



Universidad de Granada

Programa Oficial de Posgrado en Inmunología

**Estudio de HLA y factores inmunogenéticos
asociados a la inflamación en Carcinoma Renal**

PABLO SÁENZ-LÓPEZ LARROCHA

GRANADA, 2013

Director de la Tesis:

Francisco Ruíz-Cabello Osuna
Maria Teresa Cabrera Castillo
José Manuel Cózar Olmo

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Pablo Sáenz López Larrocha
D.L.: GR 500-2014
ISBN: 978-84-9028-806-1

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular III e Inmunología.



Universidad de Granada

Programa Oficial de Posgrado en Inmunología (P42.56.1)

Norma Reguladora RD 56/2005

**Estudio de HLA y factores inmunogenéticos
asociados a la inflamación en Carcinoma Renal**

PABLO SÁENZ-LÓPEZ LARROCHA

GRANADA, 2013

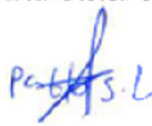
El doctorando Pablo Sáenz-López Larrocha y los directores de la tesis Francisco Ruíz-Cabello Osuna, Maria Teresa Cabrera Castillo, y José Manuel Cózar Olmo, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis 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, a 25 de junio de 2013


Fdo: Director de la Tesis
Francisco Ruíz-Cabello Osuna


Fdo: Director de la Tesis
Maria Teresa Cabrera Castillo


Fdo: Director de la Tesis
José Manuel Cózar Olmo


Fdo: Doctorando
Pablo Sáenz-López Larrocha

Esta investigación ha sido posible gracias al Fondo de Investigaciones Sanitarias(08/0528 and PI11/01386),, Red Genómica del Cáncer (RETICRD 06/020), Consejería de Salud Junta de Andalucía(PI-0080- 2010), Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (P08-TIC-4299), Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional I+D+i (TIN2009-13489, SAF 2007-63262), Proyecto de Investigación de Excelencia (CTS-3952, CVI-4740 y P06/-CTS- 02200), Proyecto de Excelencia de Consejería de Innovación (CTS 695), Plan Andaluz de Investigación (Group CTS 143), y por el European Searchable Tumor Cell Line Database (ESTDAB) Project contract No. QLRI-CT-2001-01325.

El trabajo de esta tesis doctoral ha sido dado a conocer mediante la exposición de varias comunicaciones en congresos nacionales e internacionales, y la publicación de cuatro artículos científicos en las revistas Human Immunology y Tissue Antigens.

1. Publicaciones en Human Immunology y Tissue Antigens.

- Sáenz-López P, Gouttefangeas C, Hennenlotter J, Concha A, Maleno I, Ruiz-Cabello F, Cózar JM, Tallada M, Stenzl A, Rammensee HG, Garrido F, Cabrera T. **Higher HLA class I expression in renal cell carcinoma than in autologous normal tissue.** Tissue Antigens. 2010 Feb;75(2):110-8. doi: 10.1111/j.1399-0039.2009.01409.x. Epub 2009 Nov 13. PubMed PMID: 19912575
- Romero JM, Sáenz-López P, Cózar JM, Carretero R, Canton J, Vazquez F, Concha A, Tallada M, Garrido F, Ruiz-Cabello F. **A polymorphism in the interleukin-10 promoter affects the course of disease in patients with clear-cell renal carcinoma.** Hum Immunol. 2009 Jan;70(1):60-4. doi: 10.1016/j.humimm.2008.10.020. Epub 2008 Nov 21. PubMed PMID: 19027043.
- Sáenz-López P, Carretero R, Vazquez F, Martin J, Sánchez E, Tallada M, Garrido F, Cózar JM, Ruiz-Cabello F. **Impact of interleukin-18 polymorphisms-607 and -137 on clinical characteristics of renal cell carcinoma patients.** Hum Immunol. 2010 Mar;71(3):309-13. doi: 10.1016/j.humimm.2009.11.010. Epub 2010 Jan 12. PubMed PMID: 19961892.
- Sáenz-López P, Vazquez F, Cozar JM, Carretero R, Garrido F, Ruiz-Cabello F. **VEGF polymorphisms are not associated with an increased risk of developing renal cell carcinoma in Spanish population.** Hum Immunol. 2013 Jan;74(1):98-103. doi:10.1016/j.humimm.2012.10.014. Epub 2012 Oct 13. PubMed PMID: 23073296.

2. Comunicaciones orales en congresos internacionales

- Saenz-lopez P, Gouttefangeas C, Rodriguez A, Cozar JM, Tallada M, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Rammensee H, Garrido F. **HLA class I expression un renal cell carcinoma is higher than in normal renal tissue.** 15 IHIW and Conference Rio de janeiro, Brazil volume 72 number 3 september 2008

- Fernando Vázquez Alonso, Pablo Sáenz-López, Ignacio Puche Sanz, Raquel Berrío Campos, Rafael Carretero Coca, Francisco Javier Vicente Prados, Federico Garrido Torres-Puchol, Francisco Ruiz-Cabello Osuna, José Manuel Cózar Olmo. **Polimorfismos de VEGF como factor de riesgo y pronóstico del cáncer renal.** Congreso CAU Colombia 2012. Septiembre 4-9 2012.

3. comunicaciones orales en congresos nacionales

- Saenz-lopez P, Vazquez F, Rodríguez AI, Jiménez P, Cozar JM, Tallada M, **El cancer renal se asocia a un incremento en la expresión de moléculas HLA de clase I.** . XXXIV Congreso de la sociedad Española de Inmunología. Palma de Mallorca, Spain, 21-24 May, 2008.
- Vázquez F, Cózar JM, Romero JM, Sáenz-López P, Carretero R, Romero JM, Pascual M, Funes C, Segura M, Fernández AJ, Rodríguez F, Martínez A, Vicente FJ, Espejo E, Ruiz-Cabello F, Tallada M. **Relación del polimorfismo de IL-10 con los parámetros clínicos del carcinoma renal.** LXXIII Congreso Nacional de Urología. Barcelona, 1-16 junio de 2008.

Otras Publicaciones

- Ulzurrun E, Stephens C, Crespo E, Ruiz-Cabello F, Ruiz-Nuñez J, Saenz-López P, Moreno-Herrera I, Robles-Díaz M, Hallal H, Moreno-Planas JM, Cabello MR, Isabel Lucena M, Andrade RJ. **Role of chemical structures and the 1331T>C bile salt export pump polymorphism in idiosyncratic drug-induced liver injury.** Liver Int. 2013 Apr 17. doi: 10.1111/liv.12193. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23701583.
- Guirado M, Gil H, Saenz-Lopez P, Reinboth J, Garrido F, Cozar JM, Ruiz-Cabello F, Carretero R. **Association between C13ORF31, NOD2, RIPK2 and TLR10 polymorphisms and urothelial bladder cancer.** Hum Immunol. 2012 Jun;73(6):668-72. doi: 10.1016/j.humimm.2012.03.006. Epub 2012 Apr 12. PubMed PMID: 22504414.
- de Rueda PM, López-Nevot MÁ, Sáenz-López P, Casado J, Martín-Casares A, Palomares P, Quiles R, Gila A, Romero-Gómez M, Pavón EJ, Muñoz JA, Carazo A, Sanz-Cameno P, Moreno-Otero R, Diago M, León J, Ruiz-Extremera A, Salmerón J. **Importance of host genetic factors HLA and IL28B as predictors of response to pegylated interferon and ribavirin.** Am J Gastroenterol. 2011 Jul;106(7):1246-54. doi: 10.1038/ajg.2011.82. Epub 2011 Jun 14. PubMed PMID: 21670772.
- Bernal M, Concha A, Sáenz-López P, Rodríguez AI, Cabrera T, Garrido F, Ruiz-Cabello F. **Leukocyte infiltrate in gastrointestinal adenocarcinomas is strongly associated with tumor microsatellite instability but not with tumor immunogenicity.** Cancer Immunol Immunother. 2011 Jun;60(6):869-82. doi: 10.1007/s00262-011-0999-1. Epub 2011 Mar 13. PubMed PMID: 21400022.

