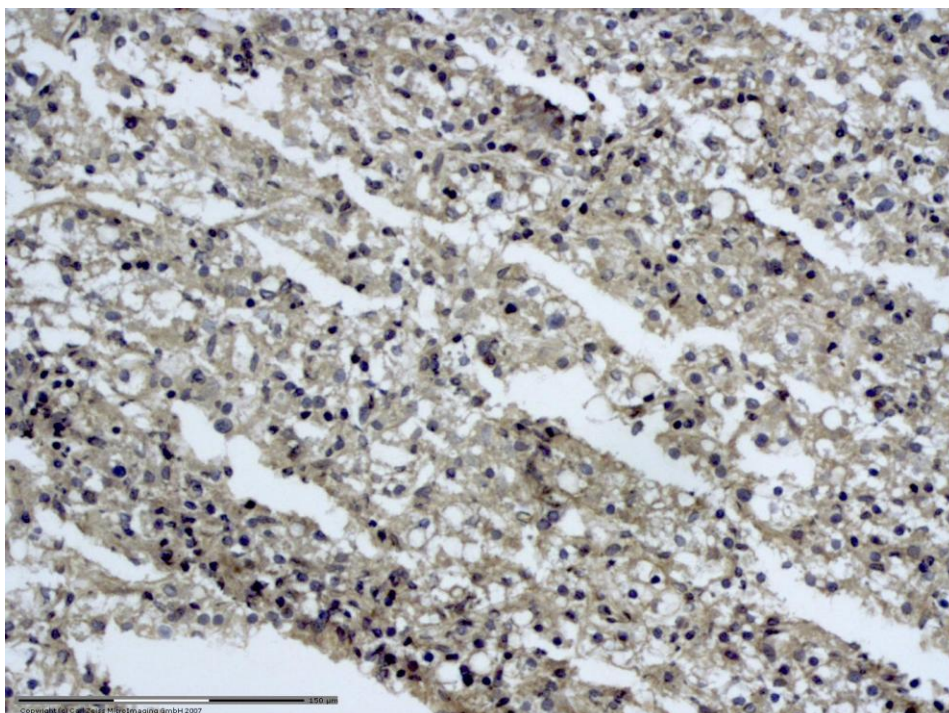


tumorales correspondientes a CR metastásico.

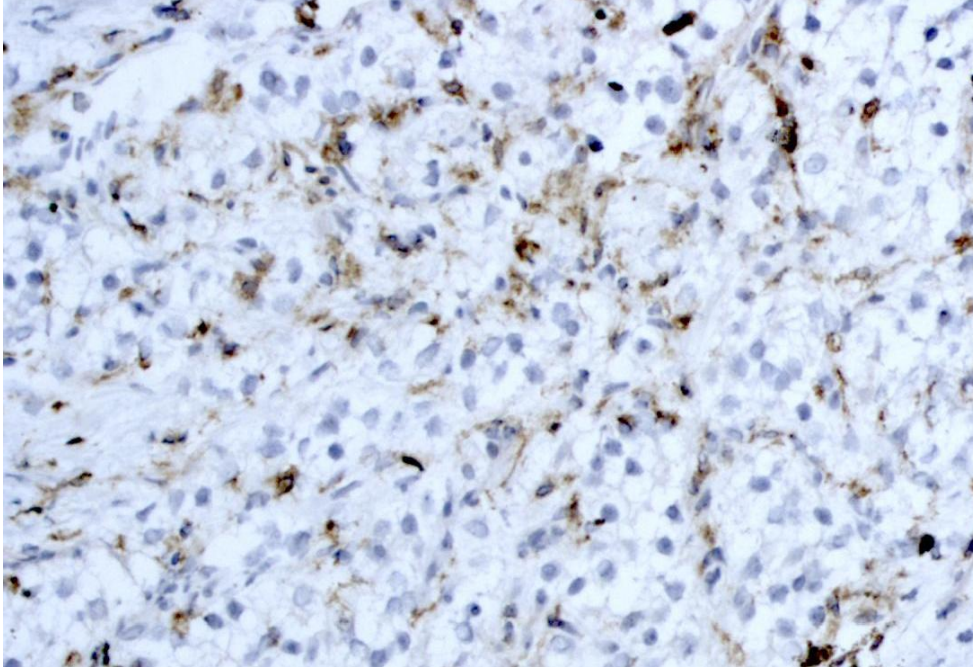
Cuando analizamos los niveles de expresión de I-TAC, RANTES, TGF-B, MIP-A-alfa y de IL-10, observamos una tendencia decreciente en sus niveles de mRNA en los CR metastásicos, pero este descenso no fue estadísticamente significativo.



*Imagen de tejido renal normal , en la que se muestra un patrón negativo. Sólo las células estromales expresan HLA de clase I*



*Imagen de tejido de cáncer renal que presenta un patrón homogéneo positivo de tinción.*



*Imagen de tejido de cáncer renal que presenta un patrón negativo de tinción.*

## **Analysis of the expression of HLA class I, proinflammatory cytokines and chemokines in primary tumors from patients with localized and metastatic renal cell carcinoma**

J. M. Romero<sup>1</sup>, N. Aptsiauri<sup>1</sup>, F. Vazquez<sup>2</sup>, J. M. Cozar<sup>2</sup>, J. Canton<sup>1</sup>, T. Cabrera<sup>1</sup>, M. Tallada<sup>2</sup>,

F. Garrido<sup>1</sup> & F. Ruiz-Cabello<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Analisis Clinicos, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, University of Granada, Avenida de las Fuerzas Armadas s/n, 18014 Granada, Spain

<sup>2</sup> Servicio de Urologia, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, University of Granada, Avenida de las Fuerzas Armadas s/n, 18014 Granada, Spain

### **Abstract**

Changes in the human leukocyte antigen (HLA) class I expression and cytokine and chemokine production both by cancer cells and by normal surrounding tissue are believed to be responsible for immune escape and tumor progression. In this study, we compared the tumor expression levels of HLA heavy chain (HLA<sub>hc</sub>), beta-2-microglobulin (b2m), chemokines (Interferon-gamma-inducible Protein-10 (IP-10), Interferon-inducible T-cell Alpha-Chemoattractant (I-TAC), Stromal cell-Derived Factor-1 (SDF-1), Macrophage Inflammatory Protein-1-alpha (MIP-1-a) and Regulated upon Activation, Normally T-Expressed, and presumably Secreted (RANTES) and cytokines (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Interferon-gamma (IFN-g), Interleukin-10 (IL-10), Tumor Growth Factor-beta (TGF-β)) in primary tumors and adjacent normal tissues from patients with localized and metastatic renal cell carcinoma (RCC) using a quantitative real-time polymerase chain reaction technique. We report that the expression of HLA<sub>hc</sub>, b2m and the studied cytokines and chemokines (except for SDF-1) was significantly higher in the

tumor (29 samples) than in the normal tissue (14 samples). When we compared the tumor expression levels between patients with localized RCC and patients with advanced metastatic stage, we found that the messenger RNA expression levels of HLAhc and b2m were much lower in patients with metastatic RCC (6 cases) than in patients with localized cancer (23 cases), with levels similar to those in normal tissue. This was also confirmed on a protein level by immunohistological labeling of tumor tissues. Thirty-nine percent of the analyzed RCC tumors showed partial loss of HLA class I molecules, while 6% of the tumors showed HLA class I total loss. The expression of IP-10, SDF-1 and VEGF-c was also significantly lower in patients with advanced tumor, while the IFN-g expression in metastatic RCC was not detectable. Our findings show that primary RCC tumors are characterized by a high expression of HLAhc and a presence of proinflammatory mediators and chemokines. We also observed that disease progression and development of metastasis in RCC are associated with decreased expression of HLAhc, b2m, IP-10, SDF-1 and IFN-g. This microenvironment may suppress the cytotoxic response, creating conditions that favor tumor escape and cancer progression.

## Introduction

Immunosurveillance is believed to be a key mechanism in tumor recognition and in the initiation of the immune reaction against malignant cells that leads to tumor elimination (1, 2). However, in many cases, this protective role of the immune system fails, leading to tumor growth and spreading to distant sites. Thus, cancer progression and metastasis are the result of a balance between tumor immunosurveillance and tumor escape. This balance depends both on the systemic immune reactivity and on the local microenvironment. Human renal cell carcinoma (RCC) is a highly angiogenic cancer characterized by a high infiltration with leukocytes and the production of cytokines (3, 4). In our previous report (4), we characterized lymphoid infiltrates in RCC. We found that the infiltrates had a substantial number of natural killer (NK) cells, and the majority of CD41 T cells express CXCR3, CCR5 and CD45RO markers for T cells associated with T-helper cell-1 (Th1) type reactions. We also discovered that the preferential Th1 polarization in RCC tumor changes to Th2 during the progression of cancer. In patients with metastasis, we observed a reduction in the proportion of CXCR3/CD41 and CCR5/CD41 tumor-infiltrating subsets and NK cells and an increase in CCR4/CD41 cells and CD4/CD251 cells. A Th1 to Th2 shift between the cytokine messenger RNA (mRNA) expression profiles of normal

cervical tissue and malignant cervical tumors has been also described in other types of cancer including cervical cancer (5). In this study, we extend our knowledge about the nature of RCC immunogenicity by characterizing the expression of human leukocyte antigen (HLA) class I molecules, cytokines and chemokines in primary RCC tumors. Downregulation of HLA class I molecules is frequently found in human tumors and is believed to be associated with tumor escape from cytotoxic T lymphocytes (6–12). In contrast to melanoma, cervical carcinoma or colorectal cancer, only limited information is available on HLA class I expression in RCC. Primary RCC tumors and renal cancer cell lines have shown less degree and frequency of alterations in HLA class I expression (13). In contrast, renal cancer is characterized with high frequency of abnormalities in the components of antigen-processing machinery (TAP1 and tapasin) (14). Recent studies suggest that chemokine/receptor interactions determine the sites of metastatic invasion of the tumor cells in several types of cancer (15–28). Aside from their role in mediating the recruitment of tumor-infiltrating leukocytes to tumor sites, chemokines may also affect neoplastic proliferation, neovascularization and metastasis. Since many of the proinflammatory cytokines have potent tumor-promoting activity by inducing tumor angiogenesis and by inducing the synthesis of matrix metalloproteases or by directly supporting tumor cell growth, this study also aimed to investigate the gene expression of several proinflammatory cytokines in tumor tissue. mRNA of HLA heavy chain (HLA<sub>h</sub>c), beta-2-microglobulin (b2m) and several cytokines and chemokines (IP-10, I-TAC, SDF-1, MIP-1-a, RANTES, VEGF-c, IFN-g, IL-10 and TGF-b) was assayed by quantitative real-time reverse transcriptase– polymerase chain reaction (RT-PCR) of the tumor samples obtained from patients with RCC. The expression levels of the studied molecules were compared with those in normal kidney tissue adjacent to tumor samples obtained from the same patients with RCC. We also analyzed the association of HLA<sub>h</sub>c, cytokine and chemokine expression with the metastatic cancer progression.

## **Materials and methods**

### **Sample selection and preparation**

Twenty-nine tumor samples from patients with RCC were histopathologically classified as clear-cell type RCC (23 patients with localized RCC and 6 patients with metastatic RCC), and 14 samples of tumor surrounding normal kidney tissue from the patients with RCC

were collected at the Department of Urology, Hospital Virgen de las Nieves, Granada. All samples were obtained after radical nephrectomy from patients who had signed informed consent to participate in this study. The patients underwent surgery between 2002 and 2003. Resected specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin for histopathological examination or cryopreserved for microdissection and/or immunohistochemical staining. The tumors were staged according to the TNM classification (Table 1).

**Table 1** Patient characteristics<sup>a</sup>

Code	Stage (TNM)	Grade	Age (years)/sex
<u>CR28</u>	T3aN0M0	2	80/M
<u>CR30</u>	T1N0M0	1	44/M
<u>CR31</u>	T3N0M0	4	76/M
<b><u>CR32</u></b>	<b>T3N1M1</b>	<b>4</b>	<b>43/M</b>
<u>CR33</u>	T2N0M0	1	69/M
<u>CR34</u>	T2N0M0	2	69/M
<u>CR35</u>	T3bN0M0	3	63/M
<u>CR38</u>	T1N0M0	2	68/M
<u>CR41</u>	T1N0M0	2	43/F
<b><u>CR42</u></b>	<b>T3N1M1</b>	<b>3</b>	<b>57/F</b>
<u>CR43</u>	T3bN0M0	3	77/M
<u>CR44</u>	T1N0M0	1	53/F
<u>CR46</u>	T3aN0M0	2	84/M
<u>CR47</u>	T2N0M0	2	75/M
<u>CR49</u>	T3aN0M0	4	66/F
<u>CR50</u>	T3aN0M0	1	75/F
<u>CR51</u>	T1N0M0	3	26/F
<u>CR52</u>	T2N0M0	4	48/M
<u>CR53</u>	T1N0M0	1	30/M
<u>CR54</u>	T1N0M0	2	78/M
<u>CR57</u>	T2N0M0	3	44/F
<u>CR58</u>	T2N0M0	2	59/M
<b><u>CR59</u></b>	<b>T2N2M0</b>	<b>3</b>	<b>55/F</b>
<u>CR60</u>	T1N0M0	2	83/F
<b><u>CR61</u></b>	<b>T2N1M1</b>	<b>3</b>	<b>60/M</b>
<u>CR62</u>	T2N0M0	1	88/M
<u>CR64</u>	T2N0M0	2	56/M
<b><u>CR73</u></b>	<b>T3N1M1</b>	<b>3</b>	<b>60/M</b>
<b><u>CR76</u></b>	<b>T3N1M1</b>	<b>3</b>	<b>55/M</b>

F, female; M, male.

<sup>a</sup> Data given in bold represent metastatic renal cell carcinoma. Underlined data represent the patients from whom matching normal kidney tissue samples were collected.

### Manual microdissection

Cryopreserved tissue sections between 4 and 8 mm thick were stained with 0.05% w/v solution of toluidine blue and microdissected using a stereomicroscope (Leica, Heerbrugg, Switzerland, model MS5) and a mechanical micromanipulator (Leica, model M). Microdissected fragments of tumor tissues and adjacent normal tissues were used for RNA isolation. Each fragments contained approximately 1x1000 to 5x1000 cells.

### Immunohistological staining

The HLA class I tumor phenotype was defined using immunohistological techniques on frozen tumor sections with a biotin–streptavidin amplified detection system (supersensitive Multilink-HRP/DAB; BioGenex). Technical details and the system used to score the results were described previously (7–9). Tumor samples from 20 patients were available for immunohistochemical analysis.

### Monoclonal antibodies

The panel of anti-HLA class I monoclonal antibodies (mAbs) used in this study was selected at the HLA & Cancer Component of the 12th International Histocompatibility Workshop (IHW) [for details, see Garrido et al. (7)]. Selection of the antibodies was done based on the results of HLA typing of PBLs obtained from the studied cancer patients (8, 9). Reactivity with the different mAbs was graded in accordance with the recommendations of the 12th IHW (6) as negative (<25% cells stained), heterogeneous (25–75% cells stained) or positive (>75% cells stained).

### RNA isolation

Total RNA was extracted from microdissected fragments using Absolutely RNA Nanoprep Kit (Stratagene, LaJolla, CA) according to the manufacturer's recommendations.

### Real-time PCR

RT-PCR products were analyzed for gene expression of several target genes (HLA $\alpha$ 1,  $\beta$ 2m, IP-10, I-TAC, RANTES, MIP-1- $\alpha$ , SDF-1, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , VEGF-c and IL-10) by quantitative real-time RT-PCR. To control for variations in amounts of mRNA, we also tested the following control genes: glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), b-

actin and hypoxanthine guanine phosphorybosyltransferase (HPRT). The primers used for HLAhc RT-PCR reaction were 5'-GAGAACGGGAAGGAGACGC-3' and 5'-CATCTCAGGGTGAGGGGGCT-3'. All reactions were performed in a LightCycler instrument using the LC-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), with the exception of G6PDH and b2m when we used Housekeeping Gene Set Kits (Roche Diagnostics). The primers used for the cytokine, chemokine and control gene amplification reactions were part of the LightCycler-Primer Set (GmbH, Heidelberg, Germany). The final expression levels of target genes were given relative to the expression levels of G6PDH. b-Actin and HPRT were also used as control genes with similar results to those obtained with G6PDH as a control gene.

### Statistical analysis

Data were expressed as median +/- standard deviation. Parametric (Student's *t* test) and nonparametric (Kolmogorov–Smirnov and Mann–Whitney) tests were used to analyze the data in this study. Statistical significance was defined as  $P < 0.05$ .

## Results

To understand the role of the HLA system and the cytokine and chemokine network in growth and progression of RCC, we assessed the expression of HLAhc; b2m and several immune mediators including chemokines I-TAC, IP-10, SDF-1, MIP-1-a and RANTES and cytokines IFN- $\gamma$ , IL-10, VEGF-c and TGF-b. We used a real-time RT-PCR technique to compare the expression levels of the studied molecules between tumor tissue and the normal surrounding tissue and between primary tumor samples obtained from patients with localized and metastatic RCC. We analyzed samples from 29 patients with RCC. Twenty-three patients of them had localized tumor, while six patients had developed metastasis. Normal kidney parenchyma adjacent to tumor was obtained from 14 patients (Table 1).

The gene expression of the studied molecules was compared between tumor tissue and surrounding normal kidney tissue and between primary tumor samples from patients with localized and metastatic RCC. The amount (copy number) of each target mRNA was presented relative to the values of G6PDH used as internal control. Using b-actin or HPRT as alternative internal controls produced similar results. Expression levels of b-actin and HPRT were compared between normal tissue and tumor tissue. No differences were



detected when we used as control genes b-actin (P 1/4 0.28) or HPRT (P 1/4 0.68) (Table 2).

#### HLAhc and b2m mRNA expression patterns

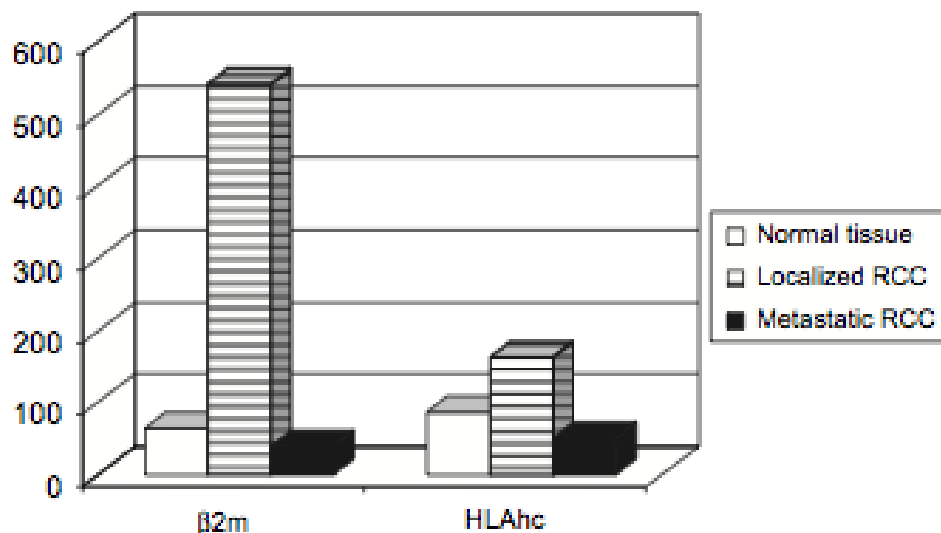
The median expression levels of both HLAhc and b2m were higher in the primary RCC tumors than in the corresponding normal kidney tissue (Figure 1 and Table 2). In addition, the median expression levels of HLAhc and b2m in tumors obtained from patients with metastatic RCC were significantly lower than in tumor samples obtained from patients with localized cancer (Figure 1). The HLA class I heavy chain expression was 3.2 times lower (P 1/4 0.001) and b2m expression was 6.9 times lower (P 1/4 0.003) in localized RCC than in metastatic RCC (Table 2). Interestingly, no significant differences have been found in the level of HLAhc and b2m expression between normal kidney parenchyma and tumor samples obtained from patients with metastatic RCC.