- Lopez-Escamez JA, Saenz-Lopez P, Gazquez I, Moreno A, Gonzalez-Oller C, Soto-Varela A, Santos S, Aran I, Perez-Garrigues H, Ibañez A, Lopez-Nevot MA. **Polymorphisms of CD16A and CD32 Fcγ receptors and circulating immune complexes in Ménière's disease: a case-control study.** BMC Med Genet. 2011 Jan 5;12:2. doi: 10.1186/1471-2350-12-2. PubMed PMID: 21208440; PubMed Central PMCID: PMC3022798.
- Carretero R, Cabrera T, Gil H, Saenz-Lopez P, Maleno I, Aptsiauri N, Cozar JM, Garrido F. **Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer induces selection of human leukocyte antigen class I-deficient tumor cells.** Int J Cancer. 2011 Aug 15;129(4):839-46. doi: 10.1002/ijc.25733. Epub 2011 Jun 10. PubMed PMID: 20957629.
- Lopez-Escamez JA, Saenz-Lopez P, Acosta L, Moreno A, Gazquez I, Perez-Garrigues H, Lopez-Nevot A, Lopez-Nevot MA. **Association of a functional polymorphism of PTPN22 encoding a lymphoid protein phosphatase in bilateral Meniere's disease.** Laryngoscope. 2010 Jan;120(1):103-7. doi: 10.1002/lary.20650. PubMed PMID: 19780033.
- Sáenz López P, Vázquez Alonso F, Romero JM, Carretero R, Tallada Buñuel M, Ruiz Cabello F, Cózar Olmo JM. **Polymorphisms in inflammatory response genes in metastatic renal cancer.** Actas Urol Esp. 2009 May;33(5):474-81. Spanish. PubMed PMID: 19658300.
- Sáenz-López P, Carretero R, Cózar JM, Romero JM, Canton J, Vilchez JR, Tallada M, Garrido F, Ruiz-Cabello F. **Genetic polymorphisms of RANTES, IL1-A, MCP-1 and TNF-A genes in patients with prostate cancer.** BMC Cancer. 2008 Dec 19;8:382. doi: 10.1186/1471-2407-8-382. PubMed PMID: 19099590; PubMed Central PMCID: PMC2626602.

A mis padres y mi hermana.

A todos mis amigos y familia.

A mi tío **Miguel Tallada.**

Agradecimientos

La realización y escritura de esta tesis doctoral, ha sido un trabajo duro durante 7 años, que me ha aportado a nivel personal muchas alegrías y por qué no decirlo algún que otro disgusto. Aunque me siento muy orgulloso del trabajo realizado, no lo podría haber concluido sin la ayuda de mis compañeros y jefes del hospital y del apoyo moral de mi familia y amigos que son lo más importante en mi vida. A continuación quiero dedicarle unas palabras a cada uno de las personas que a mi parecer merecen ser mencionadas en esta tesis.

En primer lugar quiero darle las gracias a mi director de tesis, el Dr. Francisco Ruíz-Cabello, por todo el apoyo, la confianza y sobretodo paciencia que ha tenido conmigo. No creo que pudiese tener un mejor jefe de tesis, siempre he podido contar con él cuando he tenido algún problema o duda y sin él, creó (estoy seguro) que no hubiese podido terminar la escritura de esta tesis doctoral. Por estas razones y muchas otras.....muchísimas gracias.

Quiero darle las gracias a mi otra directora de tesis, la Dra. Teresa Cabrera. Tengo que confesar que es una persona en la que se puede confiar al 100%. Si algo le gusta o no te lo va decir. La sinceridad es una de los valores que más aprecio y por ello, siempre he tenido un afecto especial hacia ella. Además, siempre que he tenido un problema me ha intentado ayudar en todo, proporcionándome muy buenos consejos. Para finalizar, también he de comentar que ha sido de gran ayuda su experiencia para la realización de mi tesis doctoral.

Agradecerle también a mi tercer director de tesis, el Dr. José Manuel Cózar, porque gracias a las muestras obtenidas por su servicio he podido realizar la tesis doctoral. Me ha ayudado, con sus conocimientos en urología, en la escritura de la tesis.

Al Dr. Federico Garrido le tengo que agradecer el que haya podido realizar esta tesis en el servicio de Análisis Clínico. Gracias a la confianza que deposito en mi y permitirme poder trabajar en su servicio, he podido terminar esta tesis doctoral. Por último, también comentar las facilidades que en todo momento me ha dado para completar mi formación como investigador (por ejemplo cursos y congresos). Por todo ello tengo que darle las gracias.

A continuación quiero mencionar a un grupo de personas que o me han ayudado en alguna de mis etapas de elaboración de la tesis o me han hecho la vida más alegre.

Muchas gracias a Isabel Maleno por su ayuda en el estudio de los tejidos y a Fernando Vázquez por la base de datos de los pacientes. A Miguel Ángel López Nevot porque gracias al trabajo que he realizado con él hemos podido publicar unos cuantos trabajos. Además, agradecer a la gente de su laboratorio porque me han ayudado siempre en lo que he necesitado. Gracias a las “chicas de genética” por hacerme la vida mucho más alegre y por la cantidad de veces que me han invitado a esos ricos aperitivos. Por último agradecer a Pilar Jimenez por las buenas charlas que hemos tenido en esas largas tardes de trabajo.

Este párrafo lo voy a dedicar a las personas del trabajo que no las puedo considerar compañeros ya que para mí son amigos. Quiero darle las gracias a “mi” Evita, una auténtica gran amiga desde los primeros meses en el laboratorio y agradecerla el apoyo que siempre me ha dado en todo momento. A los que ya no están, como mi gran amigo Víctor y Cristina. A Mónica por toda la ayuda que me ha dado en todos estos años y por lo buena persona que es.... Tienes el cielo ganado después de “soportarme” todos estos años. Por último, al grupo “desayuno con diamantes”. Siempre me acordare de Javi (Rafa2), la hembra alfa (Irene), la segunda al mando (Isa), Abraham (moñer), la sonriente y siempre amable Teresilla, y por último pero no menos importante mi compañera de laboratorio y sobretodo amiga Anabel (kínder sorpresa). Sin mi Anabel no hubiera podido realizar ni la mitad del trabajo que se refleja en esta tesis doctoral. Siempre me he apoyado en ella y nunca me ha dejado de sonreír en todo momento. Aunque verdaderamente no te he conocido bien hasta el último año, te voy a echar de menos “jodía”.

Como todo en esta vida no es el trabajo, he conocido a un grupo de amigos en Granada que me han arropado y los llevo en mi corazón. Ana del Campo (la grande), Ana Ruano (la chica), Aharon, Ester (pelocho), Jose (Proto), Txema, Sarita, Almudena (chunguita) y mis grandes amigos Nanni y Dieguito. También tengo que dar las gracias a mi gran grupo de amigos de Madrid, tanto los de casa como los de la Universidad. Mención especial a mi gran amiga Anita (chiki), que sin ella no hubiera podido aprobar la carrera de Biología. Muchísimas gracias guapa!!!!. Muchísimas gracias a mi amigo y “corrector gramatical” Javi. También tengo que darle las gracias a mi gran amigo Jesús,

por escucharme y tener tanta paciencia conmigo, dandome siempre buenos consejos ademas de hacerme reír en los momentos que estaba un poco bajo de animos. Por ultimo agradecer a Larry, por el apoyo que siempre me da en todo momento y los grandes momentos que paso al lado de él.

El último parrafo lo he querido dedicar a mi familia, que es lo más grande que tengo. Gracias Emilio Saenz-Lopez (papa) y Carmen Larrocha (mama) por todo. Con “todo” me refiero a todo, desde darme la vida y una educación siempre excelente (aunque no se refleje mucho por mi culpa) hasta las llamadas que me haceis casi a diario, apoyandome y dandome energias para que pueda terminar esta tesis doctoral. Tambien comentar la gran ayuda monetaria que me habeis proporcionado y que sin élla no hubiera podido ni empezar esta “aventura”. Por ultimo comentaros que se que no he sido un hijo ejemplar durante mucho tiempo pero creo que he cambiado durante mi etapa en Granada y quiero seguir cambiando para convertirme en un mejor hijo. Os quiero mucho papa y mama. Tambien quiero dedicar esta tesis a mi hermana y mi sobrina Alba que aunque no la vea mucho siempre me acuerdo de ella. Agradecer a mi tia Carmina y su familia por hacerme la vida muy facil en Granada y por acogerme en los primeros dias al llegar a Granada. Tambien agradecer a mis tios de motril y a mis primos Rafa y Martita. Para terminar esta sección de agradecimientos quiero citar a mi tio Miguel Tallada. Gracias tio por darme el consejo de irme a granada para que realizase mi tesis doctoral cuando las cosas en el laboratorio de Madrid no iban muy bien. Siempre he podido contar contigo cuando tenía un problema en el trabajo y siempre me acordare de los grandes consejos que me diste cuando casi tiro la toalla. Por todo ello, esta tesis te la quiero dedicar a tí especialmente. Espero que desde el cielo o donde uno acabe después de fallecer me estes viendo y estes orgulloso de mi.

ÍNDICE GENERAL

I. ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO	21
II. RESÚMEN	23
III. INTRODUCCIÓN	25
1. Clasificación del cáncer de riñón	27
2. Estadaje del carcinoma de células renales	31
3. Tratamientos en pacientes con carcinoma renal	32
4. Características generales del proceso de transformación neoplásica; papel de la respuesta inmunitaria	36
4.1. Desregulación y mantenimiento del estímulo proliferativo	36
4.2. Inhibición de las señales supresoras del crecimiento tumoral	39
4.3. Evasión a la apoptosis	39
4.4. Inmortalización	40
4.5. Inducción de la angiogénesis	41
4.6. Invasión y metástasis	42
4.6.1 Interacciones heterotípicas con células estromales en el proceso de metástasis	43
4.7. Microambiente tumoral: dualidad de la respuesta inflamatoria intratumoral	43
4.7.1. Composición del microambiente tumoral: respuesta inflamatoria y promoción del desarrollo tumoral	45
5. Inmunogenética de la inflamación: polimorfismos genéticos en citoquinas implicadas en el microambiente tumoral	48
6. Evasión de la respuesta Inmunológica: Inmunoedición	50
6.1 Papel de las moléculas HLA en el mecanismo de evasión tumoral	51
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
V. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS (Artículos publicados y trabajos no publicados)	61
Sáenz-López P, Gouttefangeas C, Hennenlotter J, Concha A, Maleno I, Ruiz-Cabello F, Cózar JM, Tallada M, Stenzl A, Rammensee HG, Garrido F, Cabrera T. Higher HLA class I expression in renal cell carcinoma than in autologous normal tissue. TissueAntigens.2010, Feb;75(2):1108	63
Estudio de expresión de HLA en tumor primario y metástasis en pacientes con carcinoma renal tratados con inmunoterapia	79
Estudio de expresión de HLA en tumor primario y metástasis en pacientes con carcinoma renal tratados con inmunoterapia	87

Romero JM, Sáenz-López P, Cózar JM, Carretero R, Canton J, Vazquez F, Concha A, Tallada M, Garrido F, Ruiz-Cabello F. A polymorphism in the interleukin-10 promoter affects the course of disease in patients with clear-cell renal carcinoma. Hum Immunol. 2009 Jan;70(1):60-4	99
Sáenz-López P, Carretero R, Vazquez F, Martin J, Sánchez E, Tallada M, Garrido F, Cózar JM, Ruiz-Cabello F. Impact of interleukin-18 polymorphisms-607 and -137 on clinical characteristics of renal cell carcinoma patients. Hum Immunol. 2010 Mar;71(3):309-13.....	113
Sáenz-López P, Vazquez F, Cozar JM, Carretero R, Garrido F, Ruiz-Cabello F. VEGF polymorphisms are not associated with an increased risk of developing renal cell carcinoma in Spanish population. Hum Immunol. 2013 Jan;74(1):98-103.	129
VI. DISCUSIÓN	147
VII. CONCLUSIONES	175
VIII. BIBLIOGRAFÍA	179

I. RELACIÓN DE LAS PRINCIPALES ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
APC	Celula Presentadora de Antigenos
APM	Maquinaria de Procesamiento Antigénico
β_2m	β_2 -microglobulina
CR	Carcinoma Renal
cRCC	Carcinoma Renal de Celulas Claras.
VHL	Von Hippel-Lindau
HIF	Factor Inducible por Hipoxia
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
NK	“Natural Killers”
MSC	Células Madre Mesenquimales
TAMs	Macrófagos Asociados a Tumores
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Th	Linfocito CD4 Helper
Treg	Linfocitos T Reguladores
CTLs	Linfócitos T citotoxicos
MDSC	Células Mieloides Supresoras
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
AcMos	Anticuerpos Monoclonales
ARNm	Acido RiboNucleico mensajero

II. Resumen

Tradicionalmente el estudio del cáncer se ha focalizado fundamentalmente en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la transformación de células normales en células tumorales, sin prestar demasiada atención a la influencia que las células tumorales ejercen sobre el tejido estromal circundante que convierte a éstas últimas en activos colaboradores, necesarios para el crecimiento tumoral in vivo. Nuestro trabajo se ha centrado, en primer lugar, en analizar la expresión de moléculas HLA en tejido normal y tumoral en pacientes con cáncer renal, y también en pacientes sometidos a protocolos de inmunoterapia específica. Hemos analizado también la composición del infiltrado inflamatorio y el papel de los polimorfismos en genes de citocinas y quimiocinas que regulan la respuesta inflamatoria. Todos estos factores, fenotipo HLA, infiltrado inflamatorio y polimorfismos genéticos se han estudiado en el contexto de los parámetros clinicopatológicos del cRCC.

La interacción entre el sistema inmunitario y la célula tumoral produce en muchos casos una selección de variantes inmunogénicas no reconocibles por los sistemas efectores antitumorales. Uno de los mecanismos más estudiados son las alteraciones en la expresión de las moléculas de HLA de clase I, las cuales, presentan los péptidos asociados a tumores y son fundamentales para el reconocimiento por parte de los linfocitos T CD8+.

El análisis de la expresión de HLA en tejido normal, y tumoral se llevó a cabo mediante técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales y análisis de RT-PCR en tiempo real. Nuestros resultados demuestran que en el tejido neoplásico, se produce un aumento en la expresión de HLA de clase I con respecto a su tejido normal que presenta prácticamente niveles indetectables de estas moléculas. La expresión HLA de clase I es homogénea, intensa y mayoritaria en los casos analizados. Alteraciones en la expresión de antígenos HLA (pérdidas totales y /o parciales) son raras, y reflejan que en contra de lo que ocurre en otras neoplasias, la progresión del cRCC parece transcurrir sin un aparente deterioro de la presentación antigénica. Tampoco, en el estudio de pacientes tratados con inmunoterapia, evidenciamos alteración en el nivel de expresión de HLA de

clase I. Los factores inmunosupresores que intervienen en la progresión de esta neoplasia no están por tanto aclarados.

En los últimos años, algunos componentes del estroma, fundamentalmente los linfocitos T citotóxicos se han revelado como elementos protectores de la carcinogénesis y su presencia en el tejido estromal se ha asociado a una mejor supervivencia global. Del estudio inmunohistoquímico, realizado sobre el infiltrado inflamatorio en el carcinoma renal podemos decir que el grado, tipo y patrón de infiltración leucocitaria en el microambiente tumoral no condiciona de forma evidente las características clínico-patológicas del paciente ni su supervivencia. No obstante, hemos observado una tendencia a un peor pronóstico cuanto mayor grado de infiltración inflamatoria tenga el paciente.

Finalmente, la inflamación crónica se ha establecido como un factor de riesgo para el desarrollo neoplásico. De hecho, polimorfismos genéticos asociados a inflamación se han encontrado asociados a riesgo de cáncer. Del estudio de polimorfismos genéticos realizados mediante tecnología Taqman, podemos concluir que algunas de las citocinas estudiadas modifican el curso más o menos agresivo del cáncer. IL-10 e IL-18 se asociaron a tamaño tumoral, estadio tumoral y presencia de infiltración ganglionar. Por el contrario, ninguno de los polimorfismos genéticos que regulan la intensidad y duración de las respuestas inmunitarias innatas constituyen marcadores de riesgo para esta neoplasia.

III. INTRODUCCIÓN

Cáncer de riñón

El carcinoma renal (CR) representa el 3-6% de las neoplasias malignas de los adultos (Landis et al. 1999), siendo el tercer tumor urológico más frecuente. Por delante de él se sitúan el cáncer de próstata y el de vejiga constituyendo, sin embargo, el más letal de los tres. Es, además, la séptima neoplasia más frecuente en el varón y ocupa el duodécimo lugar en la mujer. Cada año se registran unos 200.000 nuevos casos de cáncer de riñón en todo el mundo. En España se diagnostican 2.630 que provocan la muerte de 1.674 personas al año. La mayor incidencia se produce a partir de los 40 años, con pico entre los 50 y los 70 años (Palacios et al. 2009).

1. Clasificación del cáncer de riñón

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2004) distingue 3 subtipos histológicos fundamentales de tumores de células renales: células claras, papilares y cromóforas (**Figura 1**). Otros tipos menos frecuentes son: carcinoma de los conductos de Bellini, carcinoma medular, carcinoma Xp11, carcinoma asociado a neuroblastoma y carcinoma mucinoso tubular. Se ha introducido como una nueva categoría el carcinoma de células renales inclasificado, que incluye todos aquellos tumores que no se pueden encuadrar en ninguna otra categoría morfológica (Eble et al. 2004).