**Table 2** Summarized results of the quantitative real-time RT-PCR analysis of the HLA class I, cytokine and chemokine expression in patients with RCC<sup>a</sup>

	Ratio – RCC tumor/normal tissue ( <i>P</i> value)	Ratio – tumor from localized RCC/tumor from metastatic RCC ( <i>P</i> value)
HLAhc	<b>1.8</b> (0.00001)	<b>3.2</b> (0.001)
β2m	<b>8.5</b> (0.00001)	<b>6.9</b> (0.003)
IP-10	<b>46</b> (0.008)	<b>5.4</b> (0.031)
I-TAC	<b>32</b> (0.001)	2.3 (0.422)
SDF-1	<b>0.81</b> (0.007)	<b>3.7</b> (0.044)
VEGF-c	<b>3.6</b> (0.0009)	<b>4.3</b> (0.007)
MIP-1-α	<b>7.3</b> (0.004)	1.2 (0.808)
RANTES	<b>5</b> (0.01)	1.8 (0.492)
IFN-γ	<b>76</b> (0.033)	<b>3.5</b> (0.00001)
TGF-β	<b>7.6</b> (0.00001)	2.0 (0.114)
IL-10	<b>2.1</b> (0.015)	3.6 (0.095)
β-Actin	1.78 (0.28)	ND
HPRT	1.14 (0.68)	ND

HLAhc, human leukocyte antigen heavy chain; β2m, beta-2-microglobulin; IP-10, interferon-gamma-inducible protein-10; I-TAC, interferon-inducible T-cell alpha-chemoattractant; SDF-1, stromal cell-derived factor-1; VEGF, vascular endothelial growth factor; MIP-1-α, macrophage inflammatory Protein-1-alpha; RANTES, regulated upon activation, normally T-expressed and presumably secreted; IFN-γ, Interferongamma; TGF-β, Tumor Growth Factor-beta; IL-10, interleukin-10; HPRT, hypoxanthine guanine phosphorybosiltransferase; RCC, renal cell carcinoma; ND, not done.

<sup>a</sup> Values given in bold are statistically significant.



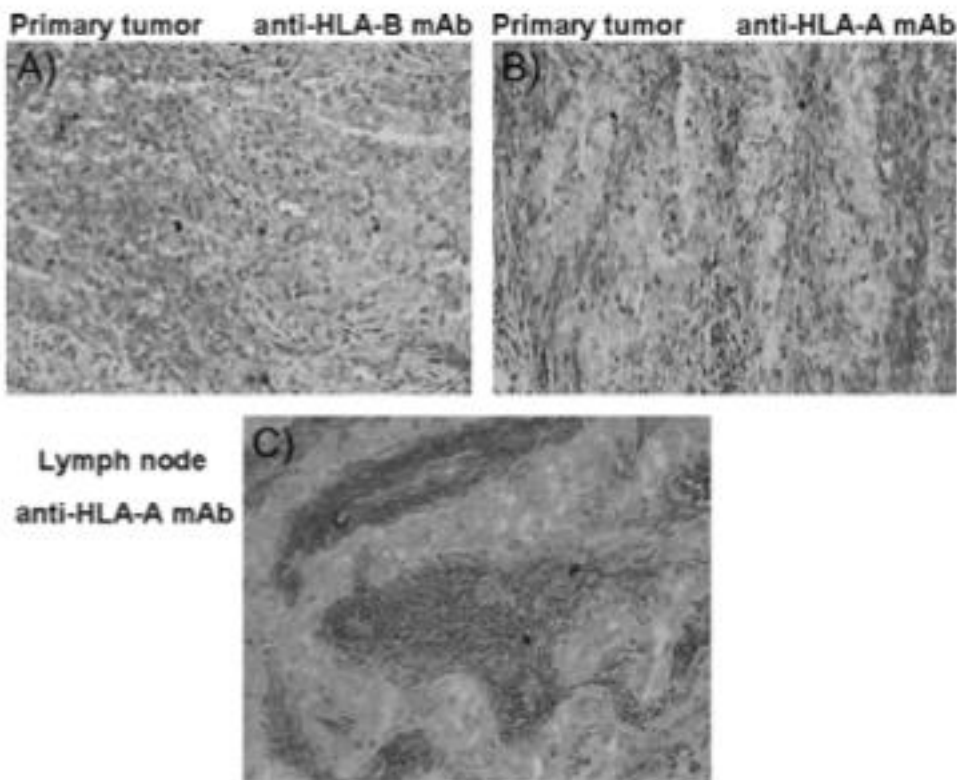
**Figure 1** Results of real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction analysis. Median values of human leukocyte antigen heavy chain (HLAhc) and  $\beta$ 2m messenger RNA (mRNA) copy numbers normalized against G6PDH mRNA copy numbers (on y-axis). The expression of HLAhc and  $\beta$ 2m is higher in the tumor tissue than in the normal kidney tissue and lower in primary tumors from patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC) than in patients with localized cancer.

#### Immunohistochemical analysis of tumors using anti-HLA class I antibodies

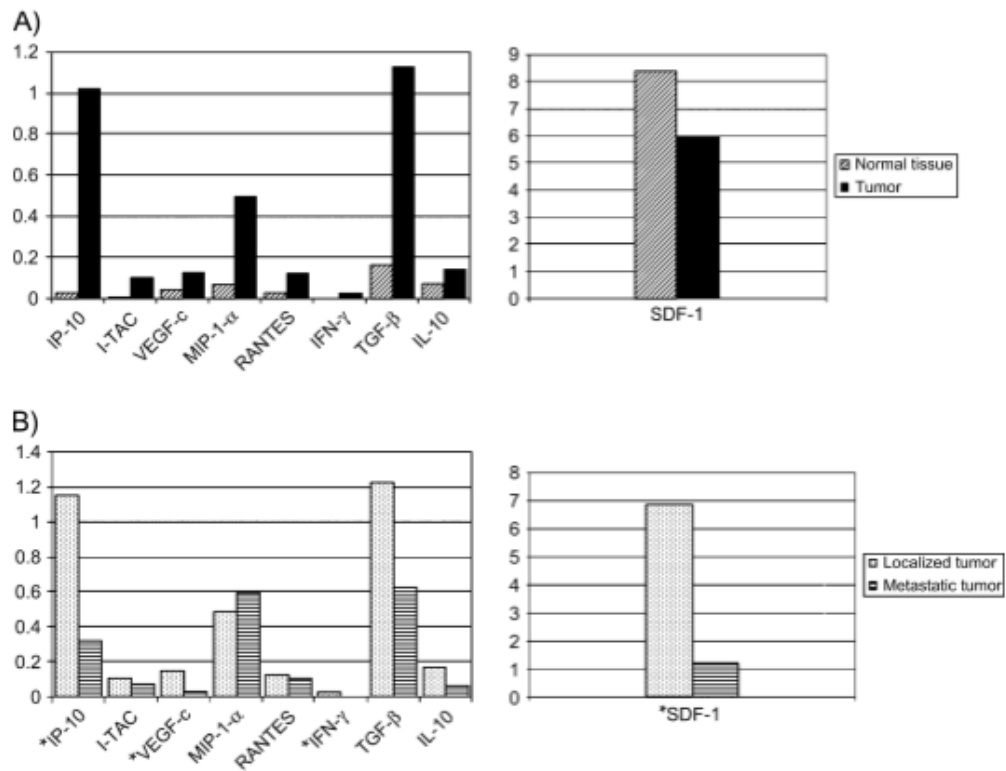
We discovered that 6% of the 20 analyzed RCC tumor samples had total HLA class I loss, while 39% of the tumors showed partial loss of various HLA class I molecules. The remaining 55% of the analyzed RCC tumors were HLA class I positive. The list of antibodies and the immuno- histochemistry techniques used in our laboratory routinely to analyze HLA class I expression on tumor samples has been previously published (9).

Immunolabeling patterns of tumor sections from patients with metastatic and localized RCC correlated well with the corresponding mRNA expression patterns. A diffuse, low-intensity labeling was observed on the tumor sections from patients with metastatic RCC. In patients with localized cancer, the labeling was strong and more homogeneous with various degree of intensity. In some patients, we were able to obtain both primary tumor and lymph node samples for immunohistochemical analysis. Figure 2 shows immunolabeling of a primary tumor (Figure 2A, B) and a lymph node (Figure 2C) obtained

from one of the patients with metastatic RCC (patient RC32; Table 1). In this case, different antibodies directed against HLA locus B and HLA locus A were used. It is evident from the figure that the primary tumor has high level of HLA-B and low protein expression of HLA-A. HLA-A protein expression is also low in lymph node. This tumor has HLA-A partial loss.



**Figure 2** An example of immunohistochemical analysis of the primary tumor and the lymph node from renal cell carcinoma patient RC32. (A) Strong and homogeneous labeling of the primary tumor with anti-human leukocyte antigen (HLA)-B antibodies (Q6/64). (B) Weak and diffuse labeling of the primary tumor with anti-HLA-A antibodies (1082C5). (C) Weak and diffuse labeling of the lymph node with anti-HLA-A antibodies (1082C5). mAb, monoclonal antibody.



**Figure 3** Results of the real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. Average cytokine and chemokine messenger RNA (mRNA) copy numbers normalized against G6PDH mRNA copy numbers (on y-axis). (A) mRNA levels of interferon-gamma-inducible protein (IP)-10, interferon-inducible T-cell alpha-chemoattractant (I-TAC), interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), macrophage inflammatory protein-1-alpha (MIP-1- $\alpha$ ), tumor growth factor-beta (TGF- $\beta$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF-c), regulated upon activation, normally T-expressed and presumably secreted (RANTES) and interleukin-10 (IL-10) are higher in the renal cell carcinoma tumor samples than in the normal kidney tissue; mRNA levels of SDF-1 in tumor and in normal tissue are similar. (B) Decreased expression of the cytokines and chemokines in primary tumors from metastatic RCC compared with those from localized RCC; SDF-1 expression in metastatic RCC is lower than in localized cancer. \*, statistically significant decrease.

### Chemokine and cytokine mRNA expression patterns

A real-time RT-PCR analysis showed a significant mRNA upregulation of the investigated cytokines and chemokines (all except SDF-1) in primary tumor samples compared with the adjacent normal tissue samples (Figure 3A). The most notable difference was observed for IP-10 and I-TAC (Table 2). Although IFN-g mRNA was not detectable in normal kidney tissue, in many tumor samples, it was measured positively. The levels of MIP-1-a, TGF-b, RANTES, VEGF-c and IL-10 were also higher in the tumors. SDF-1 expression showed an opposite pattern of expression, it was lower in the tumor than in the surrounding tissue ( $P < 0.01$ ) (Table 2 and Figure 3A).

Among the 29 patients with RCC, six patients had an advanced stage of the disease with metastasis. We have found that the expression of IFN-g, IP-10, VEGF-c and SDF-1 was

lower in the primary tumors from patients with metastatic RCC than in the tumors from patients with localized cancer (Table 2 and Figure 3B). IFN- $\gamma$  was not detectable in five of six tumor samples from metastatic cancer or in the normal tissue.

When we analyzed the expression levels of I-TAC, RANTES, TGF- $\beta$ , MIP-1-a and IL-10, we observed a tendency toward a decrease in their mRNA levels in metastatic RCC, but this decrease was not statistically significant (Figure 3B and Table 2).

**Table 3** Distinct patterns of HLA and cytokine/chemokine expression in normal kidney tissue and in primary tumors from patients with localized and metastatic RCC

	Normal tissue	Tumors from localized RCC	Tumors from metastatic RCC
HLAhc	++	+++++	++
$\beta$ 2m	++	+++++	++
IP-10	+/-	++	+
IFN- $\gamma$	-	+	-
SDF-1	+++	++	+
VEGF-c	+	++	+

-, no expression; +++++, strongly overexpressed; HLAhc, human leukocyte antigen heavy chain;  $\beta$ 2m, beta-2-microglobulin; IP-10, interferon-gamma-inducible protein-10; IFN- $\gamma$ , Interferongamma; SDF-1, stromal cell-derived factor-1; VEGF-c, vascular endothelial growth factor; RCC, renal cell carcinoma.

## Discussion

Interaction between tumor cells and their microenvironment may affect tumor growth and metastasis formation. Very frequently, a deficiency of the HLA class I expression on tumor cells is associated with cancer progression, suggesting that HLA class I downregulation might be one of the key mechanisms of tumor escape and development of metastases (6–9, 11). HLA class I expression is regulated by cytokines and chemokines produced by tumor-infiltrating cells and by the cancer cells; thus, it is important to analyze the

correlation between HLA class I and cytokine patterns in tumor microenvironment during cancer development.

In this study, we investigated how changes in the tumor expression of HLAhc, b2m and various chemokines and cytokines correlate to disease progression in patients with RCC. We have discovered that the expression of HLAhc, b2m, IP-10, I-TAC, MIP-1-a, RANTES, TGF-b, VEGF-c, IL-10 and IFN-g mRNA were higher in the tumor than in the normal kidney tissue. The most prominent difference in the expression was observed for IP-10 and I-TAC. In addition, the expression of HLA and b2m mRNA significantly decreases when patients develop metastases (Figure 1), and this decrease in HLA expression in metastatic RCC was correlated with changes in the cytokine and chemokine expression pattern (Table 3). We found that the levels of HLAhc and b2m mRNA in tumor samples obtained from patients with metastatic RCC are similar to the ones measured in normal kidney parenchyma. It correlated well with downregulation of cytokine/chemokine gene expression in advanced RCC. In particular, absence of IFN-g mRNA in metastatic RCC could lead to downregulation of HLA class I expression in progressing cancer.

Reduced expression of HLA class I is well documented in many types of tumor. Among them, cervical carcinoma and colorectal cancer are best studied and characterized over the past year.

For instance, more than 95% of cervical carcinomas (29) and about 74% of colorectal cancers (30) show some degree of HLA class I alterations. However, in our study, we observed that the median level of HLAhc and b2m mRNA expression was higher in the tumors than in the normal parenchyma. However, immunohistochemical analysis of the tumor samples showed high frequency of downregulation of the HLA class I protein expression: 55% of the tumors were HLA class I positive, 6% showed total HLA class I loss and 39% showed various types of partial HLA class I loss. The possible explanation of this discrepancy could be inadequate assembly and/or delivery of the HLA class I complex to the tumor cell surface. This suggestion is supported by some observations indicating downregulation of antigen-processing molecules in RCC (12). Similarly, cervical carcinoma with HLA class I downregulation showed abundant HLA hc transcripts in carcinoma cells (31), indicating that mechanisms responsible for this dysregulation occur at the post-transcriptional level.

An elevated expression of various chemokines in cancer has been reported previously;

however, the role of this increased expression in the tumor development is not completely understood. In a murine model of renal adenocarcinoma, mouse renal cell carcinoma (RENCA) regression of tumor was shown to be associated with elevated expression of IP-10 and monokine induced by gamma- interferon (MIG) within the tumor tissue (32). Suyama et al. found that expression levels of I-TAC, MIG and their receptor CXCR3 are considerably higher in the RCC than in the surrounding normal kidney tissue (27). Kondo et al. discovered that the expression of IP-10, MIG, MIP-1-b and RANTES was significantly increased in RCC tumor compared with normal kidney tissues. The authors suggested that the antitumorigenic effect of IP-10, MIG and MIP-1-b might result from the recruitment of lymphocyte infiltration and/or inhibition of angiogenesis in RCC (17). IP-10 is an IFN-g inducible CXC chemokine that chemoattracts activated T cells expressing the CXCR3 chemokine receptor and is known to have potent antitumor and antiangiogenic properties. In previous studies using samples from the same patients with RCC as here, we found that decrease in the levels of CXCR3 and CCR5 was positively correlated with metastasis (4). CCR5 and CXCR3 are preferentially expressed on Th1 cells (28), and cultured Th2 cells as well as Th1 cells do not migrate to the CXCR3 ligands I-TAC, IP-10 and MIG as compared to Th1 cells (33). This suggests that these chemokines are more active in the setting of Th1-driven inflammatory responses.

In this study, we observed an increased expression of IFN-g at the tumor site in localized RCC that could explain the relative increase in b2m, HLAhc, IP-10 and I-TAC. This, in turn, could elicit activated effector T cells capable of mediating tumor regression. However, in advanced RCC lesions, we did not detect IFN-g mRNA. This is correlated to a lower tumor expression of IP-10 and I-TAC that might create conditions favorable for tumor growth. Low intratumoral expression level of IFN-g was reported on other types of tumor as well. For instance, it was found to be associated with a poor prognosis in cervical carcinoma (34).

When we compared chemokine and cytokine expression, we have found that cancer progression and metastasis were correlated to a decreased expression of IFN-g, IP-10, VEGF-c and SDF-1. According to Uwatoko et al. (35), expression of IL-10 is inversely correlated to distant metastasis in RCC; the patients with IL-10 gene expression showed a decreased incidence of metastasis compared with those without IL-10 gene expression. In our study, IL-10 gene expression did not correlate to metastasis. Patients with localized and metastatic RCC had comparable levels of IL-10 mRNA.



In our study, SDF-1 was detected both in normal and in tumor tissue although at lower levels in tumor tissue. In metastatic RCC lesions, however, SDF-1 was decreased. SDF-1 and chemokine CXCR4 are critical regulators of cell recruitment from the bloodstream to specific tissues by promoting transendothelial migration through chemokine gradients across the endothelium (36). SDF-1 has a potent chemotactic activity for lymphocytes (37). There is evidence suggesting that the SDF-1/CXCR4 receptor ligand system may be involved in lymph node metastasis in breast cancer (24). Another function that has been reported to be associated with SDF-1 is its ability to induce specific migration of NK cells. It has been also shown that NK cell subsets express CXCR3 and CXCR4 – the ligand of SDF-1 (CXCL12) (38).

Our previous study showed that RCC tumors are infiltrated with NK cells and Th1-CD4 cells expressing CXCR3, CCR5 and CD45RO markers (4). This indicates the participation of chemotactic signals from the RCC microenvironment (39). NK cells are rarely observed among infiltrating cell in other types of cancer (39, 40); for instance, in breast and colon carcinoma, the presence of NK cells was insignificant (4). In RCC, NK cell-infiltrating cells are able to lyse autologous tumor cell lines in vitro, and this activity correlates to low HLA class I expression (41). It is possible that one of the factors that attract NK cells into RCC tumors is SDF-1 that is highly expressed in it. Our previous investigation also revealed that preferential Th1 polarization gradually changes during the progression of renal cancer. Patients with metastasis showed a reduction in the proportion of CXCR3/CD41 and CCR5/CD41 tumor-infiltrating subsets and an increase in the numbers of CCR4/CD41 and CD4/CD251 cells (4). Combined with the results of this study, these data show a positive correlation between low SDF-1, IFN- $\gamma$  and HLA expression and a tendency toward change from Th1 to Th2 profile of the microenvironment in metastatic progression of RCC.

In summary, our findings add new evidence that human RCC is highly immunogenic with high levels of HLA class I mRNA expression and increased expression of proinflammatory cytokines and chemokines. Upregulation of IFN- $\gamma$  stimulates expression of immunomodulatory molecules that recruit cytotoxic T cells and NK cells, leading to an immune reaction against tumor. However, like in every tumor, there is a balance between immunostimulating and immunosuppressive cytokine activity. According to our results, progression of renal cancer is associated with decreased HLA class I expression, reduced level of IFN- $\gamma$  and suppression of IP-10, VEGF and SDF-1. Thus, in metastatic RCC lesions, an immunosuppressive microenvironment dominates. It may have an inhibitory

effect on T-cell immunoreactivity against tumor and create conditions that favor immune escape and metastasis.

### Acknowledgments

We would like to thank Carmen Amézcla and MJ Rivas for expert technical assistance. This work was partially supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (PI 02/0175 to FR-C and PI 05/0897 to FG), the plan Andaluz de Investigación, Instituto de Salud Carlos III-Red de centros de Cáncer-RTICCC-contract CO3/10 and the Plan Nacional, Spain, and also by the grant from the European Network for the identification and validation of Antigens and biomarkers in Cancer and their application in clinical Tumor immunology (ENACT, contract No.503306).