El Carcinoma renal de Células Claras (cRCC) es la variante histológica más frecuente y es un tumor maligno compuesto de células con citoplasma claro o eosinofílico. Deriva de la células de los túbulos proximales y representa el 70-85 % de los tumores diagnosticados de cáncer renal (Fleming et al. 2000; Patard et al 2005). Generalmente se presenta como un tumor solitario cortical que protruye hacia afuera de la corteza renal. Se han visto, en cambio, tumores multicéntricos o bilaterales en estadios precoces, descubriéndose que eran típicos de los síndromes hereditarios.

Microscópicamente tienen un típico aspecto amarillento debido al rico contenido lipídico de sus células. Son frecuentes los quistes, hemorragias y calcificaciones dentro del tumor. Ocasionalmente puede presentar necrosis, lo cual implica un peor pronóstico clínico (Sengupta et al. 2005). El citoplasma de las células tumorales es habitualmente

claro. El núcleo puede ser redondeado o poligonal con nucleolos y una cromatina finamente distribuida.

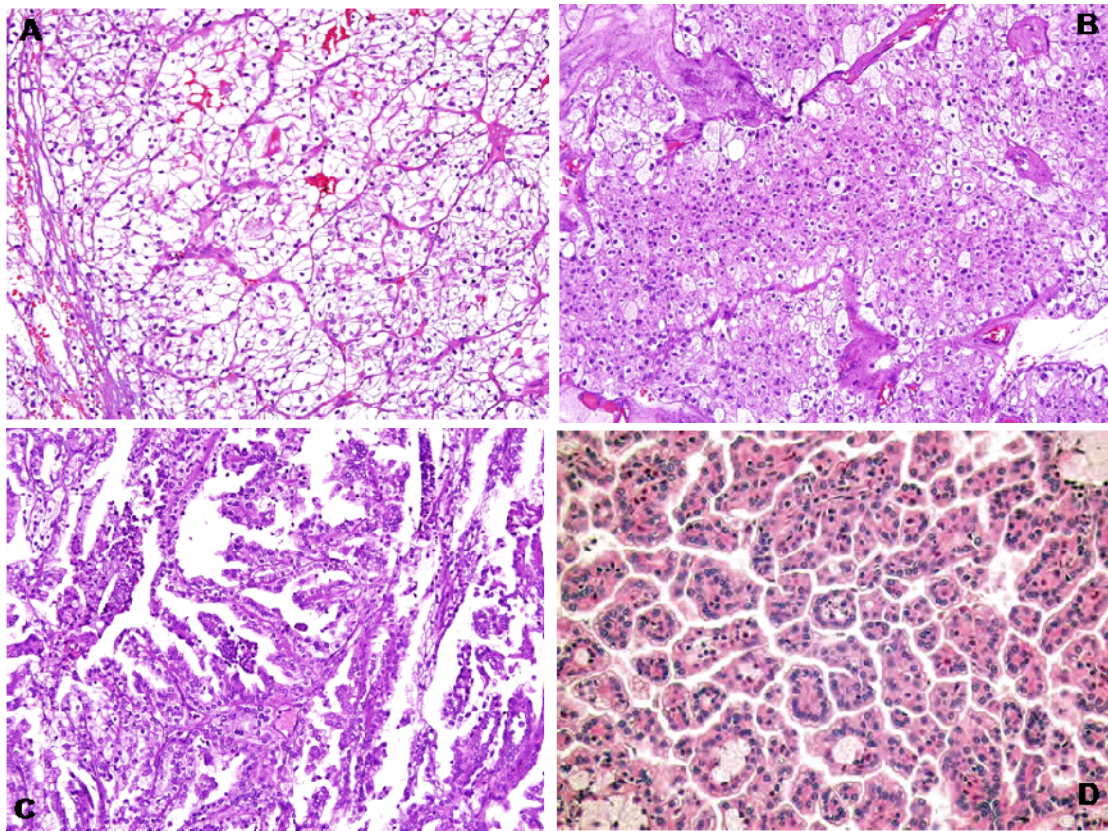


Figura 1: Cortes histológicos en hematoxilina de los tres tipos de cáncer renal más abundantes. A) carcinoma renal de células claras. B) carcinoma renal de células cromóforas. C) carcinoma renal papilar de tipo 2. D) carcinoma renal papilar de tipo 1.

El cRCC puede ser una manifestación de la enfermedad de von Hippel-Lindau en asociación a otros tumores extrarenales. Este gen (VHL), que se localiza en el brazo corto del cromosoma 3 (3p25-26), está alterado en el del 60 % de los casos esporádicos y el 100% de los casos hereditarios del cRCC. Para que este gen pierda su capacidad supresora es necesaria la pérdida de sus dos alelos, lo cual puede suceder por tres mecanismos: pérdida de su carácter heterocigótico (84-98 % de los casos), mutaciones (34-57 % casos) y metilación de la región promotora del gen (5-19 % casos). La función del gen VHL es codificar la proteína VHL (pVHL), componente crítico de una secuencia celular responsable del aporte de oxígeno a través de la regulación de la transcripción del Factor Inducible por Hipoxia (HIF: hipoxia-inducible-factor). El HIF es un factor de transcripción heterodimérico (HIF α/β) encargado de facilitar la adaptación del tejido a la hipoxia. La proteína VHL (pVHL) se encarga de la degradación de la HIF α ,

especialmente cuando el oxígeno es abundante. Existen dos tipos de HIF: el HIF 1 y el HIF2, cuyas diferencias, aparte de las funcionales, se encuentran en la diferentes isoformas de la cadena α , que pueden ser HIF-1 α y el HIF-2 α . Estudios recientes han demostrado que el HIF- α , particularmente HIF-2 α , desempeña un papel importante en el desarrollo del cáncer renal deficiente de VHL, no siendo sólo un marcador de alteración de la vía del VHL (Smaldone y Maranchie 2009). El examen inmunohistoquímico de las lesiones renales iniciales de pacientes con deficiencias en VHL muestra una pérdida coordinada de la proteína VHL y el aumento de HIF-1 α . Se ha descubierto que en estas lesiones y, coincidiendo con un aumento en la displasia, se produce un cambio evidente en el que una acumulación inicial de HIF-1 α pasa a una acumulación de HIF- 2 α (Mandriota et al. 2002). Estos hallazgos sugieren que HIF-2 α es más oncogénico que HIF-1 α . La evidencia que apoya esta teoría fue resumida muy bien por un estudio reciente (Kim et al. 2006). Las líneas de carcinoma renal en humanos expresan tanto HIF-1 α y HIF-2 α o solamente HIF-2 α , lo que sugiere que puede haber una presión de selección para mantener la expresión de HIF-2 α o perder la expresión de HIF-1 α (Maxwell et al. 1990).

En la **Figura 2** se muestran las diferentes Rutas y genes que están regulados transcripcionalmente por HIF-1 y HIF-2. HIF-1 regula funciones de la apoptosis y gluconeogénesis, mientras que el HIF-2 regula e induce la angiogénesis.

Aunque la vía de HIF estaba ligada a tumores renales de células claras deficientes de VHL, la sobreexpresión de HIF se documenta en todos los subtipos histológicos renales. El aumento de expresión de HIF-1 o HIF-2 se observó en el 50% y el 100% de los tumores cromóforos y en 25% y 50% de los tumores papilares tipo I hereditarios (HPRC), respectivamente (Kim et al. 2006).

Esta sobreacumulación del HIF en las células deficitarias de VHL juega un papel fundamental en la tumorigénesis. Se ha comprobado que la capacidad de las células de tumores renales deficitarias de VHL de formar tumores puede reducirse significativamente por la inactivación del HIF (Zimmer et al. 2004). Aunque la supresión del gen VHL es un factor de riesgo importante para el posible desarrollo de cRCC, el 30-40 % de las formas esporádicas no muestran alteraciones de dicho gen (Parker et al. 2005).