### References

1. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immun* 2002; 3: 991–8.
2. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 263–74.
3. Shabtai M, Ye H, Frischer Z et al. Increased expression of activation markers in renal cell carcinoma infiltrating lymphocytes. *J Urol* 2002; 168: 2216–9.
4. Cozar JM, Canton J, Tallada M et al. Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 858–66.
5. de Grujil TD, Bontkes HJ, van den Muysenberg AJ et al. Differences in cytokine mRNA profiles between premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Eur J Cancer* 1999; 35: 490–7.
6. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997; 18: 89–95.
7. Garrido F, Cabrera T, Accolla RS et al. HLA and cancer. In: Charron D, ed. *HLA, Genetic diversity of HLA. Functional and Medical Implications*, Vol 1. Sevres: EDK, 1997, 445–56.

8. Cabrera T, Fernandez MA, Sierra A et al. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol* 1996; 50: 127–34.
9. Cabrera T, Lopez-Nevot MA, Gaforio JJ et al. Analysis of HLA expression in human tumor tissues. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 1–9.
10. Saio M, Teicher M, Campbell G et al. Immunocytochemical demonstration of down regulation of HLA class-I molecule expression in human metastatic breast carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21: 243–9.
11. Maleno I, Lopez Nevot MA, Seliger B, Garrido F. Low frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21 in clear renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 2004; 109: 636–8.
12. Atkins D, Ferrone S, Schmahl GE et al. Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol* 2004; 171: 885–9.
13. Seliger B, Hohne A, Knuth A et al. Analysis of the major histocompatibility complex class I antigen presentation machinery in normal and malignant renal cells: evidence for deficiencies associated with transformation and progression. *Cancer Res* 1996; 56: 1756–60.
14. Seliger B, Atkins D, Bock M et al. Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1721–7.
15. Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev* 2004; 202: 275–93.
16. Slaton JW, Inoue K, Perrotte P et al. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 158: 735–43.
17. Kondo T, Ito F, Nakazawa H et al. High expression of chemokine gene as a favorable prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol* 2004; 171: 2171–5.
18. Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 143–

54.

19. Keller ET, Zhang J, Cooper CR, Smith PC et al. Prostate carcinoma skeletal metastases: cross talk between tumor and bone. *Cancer Metastasis Rev* 2001; 20: 333–49.

20. Sehgal A, Keener C, Boynton AL et al. CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J Surg Oncol* 1998; 69: 99–104.

21. Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y et al. Expression of tissue cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3530–5.

22. Liotta LA. An attractive force in metastasis. *Nature* 2001; 410: 24–25.

23. Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med* 2001; 345: 833–5.

24. Muller A, Homey B, Soto H et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50–56.

25. Uchida D, Begum NM, Almofti A et al. Possible role of tissue-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res* 2003; 290: 289–302.

26. Johrer K, Zelle-Rieser C, Perathoner A et al. Up-regulation of functional chemokine receptor CCR3 in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2459–65.

27. Suyama T, Furuya M, Nishiyama M et al. Up-regulation of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokines IFN-inducible T-cell alpha chemoattractant and monokine induced by IFN-gamma and of their receptor CXC receptor 3 in human renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 103:258-67.

28. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187: 875–83.

29. Koopman LA, Mulder A, Corver WE et al. HLA class I phenotype and genotype alterations in cervical carcinomas and derivative cell lines. *Tissue Antigens* 1998; 51: 623–

36.

30. Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T et al. Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 2004; 56: 244–53.

31. Cromme FV, Airey J, Heemels MT et al. Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* 1994; 179: 335–40.

32. Tannenbaum CS, Tubbs R, Armstrong D et al. The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. *J Immunol* 1998; 161: 927–32.

33. Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 344–5.

34. Tartour E, Gey A, Sastre-arau X, Lombard Surin I, Mosseri V, Fridman WH. Prognostic value of intratumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 287–94.

35. Uwatoko N, Tokunaga T, Hatanaka H et al. Expression of interleukin-10 is inversely correlated with distant metastasis of renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 20: 729–33.

36. Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 336–41.

37. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM et al. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996; 184: 1101–9.

38. Hanna J, Wald O, Goldman-Wohl D et al. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD162 human natural killer cells. *Blood* 2003; 102: 1569–77.

39. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M et al. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol* 2003; 24: 603–9.

40. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 577–83.

41. Schleypen JS, Von Geldern M, Weiss EH et al. Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. *Int J Cancer* 2003; 106: 905–12.

## 2.- Alta incidencia del polimorfismo CTLA-4 AA (CT60) en cáncer renal

### INTRODUCCIÓN

Las células T juegan un papel fundamental en la actividad antitumoral y las moléculas que regulan su actividad podrían influir en la susceptibilidad a padecer cáncer. Junto a las células inflamatorias infiltrantes, los tumores también producen citoquinas y factores de crecimiento que afectan al desarrollo tumoral mediante la modificación de la inmunogenicidad y la angiogénesis. La incapacidad de los linfocitos infiltrantes del tumor para llevar a cabo una respuesta inmune efectiva puede ser secundaria a la presencia de factores supresores en el tumor. Las citoquinas IL 10 e IL-4 producidas por las células Th2 pueden inhibir la respuesta inmune. CTLA-4 juega un importante papel en el mantenimiento de la tolerancia periférica como un regulador inhibitorio de la respuesta inmune adaptativa. La molécula es homóloga a CD28 pero con efectos negativos a la activación de las células T. Los anticuerpos anti-CTLA4 se están utilizando en ensayos clínicos de inmunoterapia, median en la regresión del cáncer en pacientes con melanoma metastásico y con cáncer renal como resultado de un incremento en la activación de las células T.

En este estudio analizamos la relación de los polimorfismos de CTLA-4/CT60, CTLA-4/A49G, IL-4 e IL-10 con el riesgo de desarrollo de CR. También se correlacionaron los polimorfismos con el pronóstico del CR.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 127 pacientes con CR y 176 controles sanos. La edad media de los pacientes era de 60 años con un índice varón/mujer de 2:1. Según la clasificación TNM 2002, el 66.7% eran T1-2N0M0, el 18.4% eran T3-4N0M0 y el 14.9% eran N1M1. El seguimiento medio era de 5.3 años. Evaluamos los factores pronósticos del CR según el sistema de estadiaje integrado de la UCLA.

Se emplearon en el genotipado sondas Taqman mediante un método de PCR a tiempo real empleando el ensayo "Custom TaqMan SNP Genotyping Assays" (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se utilizaron dos sondas Taqman MGB específicas para cada alelo del polimorfismo marcadas con los fluorocromos VIC y FAM respectivamente: Estas sondas hibridan específicamente con la secuencia diana entre los oligonucleótidos utilizados, durante las fases de alineamiento y extensión. Durante la reacción, la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa va liberando la sonda que previamente se había unido al DNA y al aumentar la separación entre la molécula MGB y el fluorocromo se produce un aumento de la fluorescencia.

El DNA fue aislado de sangre periférica usando el QIAamp DNA Blood Minikit (Qiagen, Hilden, Germany). La discriminación alélica se procesó con el software SDS 1.1 de ABI PRISM7750 Sequence Detector.

Para el análisis de los datos se agrupan de acuerdo al genotipo y a la frecuencia alélica estimada. Se estudia en primer lugar si los datos se ajustan el equilibrio Hardy Weinberg de las frecuencias alélicas. Diferencias en la distribución de los genotipos y frecuencias alélicas entre pacientes y controles se calcularon mediante el test de la Chi cuadrado o el test exacto de Fischer si las frecuencias esperadas son inferiores a 5%.

## RESULTADOS

Se estudiaron dos SNPs del gen CTLA-4, uno en la posición +6230 (CT60) y otro en la posición +49. En el gen IL-10 se analizaron tres polimorfismos en las posiciones -1082, -819 y -592.

Se detectó una asociación entre los polimorfismos de CTLA-4 en relación al riesgo de padecer CR. Fue observado una alta frecuencia de los genotipos CTLA4/CT60-AA y CTLA4/A49G-AA en pacientes con CR versus controles: (para CTLA4/CT60-AA: 38.6% vs. 22.9% en controles,  $p < 0.005$  y OR = 2.12 con 95% CI: 1.28–3.50; y para CTLA4/A49G-AA: 58.4% versus 44.3% en controles,  $p < 0.022$  y OR = 1.76 with 95% CI: 1.11–2.80). También se apreció una asociación entre el polimorfismo CTLA4/CT60 y el grado tumoral, demostrando una alta frecuencia del genotipo AA con CR de alto grado. No se encontró asociación entre los polimorfismos estudiados y el estadio tumoral (TNM) o la edad. Vimos que los marcadores CTLA4/CT60 y CTLA4/A49G están en desequilibrio de



unión en controles y pacientes. Respecto a la IL-4 e IL-10, no encontramos diferencias significativas en pacientes y controles. Estas diferencias encontradas fueron comparadas con lo observado en pacientes con cáncer colorectal. En este estudio nosotros demostramos que en la población de estudio las asociaciones encontradas se circunscriben a pacientes con cáncer renal y no son observadas en pacientes con cáncer colorectal.

# High incidence of CTLA-4 AA (CT60) polymorphism in renal cell cancer

**Jose M. Cozar<sup>a</sup>, Jose M. Romero<sup>b</sup>, Natalia Aptsiaurib, Fernando Vazquez<sup>a</sup>,  
Jose R. Vilchez<sup>b</sup>, Miguel Tallada<sup>a</sup>, Federico Garrido<sup>b</sup>,  
Francisco Ruiz-Cabello<sup>b,\*</sup>**

<sup>a</sup>*Servicio de Urología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves and University of Granada, Granada, Spain*

<sup>b</sup>*Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen de las Nieves and University of Granada, Granada, Spain*

**Summary** Polymorphism in genes encoding T-cell regulatory proteins and cytokines may influence inflammation and cancer development via regulation of antitumor immune response. In the current study we analyzed genotypic frequencies of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4)/CT60, CTLA-4/A49G, interleukin (IL)-4, and IL-10 polymorphisms in 117 renal cell carcinoma patients, 96 patients with colorectal cancer, and 196 healthy controls to test for an association between polymorphism in these genes and the risk of renal and colon cancer in a Spanish group of patients. In the case-control study, DNA samples from cancer patients and controls were analyzed using a TaqMan single nucleotide polymorphism genotyping assay. The distribution of IL-4 and IL-10 polymorphisms was similar between renal cancer patients and controls. However, a higher incidence of CTLA-4/CT60-AA genotype ( $p = 0.005$ ; odds ratio (OR) = 2.12 with 95% confidence interval (CI): 1.28–3.50) and CTLA-4/A49G-AA ( $p = 0.022$ ; OR = 1.76 with 95% CI: 1.11–2.80) genotype was observed in renal cancer patients than in controls. In addition, we observed a positive correlation between the AA genotype in both CTLA-4 polymorphisms and RCC grade, suggesting a role for the CTLA4 gene in tumor development. Therefore, our data suggest the CTLA-4 gene may be a candidate as a renal adenocarcinoma susceptibility gene, but does not play an important role in colon cancer.

**Introduction** T cells play an important role in antitumor immunity, and molecules that mediate regulation of T-cell activity could influence cancer susceptibility. Beside infiltrating inflammatory cells, tumors also produce cytokines and growth factors that affect tumor development by modifying immunogenicity and angiogenesis. The inability of tumor infiltrating lymphocytes to mount an effective immune response to malignancy may be secondary to the presence of suppressive factors in the tumor that prevent tumor infiltrating lymphocytes from transforming into effector cells. The suppressive factors include cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4), interleukin (IL)-10, and IL-4. Cytokines produced by type Th2 helper cells, e.g., IL-10 and IL-4, can inhibit cell-mediated immune responses [1]. Promoters of anti-inflammatory cytokine genes have polymorphisms that affect cytokine production, thereby influencing humoral and cellular immunity. IL-10 haplotypes are associated with persistent viral hepatitis B infection [2] and the development of hepatocellular carcinoma [3]. Furthermore, a persistent state of inflammation favors tumorigenesis in certain types of cancer [4]. In this context, CTLA-4 plays an important role in the maintenance of peripheral tolerance as one of the key negative regulators of adaptive immune responses [5]. The molecule is homologous to CD28 but with opposite effects on T-cell activation, because it downregulates the immune response upon B7 engagement [6]. Anti-CTLA-4 antibodies mediate cancer regression and autoimmunity in patients with metastatic melanoma and renal cancer as a result of increased T-cell activation [7]. Therefore, CTLA-4, IL-10, and IL-4 genes are good candidates as cancer susceptibility genes. Human renal cell carcinoma (RCC) is an angiogenic cancer characterized by high leukocyte infiltration and cytokine production [8]. Immunotherapy with IFN-alfa or IL-2 is an effective way to manage metastatic RCC patients. RCC demonstrates good response to immunotherapy aimed to block activity of CTLA-4 [5], indicating a potential role of the immune system in regulating tumor growth of RCC. The current study analyzed the relevance of polymorphisms in CTLA-4/CT60, CTLA4/A49G, IL-4, and IL-10 genes for the risk of developing RCC. The frequency of genotypes of the studied polymorphisms was compared between RCC and colon carcinoma patients. Finally, the polymorphisms were correlated with variables associated with RCC prognosis, including tumor stage and grade.

## Subjects and methods

### *Patients and healthy controls*

The study included 127 patients diagnosed with clear cell RCC, 96 patients with colon cancer, and 176 healthy blood donors (controls) from the Spanish Bone Marrow Donor Registry. All patients signed informed consent to participate in the study. The 127 patients with RCC were diagnosed and treated at the Department of Urology of Virgen de las Nieves Hospital between 1997 and 2006, and the majority had undergone total or partial nephrectomy. The mean age of these RCC patients was 60 years (range, 23–84 years); 66.7% were male and 33.3% were female (male/female ratio of 2:1). Two consulting pathologists retrospectively and independently reviewed the hematoxylin–eosin-stained tissue slides according to the WHO classification. The Fuhrman scale was used to assess nuclear grade. Tumors stage was assigned according to the 2002 TNM classification (Table 1): 66.7% of patients had localized tumor (T1-2N0M0), 18.4% had locally advanced stage (T3-4N0M0), and 14.9% had metastatic stage (N1M1) (Table 1). Mean follow-up of patients was 5.3 years (range, 1–9 years), with a survival rate of 95% in patients with localized cancer, 80% in patients with locally advanced stage, and 40% in patients with metastatic cancer. Mean age of the colon carcinoma patients was 68.15 years (range, 30–90 years); 66.7% were male and 33.3% female, a similar male:female (2:1) ratio to that in the group of RCC patients. We did not evaluate risk factors of adverse prognostic factors other than cancer characteristics according to the UCLA integrating staging system. The system includes TNM stage, histological grade (Fuhrman), and performance status (ECOG) as prognostic factors. We used first two parameters, because the performance status in all cases was equal to zero and was not considered relevant for statistical analysis [9]. Colon tumors were also classified according to the 2002 TNM classification (Table 1): 10.6% of patients had localized tumor (T1-2N0M0), 43.9% had locally advanced stage (T3-4N0M0), and 45.5% had metastatic stage (N1M1) (Table 1). The mean age of the healthy control group was 59 years, with a male: female ratio of 2:1. Control samples were collected between 2005 and 2006. All patients and controls were Caucasian and of Spanish origin, all from the Granada region of Spain.

### *CTLA4/CT60, CTLA4/A49G, IL-10 and IL-4 genotyping*

Total genomic DNA was isolated from peripheral blood of cancer patients and healthy controls using a standard method (QIAamp DNA Mini kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Genotyping was performed using a TaqMan 5' allelic discrimination assay. We typed several SNPs: IL10-1082A>G (rs1800896), IL10-592A>C (rs1800872), IL10-819 C>T (rs1800871), CTLA-4 CT60 A>G (rs3087243) at position +6230, CTLA-4/ +49 A>G (rs231775) in exon 1, and IL4-590 C>T (rs2243250) upstream from the open reading frame of the IL4 gene. SNP genotyping was carried out using a Custom TaqMan SNP Genotyping Assay method (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Minor groove binding probes were labeled with the fluorescent dyes VIC and FAM. Allelic discrimination using TaqMan was performed using 10 ng of sample DNA in a 25-microl reaction containing 12.5 microl TaqMan Universal PCR Mix (Applied Biosystems) 300 nM primers, and 200 nM TaqMan MGB probes (Applied Biosystems). Reaction conditions consisted of preincubation at 50°C for 2 min and 95°C for 10 min and cycling for 40 cycles of 95°C, 15 s, and 60°C, 1 min. Amplifications were performed in an ABI Prism 7750 machine (Applied Biosystems) for continuous fluorescence monitoring.

**Table 1** Characteristics of patients with clear cell RCC and colon carcinoma

	Average age in years (range)	Gender (%)		Tumor grade (TNM) (%)		
		Males	Females	Low	Medium	High
				(T1-N0M0)	(T3-4N0M0)	(Tx, N+M>0)
Colon carcinoma	68.15 (30-90)	66.7	33.3	10.6	43.9	45.5
RCC	60.05 (23-84)	66.7	33.3	68	15	17

Abbreviation: RCC = renal cell carcinoma.

### *Statistical analysis*

SNP allele frequencies were tested against departure from Hardy– Weinberg equilibrium before analysis. To calculate odds ratios (OR) in tumor and control groups using 2 x 2 tables, each genotype was compared with the other two genotypes of all studied genes. Genotype frequencies were compared between patients and controls using the Yates corrected Pearson  $\chi^2$  test for the 2 x 2 tables or Fisher's exact test when appropriate. ORs and corresponding 95% confidence intervals (CIs) were calculated. Pearson's  $\chi^2$  test was used for analysis of the 3 x 3 tables. Multivariate logistic regression analysis was also performed to obtain ORs and 95% CI. A probability ( $p$ ) value of <0.05%

was considered statistically significant. The statistical software package SPSS v. 12.0 was used for analyses. The power of the study to detect the effect of a polymorphism in disease susceptibility was estimated by means of Granmo 5.0 software. Linkage disequilibrium ( $r^2$ ) of the markers CTLA-4/CT60 A>G (rs3087243) at position +6230 and CTLA-4/ +49 A>G (rs231775) in exon 1 was calculated using Thesias software (available at [http:// genecanvas.ecgene.net/](http://genecanvas.ecgene.net/)).

### *Results*

The allelic distribution of CTLA-4, IL-4, and IL-10 polymorphisms was assessed in patients with clear cell RCC and colon cancer in comparison with healthy controls. Two SNPs of CTLA-4 gene were studied, one (CT60) at position +6230 in the 3 untranslated region and the other at position +49 in exon 1. In the IL-10 gene promoter, three polymorphisms were analyzed (at positions -1082, -819, and -592). In the IL-4 gene, we investigated the 590-T allele associated with increased IL-4 gene expression *in vitro*. Distributions of these polymorphisms in RCC and colon carcinoma are summarized in Tables 2 and 3. The number of RCC patients enrolled in the study was 127; however, in analysis of the IL-10 1082 polymorphism the number of analyzed samples was 126, and in the case of CTLA4/A49G it was 125 (Table 2).

### *SNP study in RCC*

An association was found between polymorphisms of the CTLA-4 gene and increased risk of development of RCC. A higher frequency of the CTLA4/CT60-AA and CTLA4/ A49G-AA genotypes was determined in patients with RCC versus controls (for CTLA4/CT60-AA: 38.6% vs. 22.9% in controls,  $p = 0.005$  and OR = 2.12 with 95% CI: 1.28–3.50; and for CTLA4/A49G-AA: 58.4% versus 44.3% in controls,  $p = 0.022$  and OR = 1.76 with 95% CI: 1.11–2.80) (Table 2).

**Table 2** Statistical analysis of SNP polymorphism in RCC vs control group

Genotype	RCC patients (n = 127)	Controls (n = 176)	OR (95% CI)	$\chi^2$ , significance
<b>IL-10 1082<sup>1</sup></b>				
AA	42 (33.3%)	58 (33.1%)	1.01 (0.62-1.64)	1.02
AG	62 (49.2%)	87 (49.7%)	1.02 (0.65-1.61)	1.00
GG	22 (17.5%)	30 (17.1%)	0.98 (0.53-1.79)	1.01
<b>IL-10 819 (592)</b>				
CC (CC)	81 (63.8%)	98 (56%)	1.38 (0.87-2.21)	0.21
CT (AC)	37 (29.1%)	63 (36%)	1.37 (0.84-2.24)	0.26
TT (AA)	9 (7.1%)	14 (8%)	1.14 (0.48-2.72)	0.94
<b>IL-10 Combined</b>				
ACC/ACC	14 (11.1%)	19 (10.9%)	1.02 (0.49-2.12)	1.00
ACC/ATA	19 (15.1%)	25 (14.4%)	1.06 (0.56-2.02)	0.99
ACC/GCC	44 (34.9%)	49 (28.2%)	1.37 (0.84-2.24)	0.26
ATA/ATA	9 (7.1%)	14 (8%)	0.88 (0.37-2.10)	0.94
ATA/GCC	18 (14.3%)	37 (21.3%)	0.62 (0.33-1.14)	0.16
GCC/GCC	22 (17.5%)	30 (17.2%)	1.02 (0.55-1.86)	1.00
<b>IL-4</b>				
CC	93 (73.2%)	123 (70.7%)	1.13 (0.68-1.89)	0.72
CT	30 (23.6%)	47 (27%)	1.20 (0.70-2.03)	0.59
TT	4 (3.2%)	4 (2.3%)	0.72 (0.18-2.95)	0.73*
<b>CTLA4/CT60</b>				
AA	49 (38.6%)	40 (22.9%)	2.12 (1.28-3.50)	0.005 <sup>a</sup>
AG	55 (43.3%)	88 (50.3%)	1.32 (0.84-2.10)	0.28
GG	23 (18.1%)	47 (26.9%)	1.66 (0.95-2.91)	0.10
<b>CTLA4/A49G<sup>2</sup></b>				
AA	73 (58.4%)	78 (44.3%)	1.76 (1.11-2.80)	0.022 <sup>a</sup>
AG	43 (34.4%)	77 (43.8%)	1.48 (0.92-2.38)	0.13
GG	9 (7.2%)	21 (11.9%)	1.74 (0.77-3.95)	0.25

Abbreviations: RCC = renal cell carcinoma; OR = odds ratio; SNP = single nucleotide polymorphism; CI = confidence interval.

<sup>1</sup> number of patients was 126.

<sup>2</sup> number of patients was 125.

\* Fisher exact test.

<sup>a</sup> Statically significant difference between patients with renal cell carcinoma and controls.

**Table 3** Statistical analysis of SNP polymorphism in colon carcinoma vs. control group

Genotype	Colon carcinoma patients (n = 96)	Controls (n = 176)	OR (95% CI)	$\chi^2$ , significance
IL-10 1082				
AA	31 (32.3%)	58 (33.1%)	0.96 (0.57-1.64)	0.99
AG	48 (50.0%)	87 (49.7%)	0.99 (0.60-1.63)	1.00
GG	17 (17.7%)	30 (17.1%)	0.96 (0.50-1.85)	1.01
IL-10 819 (592)				
CC (CC)	52 (54.7%)	98 (56%)	0.95 (0.57-1.57)	0.94
CT (AC)	41 (43.2%)	63 (36%)	0.74 (0.44-1.23)	0.31
TT (AA)	2 (2.1%)	14 (8%)	4.04 (0.90-18.18)	0.09
IL-10 Combined				
ACC/ACC	12 (12.6%)	19 (10.9%)	1.18 (0.55-2.55)	0.82
ACC/ATA	16 (16.8%)	25 (14.4%)	1.21 (0.61-2.40)	0.72
ACC/GCC	22 (23.2%)	49 (28.2%)	0.77 (0.43-1.37)	0.46
ATA/ATA	5 (5.3%)	14 (8%)	0.63 (0.22-1.82)	0.55
ATA/GCC	23 (24.2%)	37 (21.3%)	1.18 (0.65-2.14)	0.69
GCC/GCC	17 (17.9%)	30 (17.2%)	1.05 (0.54-2.01)	1.00
IL-4				
CC	68 (70.8)	123 (70.7%)	1.01 (0.58-1.74)	1.00
CT	25 (26.0%)	47 (27%)	1.05 (0.60-1.85)	0.98
TT	3 (3.1%)	4 (2.3%)	0.73 (0.16-3.33)	0.70 <sup>a</sup>
CTLA-4/CT60				
AA	20 (21.1%)	40 (22.9%)	0.90 (0.49-1.65)	0.85
AG	56 (58.9%)	88 (50.3%)	0.70 (0.42-1.17)	0.22
GG	19 (20.0%)	47 (26.9%)	1.47 (0.80-2.69)	0.27
CTLA-4/A49G				
AA	46 (47.9%)	78 (44.3%)	1.16 (0.72-1.90)	0.66
AG	44 (45.8%)	77 (43.8%)	0.92 (0.56-1.52)	0.84
GG	6 (6.3%)	21 (11.9%)	2.03 (0.79-5.22)	0.20

Abbreviations: OR = odds ratio; SNP = single nucleotide polymorphism; CI = confidence interval.

<sup>a</sup> Fisher exact test.



Multivariate regression analysis produced no additional information, although a higher OR was obtained for CTLA4/CT60 (OR = 2.59 with 95% CI: 1.40–5.3). The allelic distribution in controls was similar to that reported in a previous study of Spanish patients [10]. In addition, an association was reported between CTLA4/CT60 polymorphism and tumor grade in RCC patients (Table 4); logistic regression analysis confirmed the finding, demonstrating a higher frequency of AA genotype in patients with higher tumor grade ( $p = 0.007$ ; OR = 4.04 with 95% CI: 1.46–11.18) (Table 4). There was no association in RCC patients between the studied polymorphisms and tumor stage (TNM) or patient age or gender. No significant differences in IL-4 and IL-10 promoter polymorphisms were observed between RCC patients and controls (Table 2). According to our calculations, the CTLA4/CT60 and CTLA4/A49 markers are in strong linkage disequilibrium ( $d' = 0.96$  in controls and  $d' = 0.94$  in patients,  $p < 0.00001$ ).

#### *SNP study in colon carcinoma*

Likewise, no significant differences in the distribution of genotypes of CTLA-4/CT60, CTLA-4/A49G, IL-4, or IL-10 polymorphisms were observed between colon cancer patients and controls (Table 3). However, there was a tendency toward a lower frequency of IL-10 -819/TT and IL-10 -592/AA genotypes in colon carcinoma patients versus controls (1.2% in patients vs. 8% in controls,  $p = 0.09$  for both SNPs) (Table 3).

## **Discussion**

In the current study we evaluated an association of CTLA4, IL-10, and IL-4 gene polymorphisms with the incidence of renal and colorectal cancer. The obtained data illustrated an increased frequency of CTLA-4/CT60-AA and CTLA-4/+49-AA genotypes in RCC, indicating an association of CTLA-4 polymorphism with an increased risk of developing RCC. In contrast, there were no significant differences in the distribution of the studied genotypes between patients with colorectal cancer and controls. Similarly, no significant correlation was reported between CTLA4/+49G polymorphism and the risk of colorectal neoplasm in Italian patients [11]. Genetic polymorphism in cytokine genes was associated with the risk of development of certain types of cancer [12]. Proinflammatory cytokines promote tumor development, and there is scientific evidence suggesting chronic inflammation can lead to the initiation and progression of cancer in a genetic-controlled fashion. Signals from costimulatory molecules and their receptors on dendritic cells and T cells (*e.g.*, B7-1/CD28 or CD40/CD40L) and signals from inhibitory receptors (such as

CTLA-4) and cytokines may modulate the strength of the immune response against malignant cells and lead to cancer regression, as previously observed in vaccinated melanoma patients after anti-CTLA-4 treatment [13]. Cellular interactions via B7-CTLA4 ligation are key for transduction of signal for anergy and apoptosis. Cancer regression was correlated with induction of autoimmunity, demonstrating interference with the immunomodulatory molecules involved in T-cell–DC interaction could potentially lead to an undesirable Th1–Th2 imbalance and the corresponding clinical manifestations [14]. Several reports indicated a higher risk of cancer in autoimmune rheumatic disease [15]. Administration of CTLA4 blockade was reported to mediate cancer regression and autoimmunity in patients with metastatic melanoma; the antitumor effect of the blockade was a result of increased T-cell activation rather than inhibition of depletion of T regulatory cells [7].

**Table 4** Association of studied polymorphisms and clinical grade and stage of RCC

Genotype	TNM			$\chi^2$	Grade			$\chi^2$
	Low (T1-NOMO)	Medium (T3-4NOMO)	High (Tx, N+M>0)		G1	G2	G3	
IL-10 1082				Not possible to calculate				$P = 0.74$
AA	31	7	3		10	18	12	
AG	37	7	17		17	22	21	
GG	17	3	1		3	9	8	
IL 10-819 (592)				$P = 0.59$				$P = 0.73$
CC (CC)	58	8	14		18	35	26	
CT (AC)	22	7	6		10	10	13	
TT (AA)	6	2	1		2	4	3	
IL-4				$P = 0.49$				$P = 0.19$
CC	59	13	18		24	30	34	
CT	24	3	3		6	17	7	
TT	3	1	0		0	2	1	
CTLA4/CT60				$P = 0.85$				$p = 0.022^a$
AA	34	5	9		8	15	25	
AG	39	8	8		17	24	11	
GG	13	4	4		5	10	6	
CTLA4/A49G				$P = 0.48$				$p = 0.54$
AA	50	11	11		19	27	25	
AG	33	4	6		10	20	11	
GG	3	2	2		1	2	4	

<sup>a</sup> Statistically significant differences at 95% confidence interval.

Cell surface expression of CTLA4 is influenced by polymorphisms in its sequence. The G allele at position +49 of exon 1 of CTLA-4 gene affects the CTLA-4 function and was correlated with a higher risk of various autoimmune diseases, including Grave's disease, type 1 diabetes, and Hashimoto's thyroiditis [16]. On the other hand, CTLA4/CT60-A/ 49-A haplotype is associated with infant asthma and atopic dermatitis [17]. Furthermore, both polymorphisms were associated with viral persistence influencing recovery from viral hepatitis B infection [2]. There are only speculations about how CTLA4 polymorphism could modulate the function of the molecule *in vivo*. Based on various reports it is possible to conclude decreased expression and lower efficiency of CTLA-4 are associated with 49G allele. Increased lymphocyte proliferation and lower expression of CTLA-4 on cell surface were reported in individuals with +49G genotype under conditions of suboptimal activation [18]. In another report, individuals homozygous for adenine (A) in position 49 in exon 1 showed significantly increased cell surface CTLA-4 expression after stimulation and mRNA in basal conditions [19]. CTLA-4 exerted less inhibitory effect on T-cell proliferation in the case of GG in position 49 compared with the AA genotype in this position [20]. CTLA-4 is expressed constitutively by CD25+CD4+ regulatory T cells, which suppress the effector T-cell responses [21]. Depletion of the T-cell subpopulation enhances antitumor immunity. According to our observations, RCC patients are less often carriers of an allele (G) functionally associated with higher expression of a T-cell downregulatory protein. Because CTLA-4 has an inhibitory function on T cells, decreased CTLA-4 expression may lower the risk of RCC. Decreased expression of the molecule on lymphocytes, especially on T regulatory cells, may contribute to antitumor immunity by modulating apoptosis and reducing inhibitory influence. There are two known isoforms of CTLA-4: a full-length isoform and a soluble isoform, lacking exon 3 (transmembrane domain) and generated by alternative splicing of the primary transcript [22]. The soluble form can be constitutively produced and by blocking B7 receptors during the immune response can regulate immune reactivity. CTLA4/ CT60 SNP is believed to control the processing and production of soluble CTLA4. The CTLA-4/CT60 G allelic variant is correlated with reduced mRNA levels of the soluble alternative splice form of CTLA-4, which inhibits T-cell proliferation *in vitro* [22]. In our study a higher incidence of CT60-A allelic variant may lead to higher production of the soluble form of CTLA4, causing stronger inhibition of T-cell immunity.

We also studied polymorphisms of IL-10 and IL-4 in patients with RCC and colon cancer. IL-10 and IL-4 are antiinflammatory immunosuppressive cytokines with an important role in tumorigenesis and autoimmunity. IL10 is secreted by regulatory T cells and can inhibit

dendritic and T-cell function with a negative impact on induction of the immune response. IL-10 promoter polymorphism may influence tumor development by altering the levels of IL-10 in the serum or tumor microenvironment. Higher IL-10 production is associated with -1082 G/G. The association between IL-10 polymorphism and different types of cancer is controversial. Thus, IL-10-1082-AA was associated with an increased risk of breast cancer, prostate cancer, and cutaneous malignant melanoma but does not appear to play an important role in prostate, gastric, esophageal, and ovarian cancer. According to our results, IL-10 gene polymorphism is not associated with an increased risk of developing either RCC or colon cancer, in contrast with a previous report of a relevant role of IL-10-1082-AA genotype in the development of RCC [23]. Similarly, we did not find any association of IL-4 polymorphism with the incidence of RCC or colorectal cancer, indicating the genetic marker does not increase susceptibility to these two types of cancer. In contrast, IL-4 polymorphism was reported to play a role in oral and bladder cancers.

In addition, we observed an association between tumor grade but not tumor stage and CTLA4/CT60 polymorphism in our series of RCC patients. The finding suggests the implication of the gene in tumor ontogeny and development rather than in tumor progression and metastasis. Because a higher grade implies a poorer prognosis, the CT60-AA genotype may be a potential marker for a more progressive course of RCC. The association of CTLA4 polymorphisms with disease susceptibility and tumor grade in RCC but not in colon cancer or lymphoma (unpublished personal observation) may imply a distinct pathogenesis of renal cancer related to the status of T-cell inhibitory factors such as CTLA4. Colon cancer results from the accumulation of various gene mutations and chromosomal abnormalities [24]. The risk of colon cancer is influenced by various factors, including diet and alcohol consumption, whereas there is evidence the immune system plays a more important role in the development and growth of RCC. Detection of high-risk groups based on the knowledge of cancer-susceptibility genes is important for the early diagnosis of RCC.

#### *Acknowledgments*

The work was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias and Servicio Andaluz de Salud and by the ESTDAB project, Contract QLRI-CT-2001-01325. We are very grateful to Dr. Luis Miguel Real (Neocodex, Sevilla, Spain) for critical comments and help with the interpretation of the statistical analysis.

#### *References*

- [1] Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y. Cytokines in cancer immunity

and immunotherapy. *Immunol Rev* 2004;202: 275.

[2] Thio CL, Mosbrugger TL, Kaslow RA, Karp CL, Strathdee SA, Vlahov D, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and recovery from hepatitis B virus infection. *J Virol* 2004;78:11258.

[3] Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Wang HJ, Kim YJ, et al. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet* 2004;13:397.

[4] Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)* 2002;16: 217, 229, discussion 230–232.

[5] Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, Allison JP. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2006;18:206.

[6] Manzotti CN, Tipping H, Perry LC, Mead KI, Blair PJ, Zheng Y, et al. Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2004;32:2888.

[7] Maker AV, Attia P, Rosenberg SA. Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol* 2005;175:7746.

[8] Cozar JM, Canton J, Tallada M, Concha A, Cabrera T, Garrido F, et al. Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:858.

[9] Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Pantuck AJ, Figlin RA, Belldegrun AS. Postoperative surveillance protocol for patients with localized and locally advanced renal cell carcinoma based on a validated prognostic nomogram and risk group stratification system. *J Urol* 2005;174:466, discussion 472, quiz 801.

[10] Rueda B, Zhernakova A, Lopez-Nevot MA, Gomez-Garcia M, Ortega E, Pinero A, et al. CTLA4/CT60 polymorphism is not relevant in susceptibility to autoimmune inflammatory intestinal disorders. *Hum Immunol* 2005;66: 321, 2005.

[11] Solerio E, Tappero G, Iannace L, Matullo G, Ayoubi M, Parziale A, et al. CTLA4 gene polymorphism in Italian patients with colorectal adenoma and cancer. *Dig Liver Dis* 2005;37:170.

[12] Karin M, Greten FR. NF- $\kappa$ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005;5:749.

[13] Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8372.

- [14] Anichini A, Vegetti C, Mortarini R. The paradox of T-cell-mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:855.
- [15] Bernatsky S, Ramsey-Goldman R, Clarke A. Malignancy and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:129.
- [16] Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases—a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun* 2000;1:170.
- [17] Jones G, Wu S, Jang N, Fulcher D, Hogan P, Stewart G. Polymorphisms within the CTLA4 gene are associated with infant atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2006;154:467.
- [18] Maurer M, Loserth S, Kolb-Maurer A, Ponath A, Wiese S, Kruse N, et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1\_49) alters T-cell activation. *Immunogenetics* 2002;54:1.
- [19] Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphism. *Genes Immun* 2001;2:145.
- [20] Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, De Groot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Grave's disease. *J Immunol* 2000;165:6606
- [21] Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295.
- [22] Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;423:506.
- [23] Havranek E, Howell WM, Fussell HM, Whelan JA, Whelan MA, Pandha HS. An interleukin-10 promoter polymorphism may influence tumor development in renal cell carcinoma. *J Urol* 2005;173:709.
- [24] Arnold CN, Goel A, Blum HE, Boland CR. Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer* 2005;104:2035.



## **Polimorfismos en genes de respuesta inflamatoria en cáncer renal metastásico**

Pablo Sáenz López\*, Fernando Vázquez Alonso\*\*, José M. Romero\*, Rafael Carretero\*, Miguel Tallada Buñuel\*\*, Francisco Ruiz Cabello\*, José Manuel Cózar Olmo\*\*

\*Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología. \*\*Servicio de Urología. Hospital Universitario Virgen de las

Nieves, Granada, España

### **Resumen**

La inflamación se ha implicado como un factor etiológico en varios tipos de cánceres humanos. Las variaciones alélicas de los genes implicados en la inflamación son candidatos como determinantes genéticos del riesgo de carcinoma renal. El propósito de los estudios realizados fue investigar si los polimorfismos de genes que llevan a un incremento de los niveles de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas están asociados con un aumento en el riesgo de carcinoma renal. Para ello diseñamos varios estudios caso-control para probar la asociación entre el carcinoma renal y los polimorfismos IL10-1082 A/G (rs 1800896), IL10-592 A/C (rs 1800872), IL10-819 C/T (rs 1800871), IL10-1082 A/G, IL4-590 C/T (rs 2243250), TNF-A -308 A/G (rs 1800629), RANTES -403 G/A (rs 2107538), IL1-A -889 C/T (rs 1800587), MCP-1 2518 G/A (rs 1024611) y CTLA-4/ +49 A/G (rs 231775) y CTLA-4 CT60 A/G (rs 3087243) en 127 pacientes de carcinoma renal, y como control 176 personas sanas.

Los resultados obtenidos de los polimorfismos de la citoquina IL-10-1082 A/G fueron que el estado de heterocigosidad AG presenta el factor de riesgo principal en relación con estadio tumoral localmente avanzado o metastásico en el carcinoma renal. En el caso de la molécula de CTLA4 los resultados obtenidos en carcinoma renal fueron que se encontró una asociación entre los polimorfismos del gen del CTLA-4 y un incremento del riesgo de desarrollar RCC. Se descubrió una alta frecuencia genotípica de los polimorfismos CTLA4/CT60-AA y CTLA4/A49G-AA en pacientes de RCC frente a los controles. Se descubrió una asociación entre el polimorfismo CTLA4/CT60 y el grado tumoral en pacientes de RCC, un análisis logístico de la regresión confirmó los hallazgos, demostrando una alta frecuencia del genotipo AA en pacientes con grado tumoral alto.



La conclusión apoya la hipótesis de que diversos factores genéticos implicados en la regulación de respuestas inmunes adaptativas, la composición de las células estromales y el nivel de producción local de citoquinas, pueden ser cruciales en la modificación de parámetros clinicopatológicos en el carcinoma renal.