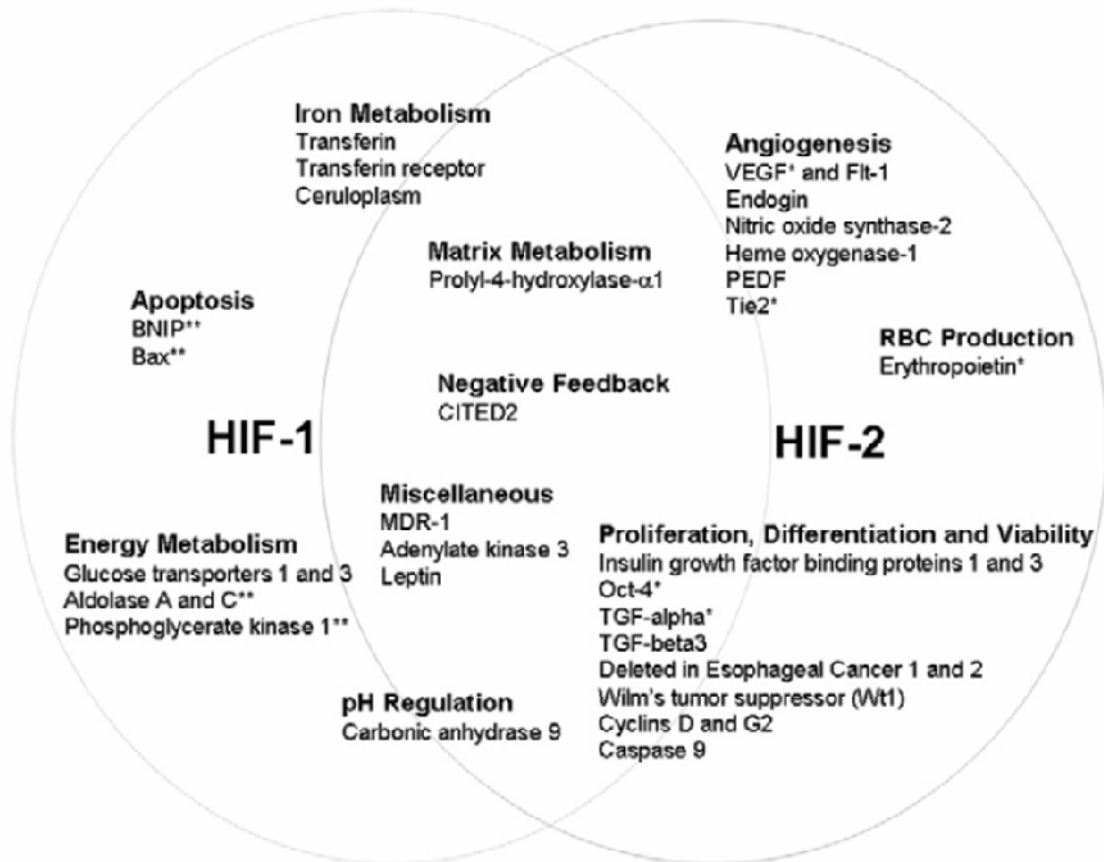


Figura 2: Rutas y genes representativos regulados transcripcionalmente por los factores inducibles por hipoxia HIF1 HIF2. Aunque existe un solapamiento significativo, diferentes estudios indican la inducción por HIF-1 de la apoptosis y la gluconeogénesis, mientras que la angiogénesis se encuentra inducida preferentemente por HIF -2.

*Indican los genes individuales específicamente regulados por HIF-2,

**Indican los genes individuales específicamente regulados por HIF-1.

En el cRCC, se han descubierto otras nuevas alteraciones, aparte de las producidas en el gen VHL. Un estudio reciente ha identificado que en el cRCC existen mutaciones que inactivan genes que codifican enzimas implicadas en las modificaciones de las histonas. Estas enzimas son: la SETD2 una enzima metiltransferasa histona H3 lisina 36, la enzima JARID1C (KDM5C) que es una enzima demetilasa histona H3 lisina 27 y la UTX (KMD6a) la enzima demetilasa histona H3 lisina 27 (Dagliesh et al 2010).

El carcinoma renal tipo papilar se define por la distribución de sus células alrededor de ejes capilares (papilas), al menos en un 50-70 % del tumor, diferenciándose así de las ocasionales áreas papilares que pueden hallarse en otros tipos de carcinoma renal.

Existen dos tipos: El tipo 1 está formado por células basófilas con bajo grado celular y es, además, el más abundante, mientras que el tipo 2 se compone de células eosinófilas y tiene peor pronóstico que el anterior. La incidencia del carcinoma renal papilar es variable, pero pueden llegar a ser del 7 al 15 % de los CR.

Los cambios genéticos más frecuentes son la trisomía o tetrasomía del 7, trisomía 17 y pérdida del cromosoma Y. Estas alteraciones se han relacionado con la activación del proto-oncogen c-MET (7q34) que codifica el receptor de HGF (rHGF). También se ha detectado pérdida de heterocigosidad en 3p en un 59 % de los casos (Algaba et al 2006). Recientemente se ha descubierto que las alteraciones en 17q son casi exclusivas del tipo I, mientras que las 9p son del tipo 2, lo que sugiere que cada uno de estos tipos celulares puede surgir de diferentes tipos celulares (Sanders et al 2002).

El carcinoma renal de tipo cromóforo representa del 5 al 10 % de todos los casos de CR. Los cambios moleculares más frecuentemente encontrados son pérdida en los cromosomas 1, 2, 6, 10, 17 y 21. Las pérdidas de heterocigosidad del cromosoma 17 lo relacionan con el síndrome de Birt-Hogg-Dubé.

2. Estadaje del carcinoma de células renales

Para determinar el estadio del tumor hay que tener en cuenta tres condiciones que son: el TNM, la abreviatura en inglés de tumor (T), ganglio (N) y metástasis (M). Se clasifica como estadio I cuando el tumor mide 7 cm o menos, está limitado al riñón y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a otros órganos distantes (T1, N0, M0). El estadio II corresponde a un tumor mayor de 7 cm y está limitado al riñón, no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a otros órganos distantes (T2, N0, M0). Para una clasificación de estadio III, tiene que darse cualquiera de estas condiciones: el tumor, de cualquier tamaño, se encuentra solo en el riñón y se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales, pero no a otras partes del cuerpo (T1, T2; N1; M0); el tumor ha invadido las venas principales o los tejidos perirrenales y puede haberse diseminado a

los ganglios linfáticos regionales no siendo así en otras partes del cuerpo (T3; cualquier N; M0). Por último se asigna un estadio IV cuando se dan las condiciones siguientes: el tumor se ha diseminado a zonas más allá de la fascia de Gerota y llega a la glándula suprarrenal del mismo lado del cuerpo en el que se encuentra el tumor, posiblemente a los ganglios linfáticos, pero no a otras partes del cuerpo (T4; cualquier N; M0), o cuando éste se ha diseminado a cualquier otro órgano, como los pulmones, los huesos o el cerebro (cualquier T, cualquier N, M1) (Stephen et al. 2010).

3. Tratamientos en pacientes con carcinoma renal

En la actualidad a los pacientes que han desarrollado un CR se les realizan una intervención quirúrgica mediante una de las siguientes técnicas dependiendo del estado del tumor y el paciente: una nefrectomía radical o parcial, cirugía laparoscópica, ablación por radiofrecuencia o crioablación. En muchos de los casos se combina la cirugía con una terapia dirigida y/o inmunoterapia mientras que en otros se les administra, también, un tratamiento de radioterapia o quimioterapia. En los casos en que los pacientes tienen un cáncer avanzado y se ha producido metástasis reciben múltiples tratamientos.

3.1 Radioterapia

Se utiliza con poca frecuencia debido al grave daño que produce a las células normales del riñón. En los casos en que se utiliza es porque no se puede extirpar el tumor o riñón mediante cirugía, e incluso en esas circunstancias suele utilizarse solo en áreas por las que el cáncer se ha diseminado, no en el tumor primario del riñón. La mayoría de las veces, la radioterapia se utiliza una vez que el cáncer se ha diseminado para ayudar a aliviar los síntomas, como el dolor óseo o la inflamación cerebral (Jackson et al. 2001; Fossa et al. 1998).

3.2 Quimioterapia

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas generalmente mediante la inhibición de su capacidad para crecer y dividirse. La quimioterapia sistémica se administra a través del torrente sanguíneo para que alcance las células cancerosas de todo el cuerpo. Si bien es útil para tratar la mayoría de los tipos de cáncer,

el de riñón, a menudo, es resistente a la quimioterapia ya que presenta grados elevados de expresión de la proteína de multirresistencia farmacológica glucoproteína P. La quimioterapia parece moderadamente eficaz tan sólo cuando se combina 5-fluorouracilo (5FU) con medicamentos inmunoterápicos (Stadler et al. 2003).