## Introducción

La inflamación crónica de larga duración ha sido relacionada con el desarrollo de varios tipos de cáncer. El mecanismo de carcinogénesis involucraría el daño repetitivo y la generación y aparición en los tejidos de especies altamente reactivas del oxígeno y de nitrógeno. Estas moléculas reactivas, como el óxido nítrico y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> serían liberadas por las células inflamatorias y interaccionarían con el ADN del epitelio en proliferación y podrían producir de esta manera alteraciones genéticas. Diversos estudios epidemiológicos han sugerido una fuerte asociación entre la infección crónica, la inflamación y el cáncer<sup>1-6</sup>. Por ejemplo, hay una fuerte asociación entre el abuso de alcohol, con la inflamación del hígado y páncreas, y la exposición y consumo de tabaco con procesos inflamatorios y riesgo de padecer cáncer de pulmón.

Otros ejemplos lo constituyen, la enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer de colon, la infección por *Helicobacter pylori* y el cáncer gástrico, la infección por virus de hepatitis y cáncer hepático, la infección por *Schistosoma* y el cáncer de vejiga, del virus del papiloma con el cáncer cervical y del virus EBV con el cáncer nasofaríngeo y el linfoma de Burkitt. Todas estas asociaciones sugieren que la inflamación crónica puede estar involucrada en el inicio de la transformación neoplásica (el proceso en el que las células son alteradas genéticamente), promoción (el proceso en el que un grupo de células son estimuladas para proliferar) y la progresión (el proceso mediante el cual adquieren un comportamiento más agresivo e invasivo). Existen por tanto, numerosas evidencias que apoyan que si bien la carcinogénesis es un proceso dependiente de la acumulación de cambios genéticos o epigenéticos en las células transformadas (factores intrínsecos), muchas etapas son necesarias para la progresión tumoral; por ejemplo, proliferación, invasión angiogénesis, son influenciadas por factores microambientales (extrínsecos) tales como factores de crecimiento, factores angiogénicos, citoquinas y enzimas proteolíticas<sup>7</sup>.

En adición a los datos epidemiológicos que sostienen una estrecha relación entre inflamación crónica y cáncer<sup>1,2,8</sup>, ciertos polimorfismos genéticos, situados en los promotores de citoquinas de la inmunidad natural, están asociados a incremento del riesgo de desarrollar cáncer.

Mutaciones y/o polimorfismos genéticos en genes cruciales que regulan funciones clave del sistema inmune y la supervivencia de los linfocitos han sido implicados como factores etiológicos en la inflamación crónica<sup>9,10</sup>.

En resumen, en el microambiente tumoral, va a existir un delicado balance entre factores que promueven el desarrollo de la respuesta inflamatoria, favorecedores del desarrollo neoplásico, y factores inhibidores, también producidos por células de la inmunidad innata o específica y por células estromales que tienen efectos contrapuestos, inhibiendo el proceso inflamatorio y favoreciendo el proceso apoptótico. Este balance puede entonces verse notablemente influenciado por factores genéticos (i.e., polimorfismos genéticos), que predisponen al desarrollo de respuestas inflamatorias.

El carcinoma celular renal (RCC) se caracteriza por ser un cáncer muy angiogénico y por haber una alta infiltración linfocitaria y producción de citoquinas<sup>11</sup> y representa un 3-6% de todos los tumores adultos<sup>12</sup>. La inmunoterapia con IFN- $\alpha$  o IL-2 es una manera efectiva para tratar los pacientes metastáticos de cáncer renal. El CCR muestra una buena respuesta a inmunoterapia destinada a bloquear la actividad del CTLA-4<sup>13</sup>, esto nos indica el rol importante del sistema inmune en la regulación del crecimiento tumoral del CCR.

Hemos realizado diferentes estudios de polimorfismo genéticos relacionados con la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en el carcinoma renal. Los genes de las citoquinas y quimioquinas estudiadas han sido la IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\alpha$ , RANTES y el gen CTLA-4 cuyo producto regula la intensidad y duración de las respuestas inmunológicas adaptativas mediadas por los linfocitos T. La elección de estas citoquinas y quimioquinas para los estudios es debido a su implicación en las respuestas de estrés celular, inflamación y persistencia de la respuesta inmunológica.

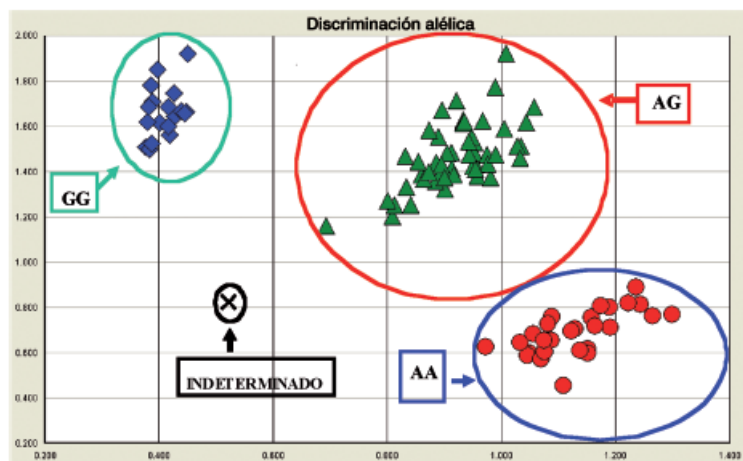
## Material y métodos

El estudio incluía 127 pacientes de RCC, y como control 176 personas sanas. Se extrajo el DNA de la sangre periférica de estos pacientes y controles utilizando el QIAamp DNA Mini kit. y se realizó el genotipado de los polimorfismos de nucleótidos (SNP) por medio de un ensayo alélico discriminatorio utilizando la TaqMan 5'. La PCR y el genotipado de cada muestra fue directamente atribuible mediante la medición de la fluorescencia alélica específica en la 7500 PCR-REAL TIME Sequence Detection Systems utilizando el software SDS 2.2.1 para la discriminación alélica (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los ensayos de amplificación de los SNPs se realizaron según el protocolo siguiente: 10ng de la muestra ADN (1  $\mu$ L) fue mezclado con 4  $\mu$ L de solución de reacción

que contiene: 2,5 µL de 2X TaqMan® Universal PCR Mix (Applied Biosystems), 0,25 µl de una mezcla de dos primers y dos sondas MGB-Taqman (20X) (Applied Biosystems), y 1,25 µL de agua destilada. Las condiciones de la reacción de la PCR fueron: preincubación a 50°C durante 2 min y a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C, 15 s; 60°C, 1 min.

Los polimorfismos de las citoquinas-quimioquinas y moléculas estudiados se encuentran en la región promotora y afectan a los niveles de transcripción. Los polimorfismos estudiados son: IL10-1082 A/G (rs 1800896), IL10-592 A/C (rs 1800872), IL10-819 C/T (rs 1800871), IL10-1082 A/G, IL4-590 C/T (rs 2243250), TNF-A -308 A/G (rs 1800629), RANTES - 403 G/A (rs 2107538), IL1-A -889 C/T (rs 1800587), MCP-1 2518 G/A (rs 1024611) y CTLA-4/ +49 A/G (rs 231775) y CTLA-4 CT60 A/G (rs 3087243).

En la Figura 1 se muestra el resultado de la tipificación del polimorfismo genético de IL-10-1082 mediante la tecnología Taqman en un 7500 PCRREAL TIME Sequence Detection Systems.



**FIGURA 1.** Resultado de la discriminación alélica obtenido en el analizador 7500 PCR-REAL TIME Sequence Detection Systems en muestras para estudio del polimorfismo de IL-10-1082 A/G.

### Análisis Estadístico

Los datos fueron compilados de acuerdo al genotipo y la frecuencia alélica estimada de lo observado en el número de cada alelo específico. La frecuencia alélica de los polimorfismos de un único nucleótido fue testado contra el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la comparación observada y la frecuencia genotípica esperada utilizando el test de la  $\chi^2$ . Las frecuencias genotípicas fueron comparadas en tablas de 2x2 con el test de  $\chi^2$  y la corrección de Yates o con el test exacto de Fisher cuando el valor esperado es  $<5$ . La fuerte asociación fue estimada mediante el cálculo de la odds ratios (ORs) con un

intervalo de confianza (CI) del 95% y un P valor. Los genotipos fueron comparados con una serie de datos clínicos como el estadio o el tamaño del tumor. El análisis de la regresión logística se utilizó para analizar la interacción entre SNPs y para confirmar en las frecuencias de los polimorfismos entre casos y controles. El software SPSS v.15.0 se utilizó para el análisis estadístico.

## Resultados

Parámetros clínicos	Alelo	Frecuencia alélica	Heterocigosidad	Homocigosidad	Positividad alélica
Diámetro tumoral mayor de 7 cm	Alelo A	OR=0,62 p=0,084	OR=2,36 p=0,133	OR=0,54 p=0,328	OR=1,38 p=0,563
	Alelo G	OR=1,61 p=0,084	<b>OR=4,41</b> <b>p=0,001</b>	OR=1,87 p=0,328	<b>OR=3,66</b> <b>p=0,003</b>
Grado nuclear G3-4	Alelo A	OR=1,04 p=0,877	OR=1,16 p=0,809	OR=1,14 p=0,833	OR=1,15 p=0,807
	Alelo G	OR=0,96 p=0,877	OR=1,01 p=0,978	OR=0,87 p=0,833	OR=0,98 p=0,964
Adenopatías (pN+)	Alelo A	OR=0,65 p=0,348	OR=0,56 p=0,074	OR=0,43 p=1,000	OR=0,63 p=0,176
	Alelo G	OR=1,55 p=0,348	<b>OR=1,79</b> <b>p=0,006</b>	OR=2,33 p=1,000	OR=1,59 p=0,015
Trombosis venosa	Alelo A	OR=1,13 p=0,776	OR=0,84 p=0,210	OR=0,69 p=0,547	OR=0,84 p=0,210
	Alelo G	OR=0,88 p=0,776	OR=2,14 p=0,269	OR=1,46 p=0,547	OR=1,62 p=0,489
Metástasis (M1)	Alelo A	OR=1,04 p=0,923	OR=0,80 p=0,756	OR=0,98 p=0,97	OR=0,87 p=0,84
	Alelo G	OR=0,96 p=0,923	OR=0,81 p=0,709	OR=1,02 p=0,98	OR=0,86 p=0,77
Estadio tumoral localmente avanzado o metastásico	Alelo A	OR=0,62 p=0,189	OR=0,78 p=0,097	OR=0,40 p=0,509	OR=0,31 p=0,462
	Alelo G	OR=1,61 p=0,189	<b>OR=14,10</b> <b>p=0,002</b>	OR=2,48 p=0,509	<b>OR=11,04</b> <b>p=0,005</b>
Riesgo UCLA medio o alto	Alelo A	OR=0,60 p=0,097	OR=0,59 p=0,462	OR=3,21 p=0,109	OR=0,47 p=0,4260
	Alelo G	OR=1,67 p=0,097	OR=1,90 p=0,167	OR=0,31 p=0,109	OR=2,10 p=0,098

**Tabla 1.** Riesgo genotípico y significación estadística del polimorfismo IL-10 1082 SNP en parámetros clínicos del carcinoma renal

<sup>1</sup>Calculado mediante comparación de heterocigosidad vs homocigosidad sin el test de alelo

<sup>2</sup>Calculado mediante comparación de homocigosidad con la prueba alélica VS homocigosidad

**Tabla 2.** Análisis estadístico de polimorfismos en RCC VS grupo control

## Material, Métodos y Resultados

Genotipo	RCC Pacientes	(n=127)	Controles (n=176)	OR (95% CI)	P-Valor
IL-10 1082	AA	42 (33,3%)	58 (33,1%)	1,01 (0,62-1,64)	1,02
	AG	62 (49,2%)	87 (49,7%)	1,02 (0,65-1,61)	1,00
	GG	22 (17,5%)	30 (17,1%)	0,98 (0,53-1,79)	1,01
IL-10 819 (592)	CC (CC)	81 (63,8%)	98 (56%)	1,38 (0,87-2,21)	0,21
	CT (AC)	37 (29,1%)	63 (36%)	1,37 (0,84-2,24)	0,26
	TT (AA)	9 (7,1%)	14 (8%)	1,14 (0,48-2,72)	0,94
IL-10 Combinado	ACC/ACC	14 (11,1%)	19 (10,9%)	1,02 (0,49-2,12)	1,00
	ACC/ATA	19 (15,1%)	25 (14,4%)	1,06 (0,56-2,02)	0,99
	ACC/GCC	44 (34,9%)	49 (28,2%)	1,37 (0,84-2,24)	0,26
	ATA/ATA	9 (7,1%)	14 (8%)	0,88 (0,37-2,10)	0,94
	ATA/GCC	18 (14,3%)	37 (21,3%)	0,62 (0,33-1,14)	0,16
	GCC/GCC	22 (17,5%)	30 (17,2%)	1,02 (0,55-1,86)	1,00
IL-4	CC	93 (73,2%)	123 (70,7%)	1,13 (0,68-1,89)	0,72
	CT	30 (23,6%)	47 (27%)	1,20 (0,70-2,03)	0,59
	TT	4 (3,2%)	4 (2,3%)	0,72 (0,18-2,95)	0,73*
CTLA4 /CT60	AA	49 (38,6%)	40 (22,9%)	<b>2,12 (1,28-3,50)</b>	<b>0,005<sup>#</sup></b>
	AG	55 (43,3%)	88 (50,3%)	1,32 (0,84-2,10)	0,28
	GG	23 (18,1%)	47 (26,9%)	1,66 (0,95-2,91)	0,10
CTLA4 /A49G	AA	73 (58,4%)	78 (44,3%)	<b>1,76 (1,11-2,80)</b>	<b>0,022<sup>#</sup></b>
	AG	43 (34,4%)	77 (43,8%)	1,48 (0,92-2,38)	0,13
	GG	9 (7,2%)	21 (11,9%)	1,74 (0,77-3,95)	0,25

Abreviaturas: RCC, cáncer renal; OR, rango de riesgo; CI, intervalo de confianza.

\*Fisher test.

#Diferencias estadísticas significativas entre pacientes con carcinoma renal y controles.

**Tabla 3.** Asociación del estudio de polimorfismos y el grado clínico y estadio en RCC

Genotipo		Bajo (T1-NOM0)	Medio (T3-4NOM0)	Alto (Tx, N+M+)	X <sup>2</sup>	G1	G2	G3	P-Valor
IL-10 1082	AA	31	7	3	No posible de calcular	10	18	12	P=0,74 8
	AG	37	7	17					
	GG	17	3	1					
IL 10-819 (592)	CC (CC)	58	8	14	P= 0,59	18	35	26	P=0,73
	CT (AC)	22	7	6					
	TT (AA)	6	2	1					
IL-4	CC	59	13	18	P= 0,49	24	30	34	P= 0,19
	CT	24	3	3					
	TT	3	1	0					
CTLA4 /CT60	<b>AA</b>	34	5	9	P= 0,85	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>p= 0,022*</b>
	AG	39	8	8					
	GG	13	4	4					
CTLA4 /A49G	AA	50	11	11	P= 0,48	19	27	25	p= 0,54
	AG	33	4	6					
	GG	3	2	2					

\*Diferencias estadísticas significativas con un intervalo de confianza de 95%

## REFERENCIAS

1. Coussens LM, Werb Z Inflammation and cancer. Nature. 2002 Dec 19-108

26;420(6917):860-867.

2. Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2002 Feb;16(2):217-26, 229; discussion 230-232.

3. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*. 2002 Apr;2(4):301-310.

4. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jan;6(1):24-37.

5. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 2005;7(3):211-217.

6. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007;117 (5):1175-1183.

7. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):715-727.

8. Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. Inhibition of NFkappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell*. 2004;6(3):297-305.

9. Troost E, Hold GL, Smith MG, Chow WH, Rabkin CS, McColl KE, et al. The role of interleukin-1beta and other potential genetic markers as indicators of gastric cancer risk. *Can J Gastroenterol*. 2003 Jun;17 Suppl B:8B-12B.

10. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(1):35-53.

11. Cozar JM, Canton J, Tallada M, Concha A, Cabrera T, Garrido F, et al. Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2005 Sep;54(9):858-866.

12. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin*. 1998 Jan-Feb;48(1):6-29.

13. Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, Allison JP. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2006 Apr;18(2):206-13.

14. Lech-Maranda E, Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C, Berger F, Rigal D, et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2004 May 1;103(9):3529-3534..

15. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: A counterpoint. *J Leukoc Biol* 2005;78(5):1043-1051.

16. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*

2003;3(4):276-285.

17. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997,94(7):3195-3199.

18. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005,16(1):35-53.

19. Mulé JJ, Custer M, Averbook B, Yang JC, Weber JS, Goeddel DV et al. RANTES secretion by gene-modified tumor cells results in loss of tumorigenicity in vivo: role of immune cell subpopulations. *Hum Gene Ther* 1996,7(13):1545-1553.

20. Duell EJ, Casella DP, Burk RD, Kelsey KT, Holly EA. Inflammation, genetic polymorphisms in proinflammatory genes TNF- $\alpha$ , RANTES, and CCR5, and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Apr;15 (4):726-731.

21. Liu H, Chao D, Nakayama EE, Taguchi H, Goto M, Xin X et al. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999,96(8):4581- 4585.

22. Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 1994,8(15):1314-1325.

23. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000,404(6776):398- 402.

24. Wang Y, Kato N, Hoshida Y, Yoshida H, Taniguchi H, Goto T et al. Interleukin-1beta gene polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2003,37:65-71.

25. Zienoldiny S, Ryberg D, Maggini V, Skaug V, Canzian F, Haugen A. Polymorphisms of the interleukin-1 beta gene are associated with increased risk of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2004,109(3):353-356.

26. Grimm C, Berger I, Tomovski C, Zeillinger R, Concin N, Leodolter S et al. A polymorphism of the interleukin-1 receptor antagonist plays a prominent role within the interleukin-1 gene cluster in vulvar carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2004,92(3): 936-940.

27. Sehoul J, Mustea A, Koensgen D, Chen FC, Lichtenegger W. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism is associated with increased risk of epithelial ovarian cancer *Ann Oncol* 2003,14(10):1501-1504.

28. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med* 1989,169(4):1449-1459.

29. Roth SJ, Carr MW, Springer TA. C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines

interleukin-8 and interferon-gamma inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1995;25(12):3482-488.

30. Ghilardi G, Biondi ML, La Torre A, Battaglioli L, Scorza R. Breast cancer progression and host polymorphisms in the chemokine system: role of the macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) -2518 G allele. *Clin Chem* 2005;51(2):452-455.

31. Saji H, Koike M, Yamori T, Saji S, Seiki M, Matsushima K et al. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer* 2001;92(5):1085-1091.

32. Rueda B, Zhernakova A, Lopez-Nevot MA, Gomez-Garcia M, Ortega E, Pinero A, et al. CTLA4/CT60 polymorphism is not relevant in susceptibility to autoimmune inflammatory intestinal disorders. *Hum Immunol* 2005;66(3):321-325.

33. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003 May 29;423(6939):506-511.

34. Maurer M, Loserth S, Kolb-Maurer A, Ponath A, Wiese S, Kruse N, et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics* 2002;54(1):1-8.





## DISCUSIÓN

Numerosas evidencias indican que la respuesta inflamatoria, desencadenada en el microambiente tumoral, juega un papel crítico en el inicio, desarrollo, crecimiento y metástasis del cáncer. La infiltración por células inmunes efectoras es un dato bien documentado en CR y prácticamente en todos los tipos de cáncer. Es muy probable que la infiltración ocurra en etapas muy tempranas del cáncer como lo demuestra la intensa infiltración que se observa ya en muchas lesiones benignas y que luego se mantiene más o menos constante en el cáncer, aunque con diferencias notables con respecto al tipo de cáncer y a la fase en el que éste se encuentra.