3.3 Inmunoterapia

Cuando el cáncer renal está en una fase avanzada, tanto la quimioterapia como la radioterapia no son efectivas. Los únicos tratamientos disponibles durante muchos años han sido la inmunoterapia con interleuquina 2 (IL-2) e interferón- α (IFN- α), con un éxito relativo del 10%-15% (Cozar et al. 2002). La IL-2 es una proteína que está implicada en la regulación de la respuesta inmunitaria, actúa como factor de crecimiento de los linfocitos, interviene en la reacción inflamatoria estimulando la síntesis de interferón, induce la liberación de IL-1, TNF- α y TNF- β y es necesaria para el establecimiento de la memoria inmunitaria celular (Abul K. et al. 2007). En el caso de la IL-2, la toxicidad es mucho mayor que la del IFN- α y tan solo las células claras responden a este tipo de inmunoterapia. Se recomienda y se han visto efectos clínicos beneficiosos, el uso de este tipo de inmunoterapia (IL-2) en determinados pacientes con CR metastásico que presentan un buen perfil de riesgo e histología de células claras.

El IFN- α es una proteína producida por el sistema inmunitario con una amplia funcionalidad. Entre ellas destaca la activación de células inmunes, tales como los macrófagos y las células NK, que incrementan el reconocimiento de células cancerígenas por parte de los linfocitos T, mediante la presentación de antígenos al inducir la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), así como retardar la división de las células cancerosas. En el caso del carcinoma renal, reduce la expresión del receptor del factor del crecimiento epidermico (EGFR). El efecto positivo del IFN- α es especialmente importante en los pacientes con CR metastásico con una histología de células claras y exclusivamente con metástasis pulmonares (Coppin et al. 2005). Se han realizado estudios combinando diferentes tratamientos inmunoterapéuticos y quimioterapia, obteniéndose como conclusión que la eficacia del IFN- α solo era igual a la combinación del IFN con IL2 y quimioterapia (5FU) (Gore et al 2010). Estudios recientes han demostrado mayor tasa de respuesta y supervivencia en

pacientes tratados con bevacizumab + IFN- α , frente a pacientes tratados únicamente con IFN- α (Escudier et al 2007).

Estudios sobre las interacciones entre el huésped-tumor han llevado a nuevas estrategias de inmunoterapia para el cáncer, siendo varios de ellos potencialmente aplicables al cáncer renal. Un ejemplo de estas nuevas inmunoterapias es el tratamiento con ipilimumab, anticuerpo frente al antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), que ha mejorado la supervivencia en pacientes con melanoma y metástasis y existen evidencias de la regresión del cáncer en pacientes con cáncer renal (Hodi et al. 2010; Yang et al. 2007). En la **tabla 1** se muestran las diferentes inmunoterapias que han surgido y que se están probando en estos momentos en el carcinoma renal.

3.4 Terapia dirigida

Se denominan terapias dirigidas a los tratamientos que actúan sobre los genes, las proteínas específicas del cáncer o sobre las condiciones del tejido que contribuyen al crecimiento y la supervivencia del cáncer. Este tipo de procedimiento bloquea el aumento y la diseminación de las células cancerosas y, a la vez, limita el daño a las células normales. A partir del año 2000 se ha empezado a administrar eficaces terapias dirigidas, incluyendo agentes antiangiogénicos en el cáncer renal. Éstas incluyen anticuerpos frente al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Bevacizumab), inhibidores de tirosina kinasa de VEGFR2 (Sunitinib y Sorafenib) e inhibidores de los mecanismos diana de las vías de rapamicina (mTOR) (Temsirrolimus y Everolimus).

Tabla 1: Inmunoterapias en desarrollo para el cáncer renal

Compuestos en desarrollo	Clase de agente	Estado del desarrollo	Diseño del ensayo clínico/objetivos
Denileuquina difitox	Proteína de fusión de la toxina difteria e IL2 humana	Fase 1	Terapia combinada con altas dosis de IL2.
IMP321	Proteína de fusión soluble LAG-3	Fase 1	Respuesta a altas dosis administradas en pacientes con cáncer renal avanzado.
AGS-003	Vacuna basada en DC	Fase 3	Actividad biológica e inocua en pacientes de cáncer renal diagnosticados recientemente con estadio IV.
Transplante alogénico de células madre hematopoyética de baja intensidad	Transplante de células madre	Fase 1/2	Administración de forma temprana a los pacientes de cáncer renal metastásico de infusiones de linfocitos Th2 de múltiples donantes.
BMS-936558	Anticuerpo monoclonal anti-PD-1	Fase 1/2	Estudio en fase 1 con BSM-936558 en combinación con Sunitinib o Pazopanib en pacientes con cáncer renal avanzado; un rango de dosis en la fase 2 en pacientes que hayan recibido anteriormente terapia angiogénica.
¹⁷⁷ Lu-DOTA-cG250	Anticuerpo monoclonal cG250	Fase 2/3	Dosis crecientes en pacientes con cáncer renal avanzado.
MVA-T54	Vacunas peptídicas del antígeno tumoral 5T4	Fase 3	Estudio control-placebo aleatorio en pacientes con cáncer renal metastásico.
HSPPC-96	Vacuna autóloga del derivado tumoral HSPPC	Fase 3	Terapia adyuvante después de nefrectomía radical en pacientes con cáncer renal de alto riesgo sin metástasis.
IMA901	Vacuna basada en péptidos que contiene 9 proteínas de unión de HLA I y una de HLA II	Fase 3	Supervivencia global en pacientes con cáncer renal metastático avanzado que reciben sinitinib como primera línea terapéutica.

IL-2= interleuquina 2; LAG-3= gen de la activación linfocitaria 3; DC= célula dendrítica; Th2= células helper de tipo 2; PD-1= muerte programada-1;
HSPPC= complejo peptídico de proteínas de choque térmico.

La mayor parte de estos medicamentos se utilizan actualmente como primera línea de tratamiento en el carcinoma renal metastásico. Una comparación de los genes sobreexpresados en los 3 subtipos más frecuentes del carcinoma de células renales demostró que existía un grupo de genes sobreexpresados que eran comunes en las células claras, papilares y cromóforas pero que también existía un grupo de genes que eran exclusivos de cada uno de los tipos de cáncer renal, lo que sugiere la importancia de la clasificación tumoral en la investigación de marcadores biológicos y terapias dirigidas (Jones y Libermann 2007). Por lo tanto, los efectos beneficiosos de los inhibidores de VEGFR sunitinib y sorafenib se han demostrado en pacientes con cáncer renal de células claras y aparecen más limitados en pacientes con tumores renales papilares o cromóforos (Choueiri et al. 2008). Por el contrario, el tratamiento con temsirolimus parece demostrar un efecto más significativo en la supervivencia en los pacientes con

cáncer renal con células no claras (incluyendo el 75% de los papilares) que en los pacientes con carcinoma renal de células claras (Dutcher et al. 2009).

4. Características generales del proceso de transformación neoplásico; papel de la respuesta inmunitaria

La mayoría de los cánceres humanos son causados por alteraciones secuenciales (entre dos y ocho) que se desarrollan en el transcurso de 20 a 30 años. Cada una de estas alteraciones, directa o indirectamente, desequilibran la balanza entre el crecimiento y la muerte celular, favoreciendo su crecimiento, es decir, cada alteración provoca una ventaja selectiva de crecimiento a la célula en la que reside. Las evidencias hasta la fecha sugieren que hay aproximadamente 140 genes (conductores o maestros) cuyas mutaciones intragénicas contribuyen al desarrollo del cáncer. Además, hay otros genes controladores activados por mecanismos epigenéticos que también causan una ventaja selectiva del crecimiento, pero que son menos conocidos por las dificultades de su análisis. Los genes controladores mutados conocidos realizan su función a través de una docena de vías de señalización que regulan varios procesos básicos celulares tales como la supervivencia celular y el mantenimiento del genoma. Cada tumor individual, incluso del mismo subtipo histopatológico, presentan multitud de diferencias genéticas, muchas de ellas conocidas como mutaciones pasajeras, aunque las vías afectadas son similares. Existe una heterogeneidad genética entre las células de un mismo tumor pudiendo condicionar sensiblemente la respuesta terapéutica (Vogelstein et al; 2013). Hanahan y Weinberg han analizado en profundidad estas vías comunes en la mayoría de los tumores estableciendo una serie de características intrínsecas de la célula neoplasia que son resumidas en la **Figura 3** (Hanahan y Weinberg 2000; Hanahan y Weinberg 2011).

4.1. Desregulación y mantenimiento del estímulo proliferativo

Los tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento y división, lo que garantiza una regulación del número de células y, por lo tanto, el mantenimiento de la arquitectura y funcionalidad del tejido. Estas señales vienen dadas en gran parte por factores de crecimiento que se unen a

receptores de superficie celular, que contienen dominios intracelulares de Tirosina Quinasa. La unión de estos factores a sus receptores provoca una cascada de señalización intracelular que regula la progresión del ciclo celular, así como el crecimiento celular.

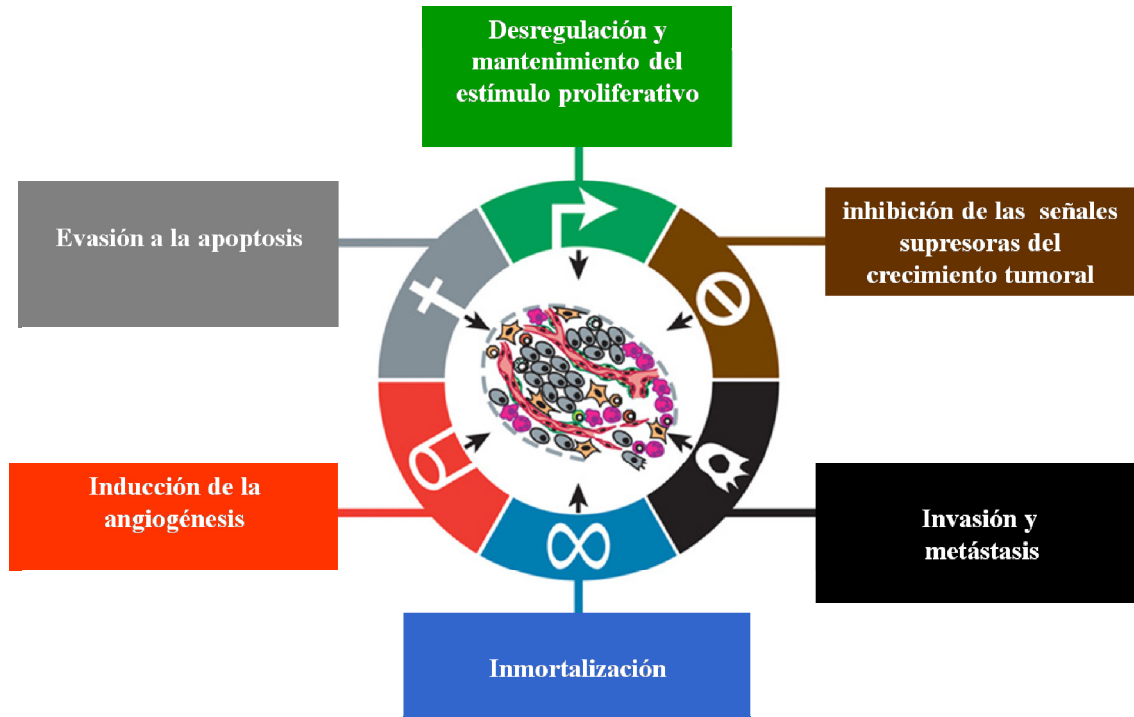


Figura 3: Representación de las seis características o cambios que se producen en las células sanas y que las convierten en tumorales. Adaptación de Hanahan &, Weinberg, 2011

La señalización mitogénica en células cancerosas está muy bien estudiada. (Lemmon y Schlessinger 2010; Witsch et al. 2010; Hynes y MacDonald 2009; Perona 2006). Las células cancerosas, mediante diferentes mecanismos, pueden adquirir la capacidad de señalización proliferativa. Uno de ellos es que, gracias a la habilidad de producir por sí mismo el factor de crecimiento, puede responder a través de la expresión de receptores afines dando como resultado una estimulación autocrina proliferativa.

La sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento o la alteración estructural del receptor que facilita la unión de los factores de crecimiento, es otro método que la célula tumoral puede utilizar para facilitar su crecimiento y proliferación. Un ejemplo es el caso del receptor del factor de crecimiento epidermal (también llamado ERBB1), que están sobreexpresados en cáncer de estómago, cerebro y mama, mientras que el receptor ERBB2 está altamente regulado en cáncer de pecho y estómago. Tanto el ERBB1 como ERBB2 son importantes antígenos tumorales para la inducción de la respuesta de células

T. Pacientes con tumores que sobreexpresan alguno de estos receptores tienen una respuesta inmunitaria debido algún péptido derivado de estos dos receptores (Pupa et al. 2005).

Otro mecanismo de adquisición de las señales de proliferación puede venir a través de señales provenientes de las células cancerosas que provocan una estimulación en las células normales que se encuentran en el estroma, dando como consecuencia una producción de diversos factores de crecimiento (Cheng et al. 2008;.. Bhowmick et al. 2004).

Por último, las células cancerosas pueden activar componentes de las vías de señalización mitogénicas que se encuentren “por debajo” de la vía de unión del receptor a su ligando, obviando la necesidad de esta unión para producir la proliferación celular, como puede ser el caso de la proteína Ras. Se han descubierto mutaciones somáticas en diversos tumores en diferentes componentes de señalización de la proliferación celular. Un ejemplo es el caso de los melanomas. El 40% de los melanomas humanos contienen mutaciones que afectan a la estructura de la proteína B-Raf, provocando una señalización constitutiva en la proteína Raf de la vía de activación proliferativa de las (MAP)-quinasa (Davies y Samuels 2010). Del mismo modo, las mutaciones en las isoformas de la subunidad catalítica de la fosfoinositida-3-quinasa (PI3-quinasa), que sirven para activar los circuitos de señalización de la PI3-quinasa incluyendo su transductor de señal clave Akt / PKB, están siendo detectados en una serie de tipos de tumores (Jiang y Liu 2009; Yuan y Cantley 2008).

Algunos de los factores de crecimiento autocrinos que son producidos por las células tumorales no sólo proporcionan una señal de estímulo para el crecimiento celular, sino que también afectan simultáneamente a la respuesta inmunológica. Por ejemplo, la IL-4 e IL-10, que son factores autocrinos de crecimiento para el carcinoma de tiroides (Stassi, et al. 2003) y, paralelamente ambas citoquinas pueden hacer que la respuesta de células T pase de ser una respuesta de células linfocito T CD4 helper 1 (Th1) a una respuesta de célula linfocito T CD4 helper 2 (Th2), inactivan así la inmunidad contra el cáncer ya que, a menudo, se basan en las respuestas de células Th1. La IL-6 es uno de los factores de crecimiento autocrinos más importantes en la patogénesis de numerosos tipos de cáncer, tales como cáncer de próstata, cáncer renal y mieloma (Zitvogel et al. 2006)

Se ha demostrado que la activación anormal de STAT3, que está implicado en la señalización a través del receptor de IL-6, inhibe la respuesta inflamatoria y la comunicación entre respuesta inmunológica innata y adaptativa en varios tipos de cánceres, favoreciendo a las células tumorales en su crecimiento descontrolado (Wang et al. 2004)

4.2. Inhibición de las señales supresoras del crecimiento tumoral

En el tejido normal existen múltiples señales antiproliferativas que actúan manteniendo la homeostasis tisular y la inactividad de las células. Estas señales incluyen aquellas mediadas por inhibidores del crecimiento que se encuentran de forma soluble e inhibidores de crecimiento estáticos que se hallan fijados en la matriz extracelular o en la superficie de alguna célula vecina.

Aparte de la capacidad de las células tumorales de inducir y mantener la activación de las señales de crecimiento, tienen que evitar la acción de programas potentes que regulan negativamente la proliferación celular y señales antiproliferativas. Muchos de estos programas dependen de la acción de genes supresores de tumores que codifican proteínas tales como el RB (Retinoblastoma asociado) y la TP53. Mientras que la proteína RB integra señales procedentes sobre todo de exterior de la célula y decide si la célula entra en crecimiento y división celular (Burkhart y Sage 2008; Deshpande et al. 2005; Sherr y McCormick 2002), la proteína TP53 actúa en situaciones de stress y daño del genoma provocando la apoptosis celular. Una de las señales antiinflamatorias más importantes es el factor de crecimiento transformante β (TGF- β); muchos tumores reaccionan inhabilitando alguno de los componentes de las vías de señalización de éste factor inhibidor. Algunos ejemplos serían mutaciones o pérdida de los receptores del factor, mutaciones en el factor transcripcional SMAD4 o la delección de un locus que codifica INK4B (también llamado p15) y la proteína retinoblastoma.

4.3. Evasión a la apoptosis

La maquinaria apoptótica está compuesta tanto por reguladores como componentes efectores. Los reguladores, a su vez, se subdividen en dos grupos: unos reciben y

procesan señales extracelulares de muerte inducida (por ejemplo receptores fás y sus ligandos); otros detectan señales intrínsecas. Ambos subgrupos culminan en la activación de las proteasas (caspasas 8 y 9), que promueven una cascada de proteólisis donde actúan las caspasas efectoras y provocan la muerte de la célula y su posterior eliminación.