El microambiente tumoral está sin embargo constituido por un compleja red de células que va a establecer un delicado balance entre factores que promueven el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Los elementos protectores son fundamentalmente linfocitos T citotóxicos. En este sentido, interesantemente se ha podido ver como el tipo y composición del infiltrado inflamatorio intratumoral constituye por sí mismo un factor pronóstico importante en el cáncer. Así en un estudio sobre 959 muestras de cáncer colorectal resectado, la expresión elevada de genes específicos de linfocitos T citotóxicos como CD8 alpha, granzima B o granulisina, así como genes asociados a una respuesta TH1 como T-bet, o IFN gamma, fueron significativamente más altos en pacientes sin signos de invasión comparados a los detectados en pacientes con estadios avanzados de progresión tumoral. También la presencia de células de memoria CD45RO+ CCR7- actúan como un factor independiente de buen pronóstico en cáncer colorectal. Estas poblaciones celulares estarían asociadas a una menor recurrencia tumoral (Galon et al, 2006). Estos estudios iniciales han dado paso a una verdadera clasificación del cáncer basada en criterios inmunológicos "*immune contexture*" (esta clasificación está basada en el estudio de la densidad, tipo y localización del infiltrado inmunitario en el tumor) (Fridman et al., 2012; Galon et al., 2007). Estos estudios han permitido establecer el valor pronóstico que puede ser incluso superior al estadiaje tradicional (UICC-TNM) (Galon et al., 2006; Galon et al., 2007; Pagès et al., 2005). Concretamente, la presencia de marcadores de respuesta Th1 y de células T citotóxicas y células T memoria, se ha asociado fuertemente a un pronóstico favorable en pacientes con CR (Galon et al., 2006, Ascierto et al., 2011; Pagès et al., 2010) y en todos los casos, se ha asociado con un aumento de la supervivencia (Fridman et al., 2012). Varios hallazgos sostienen que las células de CR son reconocidas por el sistema inmune. Las observaciones de regresiones espontáneas y las respuestas completas o parciales observadas tras tratamiento con

citoquinas interleukina-2 (IL-2) o interferon alpha (IFN-gamma) apoyan este hecho (Parton et al, 2006; Lokich et al, 1997; Sanchez-Ortiz et al, 2003). Es reseñable que un alto porcentaje de estos linfocitos expresan marcadores de activación del tipo CD69 y DR, (Shabtai et al, 2002) y evidencias de selección clonal de acuerdo con el uso preferencial de receptores V $\beta$  del TCR que sugieren fuertemente la estimulación de clonotipos tumor-específicos (Jantzer et al, 1998). En consonancia con estos estudios en un estudio previo de nuestro grupo pudimos observar una polarización de la respuesta favorecedora TH1 a no protectora TH2 en el cáncer renal que se correlacionaba con estadios más avanzados del tumor (Cózar et al, 2005).

Con todos estos antecedentes en nuestro trabajo hemos querido abordar dos aspectos esenciales en la interacción sistema inmune-tumor. Por una parte hemos querido conocer las características inmunogénicas del cáncer renal, analizando los cambios en la expresión de antígenos HLA y la expresión de factores solubles (citocinas y quimiocinas) fuertemente implicadas en la reacción inflamatoria que acompaña al cáncer. Por otra parte dados los importantes factores genéticos que regulan el proceso inflamatorio hemos querido en un segundo lugar evaluar la influencia de polimorfismos genéticos que intervienen en la regulación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas en el cáncer renal.

### **Inmunogenicidad del cáncer renal: expresión de antígenos de histocompatibilidad y de citocinas en el microambiente del cáncer renal**

De nuestro estudio previo (Cozar et al, 2005) se evidenciaba que al menos en tumores menos avanzados se pueden dar ciertos efectos protectores mediados por linfocitos TH1. Existen en este sentido, numerosas evidencias de que el sistema inmune puede moldear las características inmunogénicas del tumor. En modelos experimentales se ha comprobado que la deficiencia, en genes clave de la inmunidad, los tumores desarrollados en estos animales tienen un fenotipo inmunogénico claramente distinto de los tumores desarrollados en animales inmunocompetentes en donde con frecuencia la interacción con el sistema inmunitario deja una huella conocida y admitida hoy como “inmunoedición”. Dado que la expresión de moléculas HLA son estrictamente necesarias para que se desencadenen respuestas antitumorales efectivas por linfocitos T

ciototóxicos, quisimos evaluar el nivel de expresión de estas moléculas en las muestras de tejido tumoral de algunos de los pacientes incluidos en este estudio, así como la producción de citocinas en el microambiente tumoral. En este estudio, investigamos cómo se relacionan los cambios en la expresión de HLA-hc, B2m y de varias citoquinas en el tumor con la progresión de la enfermedad en pacientes con CR. Este estudio se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas y mediante RT-PCR cuantitativa para medir la expresión génica. En nuestro estudio, se demuestra un incremento notable tanto a nivel de ARN como a nivel protéico. Estos resultados han sido confirmados por nuestro grupo sobre una muestra más amplia de cánceres y de anticuerpos monoclonales usados (Sáenz-Lopez et al, 2010). De estos dos estudios podemos deducir que la transformación neoplásica conlleva la neoexpresión de moléculas HLA de clase I. La expresión disminuye en tumores más avanzados, al menos a nivel de ARN como demostramos en este estudio. Por tanto en la mayoría de los casos disminuyó significativamente cuando los pacientes desarrollaron metástasis. La inducción de estas moléculas podría interpretarse en el contexto de la transformación celular o secundaria a la presencia y liberación de citocinas en el microambiente tumoral. Nuestros resultados ponen de manifiesto diferencias de transcripción notables al comparar los niveles de mRNA específicos en muestras microdisectadas mediante la PCR cuantitativa. Tanto el aumento de expresión como el descenso de expresión estuvieron asociados a una presencia distinta en los niveles de citocinas proinflamatorias, siendo alguna de ellas potentes inductores de HLA de clase I. En nuestro estudio, la expresión de mRNA de HLA y B2m disminuyó significativamente cuando los pacientes desarrollaron metástasis, y este descenso en la expresión de HLA en el CR metastásico se correlacionó con cambios en el patrón de expresión de citoquinas y quimiocinas. Pudimos ver que los niveles de mRNA de HLAhc y B2m en las muestras tumorales obtenidas de pacientes con CR metastásicos son similares a los medidos en el parénquima renal normal. Esto se correlacionó con la disminución de la expresión génica de citoquinas y quimiocinas en el cáncer renal avanzado. En particular, cabe destacar la ausencia de mRNA de IFN-gamma en el CR metastásico que podría llevar a una disminución de la expresión de HLA clase I y facilitar así la progresión del cáncer.

No obstante, los tumores han desarrollado múltiples estrategias para evitar este tipo de reconocimiento y que consisten en anular o debilitar profundamente la expresión de las moléculas HLA en la célula tumoral (factores intrínsecos). Dentro de éstos, la

alteración de la expresión de genes de la maquinaria de presentación antigénica, particularmente de los antígenos HLA, ha sido documentada en una gran variedad de tumores humanos y es probablemente el mecanismo de escape más extendido (Ruiz-Cabello et al, 1998; Algarra et al, 2001; Ruiz-Cabello et al, 2002). Nuestro grupo ha participado activamente en la identificación de muchos de los mecanismos moleculares que están implicados en las distintos tipos de alteraciones observadas, algunos de los cuales (pérdida de heterocigosidad, LOH, o mutaciones en el gen de la  $\beta$ 2-microglobulina) suponen lesiones genéticas irreversibles con un impacto negativo en inmunoterapia (Jiménez et al, 1999; Méndez et al, 2001; Benitez et al, 1998). Desde pérdidas completas, a la pérdida de uno o varios alelos han sido identificadas y pueden ser interpretadas en el contexto de la inmunoección del cáncer (Dun et al, 2002). En nuestro estudio, tumores con nula expresión de estos antígenos ha sido detectada en el 6% de los casos analizados. En contraste, por ejemplo más del 95% de los carcinomas de cérvix y cerca del 74% de los carcinomas colorrectales muestran algún grado de alteraciones del HLA clase I. Los datos inmunohistoquímicos se han confirmado también en otro estudio de nuestro grupo (Saenz-López et al, 2010).

Para explicar el mecanismo implicado en la falta de expresión de estos antígenos, otros grupos han observado una baja regulación/expresión en componentes de la presentación antigénica (Seliger et al, 1996, Seliger, 2000). En la mayoría de los casos estas alteraciones son con frecuencia reversibles. En algunos cánceres renales se han descrito hasta en un 20% alteraciones en los niveles de expresión de componentes de los proteasomas LMP7 y LMP2, que se han relacionado con una menor supervivencia de los pacientes (Murakami et al, 2005). Sin embargo, el papel que estas moléculas tienen en la generación de variantes celulares con completa ausencia de moléculas HLA no está del todo resuelto. De hecho, la ausencia de estas moléculas se asocia más a defectos estructurales (mutaciones, por ejemplo B2m, pérdida de heterocigosidad, LOH, etc...). Sin embargo, en contraste a lo que ocurre en otros tipos de tumores en CR, las alteraciones estructurales en los genes HLA no parecen constituir la causa principal de escape al sistema inmune (Maleno et al, 2004; Ibrahim et al, 2003). Llama la atención especialmente, la baja frecuencia de LOH en la región 6p donde se localizan los genes del MHC observada en un amplio panel de líneas de tumores renales estudiada por nuestro grupo (Maleno et al, 2004).

No conocemos a día de hoy ni los mecanismos de neoexpresión observados en la

mayoría de los CR, ni los mecanismos de pérdida de expresión. Es posible que en aquellos tumores con ausencia de expresión, quizás no se hayan activado los mecanismos activadores que si operan en la mayoría de los tumores después de la transformación neoplásica. En este caso, la célula transformada conservaría los mecanismos de regulación negativa que presenta el tejido normal.

Con respecto a las diferencias observadas en citocinas y quimiocinas inflamatorias, muchos de los factores favorecedores del desarrollo neoplásico y de los factores inhibidores, son producidos por células de la inmunidad innata o específica y por células estromales. Estas citocinas a veces tienen efectos contrapuestos, inhibiendo el crecimiento tumoral o mostrando efectos antitumorales. A medida que el tumor se desarrolla, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los leucocitos presentes en el infiltrado, induce a las células tumorales y estromales a producir una variedad de mediadores solubles que reprograman funciones como la proliferación y diferenciación celular, la remodelación de la matriz extracelular, la angiogénesis y la migración/reclutamiento de células para beneficiar el crecimiento y supervivencia del cáncer (Whiteside, 2008). El balance entre actividad pro y antitumoral puede entonces verse notablemente influenciado por factores genéticos (polimorfismos genéticos), que controlan el desarrollo de respuestas inflamatorias, por regular producción de citoquinas, quimiocinas, receptores Toll, entre otros. Este estudio nos animó a profundizar en los factores que determinan el reclutamiento de leucocitos al tejido tumoral, y estudiar la producción endógena de citocinas y quimiocinas inflamatorias. Se cree que la progresión del cáncer en el estroma tumoral se dirige hacia la conformación de un espacio privilegiado en el que se suprimen las respuestas antígeno-específicas de los linfocitos T CD8 y se inhibe la proliferación de los TILs autólogos. La respuesta inflamatoria innata parece necesaria, y hasta indispensable, para la activación y polarización de la inmunidad adaptativa, y el tipo de respuesta que se genere puede tener enormes consecuencias en el curso del cáncer. Hemos descrito una mayor expresión de varias quimiocinas ( IP-10, I-TAC, MIP-1-alfa, RANTES, ) y citocinas (TGF-B, VEGF-c, IL-10 y de IFN-gamma) en el tumor que en el tejido renal normal. Lo que sí podemos afirmar es que la expresión elevada de varias citocinas y quimiocinas en el cáncer con respecto al tejido tumoral puede ser un reflejo de la actividad del sistema inmune en un intento de controlar el crecimiento tumoral en las primeras fases. En este sentido cabe destacar que las diferencias más importantes en la expresión se observaron para IP-10 y I-TAC. Resulta

interesante señalar que en un modelo de rata de adenocarcinoma renal, la regresión del tumor se asoció con una expresión elevada de IP-10 en el tejido tumoral. Suyama y cols encontraron que los niveles de expresión de I-TAC, MIG y su receptor CXCR3 eran considerablemente más altos en el CR que en el tejido normal adyacente. Kondo y cols descubrieron que la expresión de IP-10, MIG, MIP-1-B y RANTES estaban incrementados de manera significativa en el tejido renal tumoral comparado con el tejido renal normal. Los autores sugirieron que el efecto antitumoral de IP-10, MIG y MIP-1-B podría resultar del reclutamiento de linfocitos infiltrantes y/o de la inhibición de la angiogénesis en el CR.

IP-10 es una quimiocina inducida por IFN-gamma, que favorece el reclutamiento de células T activadas que expresan el receptor de quimioquina CXCR3 (Th1) y que se sabe que posee una potente actividad antitumoral y antiangiogénica. En un estudio anterior de nuestro grupo, con las mismas muestras con CR incluidas en este estudio demostramos que este tipo de linfocitos predomina en tumores menos avanzados y hay una progresiva disminución de los niveles de infiltración de células CD4+CXCR3+ y CD4+CCR5 que se correlaciona con estadios más avanzados del tumor y que coincidiría con niveles más reducidos de IP-10 descritos en nuestro estudio. Paralelamente se observó una mayor proporción de células T CD4 con el marcador CCR4, sugiriendo que en el CR se produce un cambio progresivo de la polarización TH1/TH2 en tumores más avanzados. Estos cambios en la composición de los TILs pueden suponer una ventaja selectiva para el crecimiento tumoral al desfavorecer respuestas citotóxicas.

De nuestros resultados es destacable que I-TAC y IP-10 sean expresadas en el contexto de respuestas TH1 lo que explicaría que en estas primeras fases la expresión de estos factores favorecería las respuestas protectoras coordinadas por linfocitos Th1. Además de nuestro estudio, el incremento de la expresión de IFN-gamma en el tejido tumoral de CR localizado podría explicar el aumento de B2m, IP-10, y I-TAC. Con esto, se podrían conseguir células T activadas capaces de mediar en la regresión tumoral. Sin embargo, en los CR metastásicos no detectamos mRNA de IFN-gamma. Este hallazgo se ha correlacionado con una baja expresión tumoral de IP-10 y de I-TAC que podrían crear unas condiciones favorables para el crecimiento tumoral. La baja expresión intratumoral de IFN-gamma también se ha publicado en otros tipos de tumor; por ejemplo, se ha encontrado una asociación con un peor pronóstico en el carcinoma de cérvix.

Al comparar la expresión de citoquinas y quimiocinas, encontramos que la



progresión del cáncer y las metástasis se correlacionaron con una disminución de la expresión de IFN-gamma, IP-10, VEGF-c y SDF-1. Según Uwatoko y cols, la expresión de IL-10 está inversamente relacionada con las metástasis a distancia en el CR; los pacientes que expresaban IL-10 mostraron una menor incidencia de metástasis comparados con los que no expresaban IL-10. En nuestro estudio, la expresión génica de IL-10 no se relacionó con las metástasis. Los pacientes con CR localizado y metastásico tenían niveles similares de mRNA IL-10.

En cuanto a la SDF-1, se detectó tanto en el tejido normal como en el tumoral, aunque en unos niveles más bajos en el tejido tumoral. En las lesiones de CR metastásico, sin embargo SDF-1 estaba disminuida. SDF-1 y su receptor de CXCR4 son importantes reguladores del reclutamiento celular desde la circulación sanguínea a los tejidos específicos a través de la migración trans-endotelial. SDF-1 tiene una importante actividad quimiotáctica para los linfocitos. Hay evidencias que sugieren que el sistema receptor ligando SDF-1/CXCR4 pueda estar presente en los nódulos linfáticos metastásicos en el cáncer de pulmón. Otra función que se ha atribuido a SDF-1 es la capacidad de inducir la migración específica de células NK. Se ha demostrado que las células NK expresan CXCR3 y CXCR4, cuyo ligando es SDF-1. Es posible que exista una correlación positiva entre una expresión baja de SDF-1, INF-gamma y IL-10 y la tendencia a cambiar de Th1 a Th2 en el microambiente tumoral en la progresión metastásica del CR. Nuestros resultados de menor expresión de SDF-1 en tumores más avanzados, no es incompatible con lo observado sobre que el eje SDF-1/CXCR4 es un factor importante que influiría en la colonización órgano-específica de células de cáncer renal. CXCR4 puede expresarse también por las células cancerosas al estar regulado negativamente por la proteína VHL. De esta manera la mutaciones en el gen VHL, provocarían una inducción de la expresión de CXCR4 en la membrana de las células tumorales y facilitaría su colonización de órganos productores de CXCL12 (SDF-1) (Pan et al, 2006).

En resumen, nuestros hallazgos añaden evidencias sobre una mayor inmunogenicidad del CR humano en tumores localizados, con altos niveles de expresión de mRNA HLA clase I y de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias. Según nuestros resultados, la progresión del CR cursaría con una disminución de la expresión de HLA clase I, y con niveles reducidos de IFN-gamma y la supresión de IP-10, VEGF y SDF-1. Además, en las lesiones de CR metastásicos predominaría un microambiente más inmunosupresor que podría favorecer el escape a la respuesta inmunitaria.

### **Polimorfismos en genes de regulación de la respuesta inmune en cáncer renal**

Numerosos datos epidemiológicos sostienen una estrecha relación entre inflamación crónica y cáncer (Coussens and Werb 2002; Sharter and Weizman 2002, Luo et al 2004) y tenemos que tener en cuenta que el proceso de inflamación crónica está regulado genéticamente. Así no resulta sorprendente que ciertos polimorfismos genéticos, situados en los promotores de citoquinas de la inmunidad natural, se hayan encontrado asociados al riesgo de desarrollar cáncer. Además como hemos demostrado en este estudio, la progresión del cáncer sucede con cambios en la expresión de citocinas y quimiocinas en el microambiente tumoral. Es probable que el reclutamiento específico celular que se observa en muchos tumores tenga que ver con la liberación de quimioquinas concretas en un microambiente tumoral que puede ser fuertemente pro-inflamatorio. En nuestro estudio, el grupo tumoral mostraba una alta expresión de genes que codifican citoquinas, quimioquinas atrayentes de macrófagos y linfocitos T, moléculas relacionadas con vías de señalización de citoquinas, y proteínas implicadas en la extravasación de leucocitos desde la circulación sanguínea a los tejidos. Por estos motivos, y por el control genético en la producción de estos mediadores solubles de la inmunidad, en la segunda parte de nuestro estudio quisimos estudiar la influencia de factores inmunogenéticos, la influencia que los polimorfismos genéticos implicados en la producción de citoquinas/ quimiocinas en la regulación de la respuestas inmunitarias innatas y adaptativas puedan estar relacionados con riesgo y progresión del cáncer renal. Se incluyeron en nuestro estudio algunos polimorfismos genéticos que se han relacionado con riesgo de otro tipo de neoplasias y en patología autoinmune.

#### *Polimorfismos genéticos de citoquinas y genes de la inmunidad adaptativa*

**IL-10** es una potente citoquina con efectos pleiotrópicos y puede actuar como un agente que promueve el cáncer. La IL-10 se la ha considerado una potente citoquina TH2, con actividad inmunosupresiva y antiinflamatoria, mediante la inhibición de la replicación de linfocitos y monocitos y la secreción de citoquinas inflamatorias (Lech-Maranda et al,

2004). Aunque la principal función de IL10 es inhibir tanto la presentación de antígenos como la producción de citoquinas proinflamatorias y mediadores de macrófagos y células dendríticas, es importante remarcar que además puede actuar como coestimulador de la activación de células B, prolongando la supervivencia de dichas células y coestimulando a las células NK para la producción de citoquinas e incluso actuando como factor de crecimiento para determinadas células T CD8. Todas estas actividades estimuladoras son dosis dependiente.

La expresión de esta citoquina tiene efectos inhibitorios y supresores en la función proinflamatoria de las células presentadoras de antígeno. La IL10 también inhibe la expresión de moléculas de membrana como el HLA de clase II, el CD80, el CD86. En ausencia de la molécula B7 (CD80 o CD86), por ejemplo, no hay proliferación de linfocitos T y no hay producción de citoquinas en respuesta al antígeno.

El gen de la IL10 está localizado en el cromosoma 1, en la posición 1q31-1q32. Un gran número de grupos han estudiado los polimorfismos del gen IL10. Hasta el momento se han registrado en la literatura 49 polimorfismos; de éstos, 46 son polimorfismos de nucleótido único, dos son microsatélites y uno es una pequeña delección. De éstos, veintiocho son polimorfismos de la región promotora y 20 no codifican ni regulan. Se ha detectado asociación de los haplotipos configurados por los alelos en las posiciones -1082, -819 y -592 con los niveles de expresión de IL10, en cuanto el haplotipo -1082A/-819T/-592A está asociado con producción disminuida de IL10, al compararlo con el haplotipo -1082G/-819C/-592C.

No se sabe muy bien el significado de la producción de la IL-10 en el desarrollo tumoral y su microambiente. Se han encontrado descubrimientos opuestos cuando se han medido los niveles de IL-10 en sangre periférica (altos niveles se relacionaba con un peor pronóstico tumoral) o en las muestras tumorales (altos niveles estaba relacionado con supervivencia) (Mocellin et al, 2005).

Los resultados observados de los polimorfismos IL10-1082 A/G, IL10-592 A/C, IL10-819 C/T (estos dos últimos se encuentran en desequilibrio de unión con el IL-10-1082) en carcinoma renal fueron los siguientes: No hemos encontrado asociación en pacientes de CR entre el estudio de polimorfismos y el estado tumoral (TNM) o la edad y el género del paciente. No ha habido diferencias significativas en los polimorfismos de los promotores de la IL-10 entre pacientes de CR y controles. En relación con el diámetro del tumor, un incremento en el genotipo AG se obtuvo en pacientes con tumores mayores de

7 cm; el OR para la heterocigosidad era de 4,41 ( $p=0,001$ ). El análisis estadístico demostró que el alelo G resultó ser un alelo de riesgo ( $OR=3,66$ ,  $p=0,003$ ). No se encontraron diferencias en el grado nuclear, en la aparición de trombo tumoral, aparición de metástasis o riesgo UCLA para el polimorfismo. En el caso de riesgo UCLA, la combinación baja-medio contra alto riesgo se analizó y no se encontró ninguna relación. En los pacientes con carcinoma renal que presentaban afectación ganglionar se vio que todos ellos presentaban heterocigosidad (AG); el análisis estadístico de Fisher reportó significación, con un OR de 1,79 ( $p=0,006$ ). Otro parámetro estudiado fue el estadio tumoral, que relaciona el diámetro tumoral con la afectación ganglionar, dándonos el más alto el genotipo heterocigoto ( $OR=14,10$ ;  $p=0,002$ ). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en el diámetro tumoral. Por lo tanto, el estado de heterocigosidad AG presenta el factor de riesgo principal en relación con el estadio tumoral avanzado. Los resultados del análisis de haplotipos no nos reportó ninguna información adicional en comparación con el análisis independiente del polimorfismo - 1082.

Para concluir el trabajo realizado en CR sobre los polimorfismos de la IL-10 nosotros pensamos que una alta producción de IL-10, puede a la vez producir un efecto inmunosupresor sobre los mecanismos de inmunidad antitumoral, pero también de forma paralela producir un efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral al activarse mecanismos anti-angiogénicos que primarían sobre los primeros. Por el contrario, en un entorno de baja producción de IL-10, se podría facilitar respuestas antitumorales más potentes. Sería por tanto en individuos con un fenotipo intermedio de producción de IL-10 en donde se encontraría la situación más favorable para la progresión tumoral. En este contexto, el estatus de heterocigosidad (la producción intermedia de IL-10) puede producir suficiente efecto inmunosupresivo mediante la inhibición del linfocito T helper 1 (TH1) proinflamatorio y la respuesta citotóxica, y al mismo tiempo no induce un potente efecto antiangiogénico favoreciendo la progresión tumoral en el carcinoma renal celular. Nosotros creemos que la composición de las células estromales y el nivel de producción local pueden ser cruciales para la observación de un tipo u otro de respuesta y explicar así los aparentemente resultados contradictorios, encontrados en distintos tipos de tumores.

**IL-4** es una citoquina producida por las células T de tipo 2 (Th2), basófilos, mastocitos y eosinófilos activados. Actúa como componente antiinflamatorio al bloquear la

síntesis de IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 y la proteína inflamatoria del macrófago. Participa en la regulación del sistema inmunológico en múltiple niveles. Entre otras funciones, promueve la diferenciación de linfocitos Th2, la proliferación y diferenciación de linfocitos B y es un potente inhibidor de la apoptosis. En el estudio realizado sobre el polimorfismo IL4-590 C/T en CR y controles no hemos encontrado resultados significativos en el estado tumoral, la edad ni el género del paciente. Tampoco encontramos diferencias significativas entre pacientes y controles.

**CTLA-4** es una molécula que regula la intensidad y duración de la respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T. CTLA-4 juega un papel importante en la regulación negativa de la proliferación y activación de los linfocitos T. La molécula CTLA-4 interacciona con el ligando B7 en la superficie de las células presentadoras de antígenos, provocando una parada del ciclo celular del linfocito T y una inhibición de la producción de citoquinas y por consiguiente elimina la fase de proliferación de linfocitos T que es fundamental como respuesta antitumoral.

CTLA-4 está codificado por un gen del cromosoma 2q33, es un receptor expresado por linfocitos T activados. El gen CTLA-4 consta de 4 exones y se han identificado más de 100 polimorfismos en la región CTLA-4. Nosotros hemos encontrado una asociación entre los polimorfismos del gen del CTLA-4 y un incremento del riesgo de desarrollar CR. Se descubrió una alta frecuencia genotípica de los polimorfismos CTLA4/CT60-AA y CTLA4/A49G-AA en pacientes de CR frente a los controles (CTLA4/CT60-AA: 38,6% VS 22,9% en controles,  $p=0,005$  y un  $OR=2,12$  con 95% CI: 1,28-3,50; y para CLA4/A49G-AA: 58,4% frente a 44,3% en controles,  $P=0,022$  y  $OR=1,76$  con 95% CI: 1,11-2,80). Un análisis de regresión multivariante no produjo ninguna información adicional, aunque un alto OR se obtuvo para CTLA-4/CT60 ( $OR=2,59$  con 95% CI:1,40-5,3). La distribución alélica en los controles fue similar a los publicados en estudios previos en pacientes españoles (Rueda et al, 2005). Se descubrió una asociación entre el polimorfismo CTLA-4/CT60 y el grado tumoral en pacientes de CR. El análisis logístico de la regresión confirmó los hallazgos, demostrando una alta frecuencia del genotipo AA en pacientes de alto grado. No hemos encontrado asociación en pacientes de CR entre el estudio de polimorfismos y el estado tumoral (TNM) o la edad y el género del paciente.

Como conclusiones al estudio de los polimorfismos de la molécula de CTLA-4 en pacientes de CR, hay que destacar el incremento de la frecuencia genotípica de CTLA-4/CT60-AA y CTLA-4/A49G-AA en CR, que nos indica la asociación del polimorfismo de

CTLA-4 con el incremento del riesgo de desarrollar CR. El polimorfismo CTLA-4/CT60 se cree que controla el procesamiento y la producción de CTLA-4. Se ha encontrado que la varianza alélica CTLA-4/CT60 G está correlacionado con una reducción de los niveles de ARNm de la forma alternativa de pliegue de CTLA-4, la cual inhibe la proliferación in vitro de células T (Ueda et al, 2003). Al encontrarnos una frecuencia mayor de CTLA-4/CT60-AA, la proliferación de los linfocitos T disminuiría facilitando el desarrollo del tumor renal. Lo mismo ocurre con el CTLA-4/ A49G donde en individuos con genotipo +49G se ha visto que se produce un aumento en la proliferación linfocitaria en condiciones de activación subóptimas (Maurer et al, 2002), mientras que en los pacientes de CR hay un incremento de la frecuencia genotípica de CTLA- 4/A49G-AA, con lo que presumiblemente no habría una proliferación linfocitaria en condiciones de activación subóptimas.

#### *Polimorfismos genéticos de citoquinas de la respuesta inmune innata*

**TNF-A** El TNF $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria multifuncional secretada predominantemente por monocitos/macrófagos y células T. El TNF $\alpha$  puede inducir la necrosis celular, la muerte celular programada o apoptosis, y también puede promover el cáncer. De hecho, se cree que TNF puede contribuir a la iniciación tumoral mediante la estimulación de la producción de moléculas genotóxicas, que pueden producir alteraciones en el ADN y mutaciones. Variaciones interindividuales en los niveles de TNF- $\alpha$  se han atribuido a los polimorfismos, notablemente a la posición -380(G/A) en la región promotora del gen TNF- $\alpha$ , y el alelo A se ha asociado con altos niveles de transcripción del TNF-A (Mocellin et al, 2005) y al incremento del riesgo para varios tipos de cáncer (Mulé et al, 1996). En un estudio previo realizado en tejido de carcinoma de próstata comparando el polimorfismo del promotor del TNF- $\alpha$ , se revelaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución del genotipo para el locus -308, con una alta frecuencia del alelo A (AA/AG) en pacientes con controles (OR=1,62; 95% CI:1.077-2.436 p= 0,020). No se encontraron relaciones con parámetros clinicopatológicos y este polimorfismo de promotor de TNF-A. El estudio realizado en carcinoma renal en contraste no reveló asociación con riesgo y progresión en el cáncer renal metastásico.

**IL-1A** es una citoquina proinflamatoria producida por monocitos, macrófagos, y células epiteliales y tiene características biológicas similares al TNF-A, incluyendo la participación en la respuesta a la invasión microbial, inflamación y daño tisular (Dinarello, 1994). El gen IL1A se encuentra en el cromosoma 2q13 e incluye varios polimorfismos, siendo uno de los más estudiados el -889 C/T situado en la región reguladora 5'UTR, asociándose el alelo T con una alta expresión de la citoquina. Los polimorfismos de la IL-1 se han asociado a cáncer gástrico (El-Omar et al, 2000), hepatocelular (Wang et al, 2003), pulmón (Zienolddiny et al, 2004), colon, vulva (Grimm et al, 2004) y ovario (Sehouli et al, 2003). El polimorfismo C/T en la región -889 del promotor de la IL1-A fue estudiado; el alelo T causa una alta expresión de la citoquina. El estudio de este polimorfismo no reveló asociación con riesgo y progresión del cáncer renal y prostático.

#### Polimorfismos genéticos de quimiocinas

Las quimiocinas son un conjunto de citoquinas quimiotácticas producidas por varios tipos celulares (monocitos, macrófagos, linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales). Son potentes quimioatrayentes de los leucocitos y sus funciones proinflamatorias son independientes de la respuesta inmune adaptativa. Dentro de las numerosas quimiocinas nos hemos centrado en algunas que se han descrito asociadas a cáncer.

**RANTES** es una quimiocina CC que normalmente es expresada y secretada por diferentes tipos celulares entre los que se encuentran las plaquetas, células epiteliales y linfocitos T en respuesta a diferentes tipos de señales como endotoxinas, infecciones bacterianas y TNF $\alpha$ , destacando su capacidad de regular el tráfico y activación de una gran variedad de células inflamatorias. Además parece estar íntimamente envuelta en la fase aguda de respuesta a la infección a través del receptor CCR5 cuya expresión a nivel cerebral se encuentra incrementada en esta fase y está relacionado con el proceso de patogénesis de la fiebre. Por otra, parte se cree que juega un papel importante en la inmunidad antitumoral mediante el reclutamiento de células de la inmunidad (células T y monocitos) (Mulé et al, 1996). Polimorfismos en RANTES se han asociado con un alto riesgo de cáncer pancreático apoyado por la hipótesis de que los polimorfismos de genes proinflamatorios en combinación con condiciones proinflamatorias puede influir en el desarrollo del cáncer de páncreas (Duell et al, 2006). Los polimorfismos estudiados A/G se encuentran en la región del promotor -403; el alelo A está asociado a una alta

transcripción del gen (Liu et al, 1999).

En un trabajo previo, realizado en cáncer de próstata, los pacientes mostraron una alta frecuencia del alelo A en el polimorfismo de RANTES -403 G/A frente a controles (OR=1.807; 95% CI: 1.149-2.844 p =0,014). Sin embargo como ocurrió con TNFA, en el cáncer renal no se encontró asociación con parámetros clinicopatológicos (Carretero et al).

**MCP-1** es un miembro de la familia de las CC quimioquinas. Posee actividad quimiotáctica para monocitos y linfocitos T (Yoshimura et al, 1989; Roth et al, 1995), y se cree que juega un rol fundamental en el reclutamiento de macrófagos, expresión de factores angiogénicos y activación de la matriz metaloproteinasa en pacientes de cáncer de mama. Variaciones genéticas dentro de la región reguladora que afecta a la transcripción y producción de la proteína MCP-1 se ha correlacionado con el riesgo de metástasis en el cáncer de mama. En concreto, el alelo G del polimorfismo -2518 A/G, se ha relacionado con un incremento en la producción de MCP-1. A su vez este polimorfismo de la región reguladora que afecta a la transcripción y producción de la proteína MCP-1, se ha relacionado con el riesgo de metástasis en el cáncer de mama (Ghilardi et al, 2005). En nuestro estudio y en otro realizado por nuestro grupo en cáncer prostático no encontramos asociación con riesgo ni los demás parámetros clinico patológicos considerados.

En resumen, en este estudio hemos descrito algunas características del cáncer renal que son diferentes a lo descrito en otras neoplasias. En primer lugar, en referencia a la expresión de antígenos de histocompatibilidad, en este tumor son más bajas la frecuencia de alteraciones HLA. Además, la transformación maligna conlleva un incremento importante en la expresión de moléculas HLA de clase I. Se ha puesto de manifiesto que este incremento obedece a diferencias en el nivel de expresión tanto de ARNm y a nivel de proteico. La progresión tumoral sin embargo parece transcurrir con un descenso en el nivel de expresión de antígenos de histocompatibilidad, lo cual de alguna forma podría contribuir al escape inmunológico. Se ha relacionado estos cambios de expresión, con un aumento de citocinas y quimioquinas producidas en el microambiente tumoral. El nivel de expresión de citocinas estudiadas, particularmente IFN-g, CXCL10(IP-10), CXCL11(I-



## Discusión

TAC), SDF-1 y TGF- $\beta$ , disminuye en tumores más avanzados así como la expresión de antígenos de histocompatibilidad. Finalmente hemos demostrado que variantes genéticas de algunas citocinas pueden influir en el comportamiento clínico del tumor renal: Por una parte, no hemos observado, en los polimorfismos analizados de citocinas y quimiocinas de la respuesta inmune innata, asociación con riesgo de cáncer renal. Sin embargo, los polimorfismos de genes de citocinas y proteínas que regulan la intensidad y duración de las respuestas adaptativas (IL-10 y CTLA-4), se han encontrado asociados a parámetros clinicopatológicos y riesgo en el carcinoma renal de células claras. No obstante serían necesarios estudios adicionales con series más largas que confirmen estos resultados.



## CONCLUSIONES

1. La expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase I experimenta cambios notables en el transcurso de la transformación neoplásica y la progresión del cáncer renal. Los niveles de expresión son significativamente más altos en los tumores en comparación con lo que se observa en tejido renal normal. Además la expresión se reduce en tumores en estadios más avanzados.
2. El nivel de expresión intratumoral de citocinas y quimiocinas proinflamatorias es significativamente más alto en el tejido tumoral con respecto al tejido normal. Estos mediadores condicionarían la infiltración inflamatoria en el tejido renal, induciendo a su vez la expresión de antígenos HLA de clase y podrían reflejar, al menos en las etapas iniciales, un intento del sistema inmunitario de controlar el desarrollo neoplásico. En pacientes con tumores más avanzados la presencia de estas citocinas y quimiocinas desciende significativamente.
3. La expresión de citocinas y quimiocinas pueden explicar el cambio progresivo en patrón de respuesta TH1 (favorable) a TH2 (desfavorable) que habíamos detectado tras analizar la composición del infiltrado inflamatorio en tumores localizados o avanzados.
4. Los niveles de SDF-1(CXCL12) caen significativamente en el tejido tumoral con respecto a los detectados en el tejido normal. Dado que esta citocina es el ligando del receptor CXCR4, que se ha descrito en el células metastásicas de cáncer renal, su caída, observada en el estroma tumoral renal, podría favorecer el desarrollo metastásico.
5. Polimorfismos genéticos que influyen en una mayor expresión de CTLA-4 en la superficie de las células T, o de la forma soluble de este receptor, se encuentran asociados a riesgo de cáncer renal. CTLA-4 juega un papel central en la regulación de la activación de las respuestas adaptativas, inhibiendo el programa de activación de los linfocitos T desde las etapas iniciales. Por tanto, nuestros resultados sugieren que una menor activación de respuestas celulares T podrían favorecer el desarrollo

## Conclusiones

neoplásico.

6. No se ha encontrado asociación con riesgo de cáncer renal en los polimorfismos estudiados de las citocinas: IL10, IL4, TNF-A, IL1-A, y en las quimiocinas: RANTES y MCP-1. Por el contrario, sí se ha observado que individuos heterocigotos para el polimorfismo -1082 de IL10(A/G), presentan tumores de mayor tamaño, afectación ganglionar y estadios tumorales más avanzados. Estos resultados pueden explicarse por la acción pleiotrópica de IL-10 sobre el crecimiento tumoral presentando a la vez un efecto antiangiogénico (antitumoral) e inmunosupresor (protumoral).



## BIBLIOGRAFÍA

Abe A, Sato K, Habuchi T, et al. Single nucleotide polymorphisms in the 30 untranslated region of vascular endothelial growth factor gene in Japanese population with or without renal cell carcinoma. *Tohoku J Exp Med* 2002;198:181.

Albertsson PA, Basse PH, Hokland M et al. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol* 2003; 24: 603–9.

Albiges L, Salem M, Rini B, et al. Vascular endothelial growth factor-targeted therapies in advanced renal cell carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011;25:813.

Anglard P, Brauch H, Weiss GH, et al. Molecular analysis of genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1991;51:1071-1077.

Anichini A, Vegetti C, Mortarini R. The paradox of T-cell-mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:855. Bernatsky S, Ramsey-Goldman R, Clarke A. Malignancy and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:129.

Aron M, Nguyen MM, Stein RJ, Gill IS. Impact of gender in renal cell carcinoma: an analysis of the SEER database. *Eur Urol*. 2008; 54(1): 133-40.

Atkins D, Ferrone S, Schmahl GE et al. Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol* 2004; 171: 885–9.

Atzpodien J, Royston P, Wandert T et al. Metastatic renal carcinoma comprehensive prognostic system. *Br J Cancer*. 2003; 88(3):348-53.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 2005,7(3):211-217.

Benitez, R. et al. Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens*. 1998, 52:520-9.

Bensalah K, Leray E, Fergolot P, et al. Prognostic value of thrombocytosis in renal cell carcinoma. *J Urol* 2006; 175: 859-863.

Berse B, Brown LF, Van De Water L, et al. Vascular permeability factor (vascular



## Bibliografia

endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992;3:211.

Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM et al. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996; 184: 1101–9.

Brogan IJ, Khan N, Isaac K, et al. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol* 1999;60:1245.

Bruyère F, Hovens CM, Marson MN, et al. VEGF polymorphisms are associated with an increasing risk of developing renal cell carcinoma. *J Urol* 2010;184:1273.

Bui MH, Seligson D, Han K, et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 802–811.

Bukowski RM: Cytokine combinations: therapeutic use in patients with advanced renal cell carcinoma. *Semin. Oncol.*, 27 (2): 204-12, 2000.

Cabrera T, Fernandez MA, Sierra A et al. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol* 1996; 50: 127–34.

Cabrera T, Lopez-Nevot MA, Gaforio JJ et al. Analysis of HLA expression in human tumor tissues. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 1–9.

Calvo E, Ravaud A, Bellmunt J. What is the optimal therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma who progress on an initial VEGFr-TKI?. *Cancer Treat Rev* 2012 Jul 23.

Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 336–41.

Charron D, ed. HLA, Genetic diversity of HLA. Functional and Medical Implications, Vol 1. Sevres: EDK, 1997, 445–56.

Cho E, Adami HO, Lindblad P: Epidemiology of renal cell cancer. *Hematol. Oncol. Clin N Am*, 2001; 25:651-665.

Coussens LM, Werb Z Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-

867.

Cozar JM, Canton J, Tallada M, Concha A, Cabrera T, Garrido F, et al. Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:858.

Cozar JM, Miñana B. Estudio epidemiológico de estimación de la incidencia de tumores renales en España (2011). LXXVII Congreso Nacional de Urología, 2012.

Cromme FV, Airey J, Heemels MT et al. Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* 1994; 179: 335–40.

Dall'Oglio MF et al. Microvascular tumor invasion, tumor size and Fuhrman grade: a pathological triad for prognostic evaluation of renal cell carcinoma. *J Urol* 2007; 178: 525-428.

Dassoulas K, Gazouli M, Rizos S, et al. Common polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and colorectal cancer development, prognosis, and survival. *Mol Carcinog* 2009;48:563.

De Grujil TD, Bontkes HJ, van den Muysenberg AJ et al. Differences in cytokine mRNA profiles between premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Eur J Cancer* 1999; 35: 490–7.

De Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jan;6(1):24-37.

Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 1994,8(15):1314-1325.

Ding C, Cantor CR. Direct molecular haplotyping of long-range genomic DNA with M1-PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7449.

Duell EJ, Casella DP, Burk RD, Kelsey KT, Holly EA. Inflammation, genetic polymorphisms in proinflammatory genes TNF- $\alpha$ , RANTES, and CCR5, and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Apr;15 (4):726-731.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to

tumor escape. *Nat Immun* 2002; 3: 991–8.

El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000;404(6776):398- 402.

Enquist E, Walther MM, Linehan WM. Molecular genetics of renal cell carcinoma. En: *Renal, bladder and prostate cancer update*. Edt.: KH Kurth, GH Mickisch, FH Schröder. The Bath Press, London, 1999:5-14.

EUCAN 2008. *Kidney Cancer*, Lyon, Francia, International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponible en: <http://eu-cancer.iarc.fr/EUCAN>

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669.

Frank I, Blute ML, Cheville JC, et al. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *J Urol* 2002; 168:2395–2400.

Frank I, Blute ML, Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM, Zincke H. Independent validation of the 2002 American Joint Committee on cancer primary tumor classification for renal cell carcinoma using a large, single institution cohort. *J Urol* 2005; 173: 1889–92.

Galligioni E, Ferro A. Angiogenesis and antiangiogenic agents in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;34:3. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960-4.

García-Closas M, Malats N, Real FX, et al. Large-scale evaluation of candidate genes identifies associations between VEGF polymorphisms and bladder cancer risk. *PLoS Genet* 2007;3:29.

Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997: 18: 89–95.

Ghilardi G, Biondi ML, La Torre A, Battaglioli L, Scorza R. Breast cancer progression and host polymorphisms in the chemokine system: role of the macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) -2518 G allele. *Clin Chem* 2005;51(2):452-455.

GLOBOCAN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base n° 10, Lyon, Francia: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>

Gnarra J, Tory K, Weng Y, et al. Mutations of the VHL tumor suppressor gene in renal carcinoma. *Nature Genet* 1994;7:85-90.

Grimm C, Berger I, Tomovski C, Zeillinger R, Concin N, Leodolter S et al. A polymorphism of the interleukin-1 receptor antagonist plays a prominent role within the interleukin-1 gene cluster in vulvar carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2004;92(3): 936-940.

Hanna J, Wald O, Goldman-Wohl D et al. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD162 human natural killer cells. *Blood* 2003; 102: 1569–77.

Hew MN, Zonneveld R, Kummerlin PED et al.: Age and Gender related differences in renal cell carcinoma in a European cohort. *J Urol*, 2012; 188: 33-38.

Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3(4):276-285.

Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 577–83.

Jacobsen J, Rasmuson T, Grankvist K, et al. Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol* 2000;163:343.

Jakubowska A, Gronwald J, Menklszak J, et al. The VEGF\_936\_C > T 3' UTR polymorphism reduces BRCA1-associated breast cancer risk in Polish women. *Cancer Lett* 2008;262:71.

Jin Q, Hemminki K, Enquist K, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. *Clin Cancer Res* 2005;11:3647.

Johrer K, Zelle-Rieser C, Perathoner A et al. Up-regulation of functional chemokine

## Bibliografia

receptor CCR3 in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2459–65.

Jones G, Wu S, Jang N, Fulcher D, Hogan P, Stewart G. Polymorphisms within the CTLA4 gene are associated with infant atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2006;154:467.

Karakiewicz PI, Trinh Q, Bhojani N et al. Renal Cell Carcinoma with Nodal Metastases in the Absence of Distant Metastatic Disease: Prognostic Indicators of Disease-Specific Survival. *Eur Urol* 2007; 51: 1616–1624.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*. 2002 Apr;2(4):301-310.

Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005;5:749.

Kattan MW, Reuter V, Motzer RJ et al. A prospective prognostic nomogram for renal cell carcinoma. *J Urol* 2001; 166: 63-67.

Kawai Y, Sakano S, Korenaga Y, et al. Associations of single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene with the characteristics and prognosis of renal cell carcinomas. *Eur Urol* 2007;52:1147.

Kaye FJ. Closing in on another renal cancer suppressor locus near chromosome 3p14. *J Natl Cancer Inst* 1999;15;91(18):1528-1529.

Keller ET, Zhang J, Cooper CR, Smith PC et al. Prostate carcinoma skeletal metastases: cross talk between tumor and bone. *Cancer Metastasis Rev* 2001; 20: 333–49.

Klatte T, Chung J, Leppert JT et al. Prognostic relevance of capsular involvement and collecting system invasion in stage I and II renal cell carcinoma. *BJU Int* 2007; 99: 821-824.

Knight DA, Stadler WM. Prognostic factors in localized renal cell cancer. *BJU Int* 2007; 99: 1212-1218.

Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985;45:1437.

Kondo T, Ito F, Nakazawa H et al. High expression of chemokine gene as a favorable prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol* 2004; 171: 2171–5.

Koopman LA, Mulder A, Corver WE et al. HLA class I phenotype and genotype alterations

in cervical carcinomas and derivative cell lines. *Tissue Antigens* 1998; 51: 623–36.

Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y et al. Expression of tissue cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3530–5.

Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, De Groot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Grave's disease. *J Immunol* 2000;165:6606.

Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases—a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun* 2000;1:170.

Lam JS, Shavarts O, Said JW et al. Clinicopathologic and molecular correlations of necrosis in the primary tumor of the primary tumor patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 2517-2525.

Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Pantuck AJ, Figlin RA, Belldegrun AS. Postoperative surveillance protocol for patients with localized and locally advanced renal cell carcinoma based on a validated prognostic nomogram and risk group stratification system. *J Urol* 2005;174:466, discussion 472, quiz 801.

Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Pantuck AJ, Figlin RA, Belldegrun AS. Postoperative surveillance protocol for patients with localized and locally advanced renal cell carcinoma based on a validated prognostic nomogram and risk group stratification system. *J Urol* 2005;174:466–72.

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin*. 1998 Jan-Feb;48(1):6-29.

Langsenlehner T, Langsenlehner U, Renner W, et al. Single nucleotide

Lech-Maranda E, Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C, Berger F, Rigal D, et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2004 May 1;103(9):3529-3534.

Lee JS, Kim HS, Jung JJ, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma and the relation to angiogenesis and p53 protein expression. *J Surg Oncol*

## Bibliografia

2001;77:55.

Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphism. *Genes Immun* 2001;2:145.

Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007;117 (5):1175-1183.

Linehan WM, Lerman MI, Zbar B. Identification of the von Hippel-Lindau (VHL) gene: Its role in renal cancer. *JAMA* 1995;273:564-570.

Liotta LA. An attractive force in metastasis. *Nature* 2001: 410: 24–25.

Liu H, Chao D, Nakayama EE, Taguchi H, Goto M, Xin X et al. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999,96(8):4581- 4585.

Ljungberg B, Campbell SC, Cho HY, et al.: The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur. Urol.*, 2011; 60: 615-621.

Ljungberg B, Cowan N, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders P, Patard JJ, Sinescu IC: Guidelines on renal cell carcinoma. EAU, 2010.

Ljungberg B. Prognostic markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* 2007. 17: 303-308.

Ljungberg BJ, Jacobsen J, Rudolfsson SH et al. Different vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-receptor 1 and 2 mRNA expression profiles between clear cell and papillary renal cell carcinoma. *BJU Int* 2006; 98: 661-667.

Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998: 391: 344–5.

Lohse CM, Cheville JC. A review of prognostic pathologic features and algorithms for patients treated surgically for renal cell carcinoma. *Clin Lab Med* 2005;25:433–64.

Lubensky IA, Gnarra JR, Bertheau P, et al. Allelic deletions of the VHL gene detected in multiple microscopic clear cell renal lesions in von Hippel-Lindau disease patients. *Am J Pathol* 1996;149(6):2089-2094.

Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. Inhibition of NF- kappaB in cancer cells

converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell*. 2004;6(3):297-305.

Madbouly K et al. Microvascular tumor invasion: prognostic significance in low-stage renal cell carcinoma. *Urology* 2007; 69: 670-674.

Maker AV, Attia P, Rosenberg SA. Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol* 2005;175:7746.

Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T et al. Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 2004: 56: 244–53.

Maleno I, Lopez Nevot MA, Seliger B, Garrido F. Low frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21 in clear renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 2004: 109: 636–8.

Manzotti CN, Tipping H, Perry LC, Mead KI, Blair PJ, Zheng Y, et al. Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2004;32:2888.

Martignoni G, Brunelli M, Gobbo S, et al. Role of molecular markers in diagnosis and prognosis of renal cell carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2007; 29: 41–49.

Maurer M, Loserth S, Kolb-Maurer A, Ponath A, Wiese S, Kruse N, et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics* 2002;54(1):1-8.

Mejean A, Oudard S, Thiounn N. Prognostic factors of renal cell carcinoma. *J Urol* 2003; 169: 821-827.

Mendez R, Serrano A, Jager E, Maleno I, Ruiz-Cabello F, Knuth A, Garrido F. Analysis of HLA class I expression in different metastases from two melanoma patients undergoing peptide immunotherapy. *Tissue Antigens*. 2001;57:508-19.

Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: A counterpoint. *J Leukoc Biol* 2005;78(5):1043-1051.



## Bibliografía

Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(1):35-53.

Moinzadeh A, Libertino JA. Prognostic significance of tumor thrombus level in patients with renal cell carcinoma and venous tumor thrombus extension. Is all T3b the same?. *J Urol* 2004; 171(2):598-601.

Motzer RJ, Bacik J, Schwartz LH et al. Prognostic factors for survival in previously treated patient with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 454-463.

Mulé JJ, Custer M, Averbook B, Yang JC, Weber JS, Goeddel DV et al. RANTES secretion by gene-modified tumor cells results in loss of tumorigenicity in vivo: role of immune cell subpopulations. *Hum Gene Ther* 1996,7(13):1545-1553.

Muller A, Homey B, Soto H et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50–56.

Murakami Y, Kanda K, Yokota K, Kanayama H, Kagawa S. Prognostic significance of immuno-proteosome subunit expression in patients with renal-cell carcinoma: a preliminary study. *Mol Urol* 2001, 5:113–9

Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med* 2001; 345: 833–5.

Na X, Wu G, Ryan CK, et al. Overproduction of vascular endothelial growth factor related to von Hippel–Lindau tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in renal cell carcinomas. *J Urol* 2003;170:588.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9.

O'Keefe SC, Marshall FF, Issa MM, et al. Thrombocytosis is associated with a significant increase in the cancer specific death rate after radical nephrectomy. *J Urol* 2002; 168:1378–1380.

Ortiz M, Vicente FJ, Rosales JL et al. Valoración de factores pronósticos de la supervivencia en una serie de 202 pacientes intervenidos por carcinoma de células renales. *Actas Urol Esp* 2005; 29 (2): 179-189.

Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky

A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005 Dec 22;353(25):2654-66.

Pan et al. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer* 2006;(5):56.

Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrum AS. The changing natural history of renal cell carcinoma. *J Urol* 2001; 166: 1611-1623.

Pantuck AJ, Zisman A, Dorey F et al. Renal cell carcinoma with retroperitoneal lymph nodes. Impact on survival and benefits of immunotherapy. *Cancer* 2003; 97: 2995-3002.

Paradis V, Lagha NB, Zeimoura L, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 2000;436:351.

Park WH, Eisen T. Prognostic factors in renal cell cancer. *BJU Int* 2007; 99: 1277-1281.

Parton M, Gore M, Eisen T. Role of cytokine therapy in 2006 and beyond for metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(35):5584–92.

Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N et al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2763-2771.

Patard JJ, Shavarts O, Lam JS et al. Safety and efficacy of partial nephrectomy for all T1 tumors based on an international multicenter experience. *J Urol* 2004; 171: 2181-2185.

Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, Allison JP. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2006 Apr;18(2):206-13.

Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8372.

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295.

Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, et al. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor

## Bibliografía

plasma levels. *J Vasc Res* 2000;37:443.

Rioux-Leclercq N, Leray E, Fergelot P, et al. The Fuhrman grade: a European multicenter study for the determination of the optimal grading system in term of prognosis. *Eur Urol suppl* 2006; 5: 67-70.

Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 1969; 101:297.

Rodríguez-Rodríguez L, García-Bermúdez M, González-Juanatey C, et al. Vascular endothelial growth factor A and cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antigens* 2011;77:291.

Roth SJ, Carr MW, Springer TA. C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon-gamma inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1995,25(12):3482-488.

Rueda B, Zhernakova A, Lopez-Nevot MA, Gomez-Garcia M, Ortega E, Pinero A, et al. CTLA4/CT60 polymorphism is not relevant in susceptibility to autoimmune inflammatory intestinal disorders. *Hum Immunol* 2005;66(3):321-325.

Ruiz-Cabello F et al: . Impaired surface antigen presentation in tumors: Implications for T cell based immunotherapy. *Sem Cancer Biol* 2002;12: 15-24.

Ruiz-Cabello F, et al. HLA and cancer: from research to clinical impact. *Immunol Today* 1998; 19: 539-541.

Saio M, Teicher M, Campbell G et al. Immunocytochemical demonstration of down regulation of HLA class-I molecule expression in human metastatic breast carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21: 243–9.

Saji H, Koike M, Yamori T, Saji S, Seiki M, Matsushima K et al. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer* 2001,92(5):1085-1091.

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187: 875–83.

Sanchez-Ortiz RF, Tannir N, Ahrar K, Wood CG. Spontaneous regression of pulmonary

metastases from renal cell carcinoma after radio frequency ablation of primary tumor: an in situ tumor vaccine? *J Urol* 2003;170(1):178–9.

Schleypen JS, Von Geldern M, Weiss EH et al. Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. *Int J Cancer* 2003; 106: 905–12.

Sehgal A, Keener C, Boynton AL et al. CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J Surg Oncol* 1998; 69: 99–104.

Sehouli J, Mustea A, Koensgen D, Chen FC, Lichtenegger W. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism is associated with increased risk of epithelial ovarian cancer *Ann Oncol* 2003,14(10):1501-1504.

Seliger B, Atkins D, Bock M et al. Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1721–7.

Seliger B, Hohne A, Knuth A et al. Analysis of the major histocompatibility complex class I antigen presentation machinery in normal and malignant renal cells: evidence for deficiencies associated with transformation and progression. *Cancer Res* 1996; 56: 1756–60.

Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 2000;21(9):455–64.

Seliger, B., Hohne, A., Knuth, A., Bernhard, H., Ehring, B., Tampe, R., and Huber, C. (1996). Reduced membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression. *Clin. Cancer Res.* 2(8), 1427–143.

Shabtai M, Ye H, Frischer Z, Martin J, Waltzer WC, Malinowski K. Increased expression of activation markers in renal cell carcinoma infiltrating lymphocytes. *J Urol* 2002;168(5):2216–9.

Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2002 Feb;16(2):217-26, 229; discussion 230-232.

## Bibliografia

Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Wang HJ, Kim YJ, et al. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet* 2004;13:397. Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)* 2002;16: 217, 229, discussion 230–232. Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, Allison JP. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2006;18:206.

Slaton JW, Inoue K, Perrotte P et al. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 158: 735–43.

Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev* 2004; 202: 275–93.

Solerio E, Tappero G, Iannace L, Matullo G, Ayoubi M, Parziale A, et al. CTLA4 gene polymorphism in Italian patients with colorectal adenoma and cancer. *Dig Liver Dis* 2005;37:170.

Suyama T, Furuya M, Nishiyama M et al. Up-regulation of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokines IFN-inducible T-cell alpha chemoattractant and

Tannenbaum CS, Tubbs R, Armstrong D et al. The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. *J Immunol* 1998; 161: 927–32.

Tartour E, Gey A, Sastre-arau X, Lombard Surin I, Mosseri V, Fridman WH. Prognostic value of intratumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 287–94.

Thio CL, Mosbrugger TL, Kaslow RA, Karp CL, Strathdee SA, Vlahov D, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and recovery from hepatitis B virus infection. *J Virol* 2004; 78:11258.

Troost E, Hold GL, Smith MG, Chow WH, Rabkin CS, McColl KE, et al. The role of interleukin-1beta and other potential genetic markers as indicators of gastric cancer risk. *Can J Gastroenterol*. 2003 Jun;17 Suppl B:8B-12B.

Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, et al. Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a

multivariate analysis of 643 patients using revised 1997 TNM staging criteria. *J Urol* 2000; 163:1090–1095.

Uchida D, Begum NM, Almofti A et al. Possible role of tissue-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res* 2003; 290: 289–302.

Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003 May 29;423(6939):506-511.

Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;423:506.

Uwatoko N, Tokunaga T, Hatanaka H et al. Expression of interleukin-10 is inversely correlated with distant metastasis of renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 20: 729–33.

Vázquez Alonso F, Puche Sanz I, Flores Martín JF, et al. Papel de las terapias diana en el tratamiento de las masas renales pequeñas. *Arch Esp Urol* 2013;66(1):186-191.

Vázquez Alonso F, Vicente Prados FJ, Cózar Olmo JM, et al. Carcinoma de células renales con extensión a vena cava: puesta al día y revisión de nuestra casuística. *Act Urol Esp* 2009;33(5):569-574.

Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 143–54.

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493.

Waalkes S, Eggers H, Rustermeier J et al: Übergewicht ist ein günstiger prognosefaktor für patienten mit nierenzllkarzinom. *Urologe*, 2001; 50: 1118-1124.

Wang Y, Kato N, Hoshida Y, Yoshida H, Taniguchi H, Goto T et al. Interleukin-1beta gene polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2003;37:65-71.

Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, et al. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein

## Bibliografia

production. *Cytokine* 2000;12:1232.

Whiteside TL. Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48: 346-352.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997,94(7):3195-3199.

Yildiz E, Gokce G, Kilicarslan H et al. Prognostic value of the expression of Ki-67, CD44 and vascular endothelial growth factor, and microvessel invasion, in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2004; 93: 1087-1093.

Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med* 1989,169(4):1449-1459.

Zbar B, Brauch H, Talmadge C, Linehan M. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal-cell carcinoma. *Nature* 1987;327:721-724.

Zhao ZZ, Nyholt DR, Thomas S, et al. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of familial endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2008;14:531.

Zienolddiny S, Ryberg D, Maggini V, Skaug V, Canzian F, Haugen A. Polymorphisms of the interleukin-1 beta gene are associated with increased risk of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2004,109(3):353-356.

Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F et al. Improved prognostic of renal cell carcinoma using and integrated staging system. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1649-1657.

Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F et al. Mathematical Model to Predict Individual Survival for Patients With Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 2002; 20 (5): 1368-1374.

Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):715-727.

Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 263–74.