La apoptosis se activa en respuesta al stress que experimentan las células cancerosas durante la proliferación celular o como resultado de la terapia anti cáncer. Varios estudios han demostrado que la apoptosis está atenuada en aquellos tumores que progresan a un grado alto de malignidad y resistencia a terapia (Adams y Cory, 2007; Lowe et al. 2004). Las células tumorales tienen una gran variedad de estrategias para evitar la apoptosis. Las más comunes son la eliminación de la función del supresor del tumor TP53, que incrementa la expresión de reguladores anti-apoptóticos tales como el Bcl-2, Bcl-Xl o señales de supervivencia (igf1/2), y mediante la baja regulación de factores pro-apoptóticos (Bax, Bim, Puma).

4.4. Inmortalización

Las células cancerosas requieren un potencial ilimitado de replicación para poder generar tumores macroscópicos. La limitación en la proliferación viene dada por dos barreras: la senescencia, que hace que la célula entre en un estado no proliferativo pero que todavía está viva, y la crisis, que es cuando la célula entra en proceso de muerte celular. Cuando una célula supera estas dos barreras pasa a un estado de proliferación ilimitada.

Existen evidencias que indican que los telómeros que protegen las terminaciones de los cromosomas están involucrados en la proliferación ilimitada (Blasco 2005; Shay y Wright 2000). El 85%-90% de las células malignas consiguen tener una replicación ilimitada mediante una expresión altamente regulada de la enzima telomerasa, la cual provoca un mantenimiento continuo de los telómeros mediante el incremento de las repeticiones de hexanucleotidos en el final de los telómeros de ADN.

4.5. Inducción de la angiogénesis

Los tumores, como el tejido normal, requieren sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la evacuación de dióxido de carbono y desechos metabólicos. La angiogénesis resuelve estas necesidades mediante el proceso de neovascularización asociado al tumor. La angiogénesis está casi siempre activada durante la progresión tumoral, provocando normalmente la formación de nuevos vasos que ayudan al crecimiento neoplásico (Hanahan y Folkman 1996).

Existen evidencias que demuestran que la angiogénesis está gobernada por factores que la inducen o la inhiben. Algunos de estos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización que se unen a receptores de superficie estimuladores o inhibidores en las células endoteliales vasculares (Baeriswyl y Christofori 2009; Bergers y Benjamin 2003). En muchas células tumorales se han encontrado una alta expresión de determinadas proteínas, tales como el VEGF, el factor 1 de crecimiento de fibroblastos (FGF1) y FGF2 al comparar con su tejido normal. Estas proteínas son cruciales para disparar la actividad angiogénica a partir de un estado latente. Además de promover la angiogénesis, el VEGF puede inhibir la respuesta inmunológica antitumoral mediante la inhibición de la activación de factor nuclear- Kb en células dendríticas previniendo su maduración (Della Porta et al; 2005) y suprimiendo la activación de las células T (Ohm et al 2003).

En la actualidad se sabe que existen varios tipos celulares originados en la médula ósea que juegan un papel crucial en la angiogénesis patológica (Qian y Pollard, 2010; Zumsteg y Christofori 2009; Murdoch et al. 2008; De Palma et al. 2007). Entre los tipos celulares se incluyen células implicadas en la inmunidad innata, particularmente los macrófagos, neutrófilos, mastocitos y células progenitoras mieloides las cuales se infiltran en las periferias de las lesiones premalignas y tumores en progresión. Las células inflamatorias peri-tumorales ayudan en el inicio y mantenimiento de la acción angiogénica en el crecimiento del tumor, además de facilitar la invasión local y la ayuda en la protección de la vascularización del efecto de los fármacos contra la señalización de las células endoteliales (Ferrara 2010).

En el cáncer renal, como ya se comentó anteriormente, se encuentran altamente expresados los factores HIF en muchos de los casos. Estos inducen la transcripción de moléculas implicadas en la angiogénesis tales como el VEGF, Fit1, PEDF, Tie2.

4.6. Invasión y metástasis

La cascada invasión-metástasis es un proceso de múltiples etapas. Se ha esquematizado como una secuencia de fases que comienzan por cambios en las células que comportan una invasión local de la célula cancerosa, mediante la intravasación entran en la sangre y vasos linfáticos cercanos, se produce su tránsito por los sistemas linfáticos y hematógenos, seguido de un escape de las células cancerosas al parénquima de tejidos distantes (extravasación), la formación de los pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis) y, finalmente, el crecimiento de estas micrometástasis para formar las macrometástasis, siendo llamado este último paso colonización (Talmadge y Fidler 2010; Fidler 2003).

El asentamiento de células tumorales en regiones que son distantes al tumor primario (metástasis) es la causa del 90% de muertes por cáncer en humanos. Para que se produzca la invasión de dichas células a otras regiones lejanas de su tumor primario, se tienen que producir alteraciones en proteínas que están implicadas en el anclaje de las células con su entorno al mismo tiempo que una secreción de proteasas. Dentro de este grupo de proteínas de anclaje se ha estudiado la proteína nectina 2 (NECL2), que proviene del gen supresor TSLC1 que se encuentra frecuentemente inactivada en células cancerosas de pulmón. Aparte de su función de anclaje con otras nectinas de células vecinas, es reconocida por una molécula (CRTAM) que se encuentra tanto en las células “Natural Killers” (NK) como las células T CD8+. Este reconocimiento promueve la citotoxicidad de las células NK y la producción de INF- γ por parte de las células T (Boles, K. S et al; 2005). Por consiguiente, la inactivación en la expresión de NECL2 tiene un efecto oncogénico dual: la célula no interactúa y se ancla con otras células vecinas, y no es detectado por las células NK y linfocitos T. Otra proteína de anclaje muy bien estudiada es la pérdida de la E-caderina en las células cancerosas, que es clave en la adhesión celular. Un incremento en la expresión de ésta impide la invasión y metástasis. La baja regulación y ocasionalmente inactivación de E-caderina mediante

mutación en cánceres humanos da indicios de que juega un papel supresor importante en la invasión y metástasis. (Berx y van Roy, 2009; Cavallaro y Christofori, 2004).

4.6.1 Interacciones entre las células tumorales y estromales en el proceso de metástasis

Cada vez es más evidente que existe una relación entre las células tumorales y células del estroma neoplásico, que consideraremos más en profundidad después, y que van a facilitar el crecimiento y el desarrollo metastásico (Egeblad et al. 2010; Qian y Pollard, 2010; Joyce y Pollard, 2009; Kalluri y Zeisberg, 2006). Un ejemplo de ello son las células madre mesenquimales (MSC) presentes en el estroma del tumor, las cuales secretan CCL5/RANTES como respuesta a las señales liberadas por las células cancerosas; CCL5 actúa entonces recíprocamente en las células cancerosas para estimular un comportamiento invasor (Karnoub et al., 2007). Otro ejemplo lo encontramos en los macrófagos, en la periferia del tumor, que pueden fomentar la invasión local mediante el suministro de enzimas degradantes de la matriz, tales como las metaloproteinasas y proteasas de cisteína catépsina (Kessenbrock et al. 2010; Joyce y Pollard 2009; Palermo y Joyce 2008; Mohamed y Sloane 2006). Las células tumorales pueden secretar moléculas quimiotácticas cuya función es la del reclutamiento de células inflamatorias proinvasivas en lugar de producir por ellas mismas las enzimas que degradan la matriz.

4.7. Microambiente tumoral: dualidad de la respuesta inflamatoria intratumoral

Hasta ahora, se han descrito 6 características que tiene que adquirir las células del cáncer para poder sobrevivir, proliferar, y propagarse, y que contribuyen a la inactivación de los mecanismos intrínsecos del desarrollo neoplásico. Sin embargo, estas alteraciones genéticas son insuficientes para explicar el desarrollo neoplásico en un huésped inmunocompetente. Hanahan y Weinberg en 2011 han sugerido otras 4 características que son fundamentales para la progresión tumoral (**figura 4**) que son: desregulación energética celular, inestabilidad genómica y mutaciones, promoción tumoral inducida por la inflamación y la evasión de la respuesta inmunológica. Estas dos últimas las desarrollamos en mayor profundidad a continuación.

La primera característica es la evasión activa de las células del cáncer del ataque y eliminación por parte de las células del sistema inmunológico. La segunda consiste en utilizar la respuesta inflamatorio en su propio beneficio, promoviendo la progresión del tumor a través de diversos medios: fomento de la angiogénesis, aumento de la proliferación e interviniendo críticamente en la transición epitelio-mesenquimal y, por tanto, en el desarrollo metastásico.

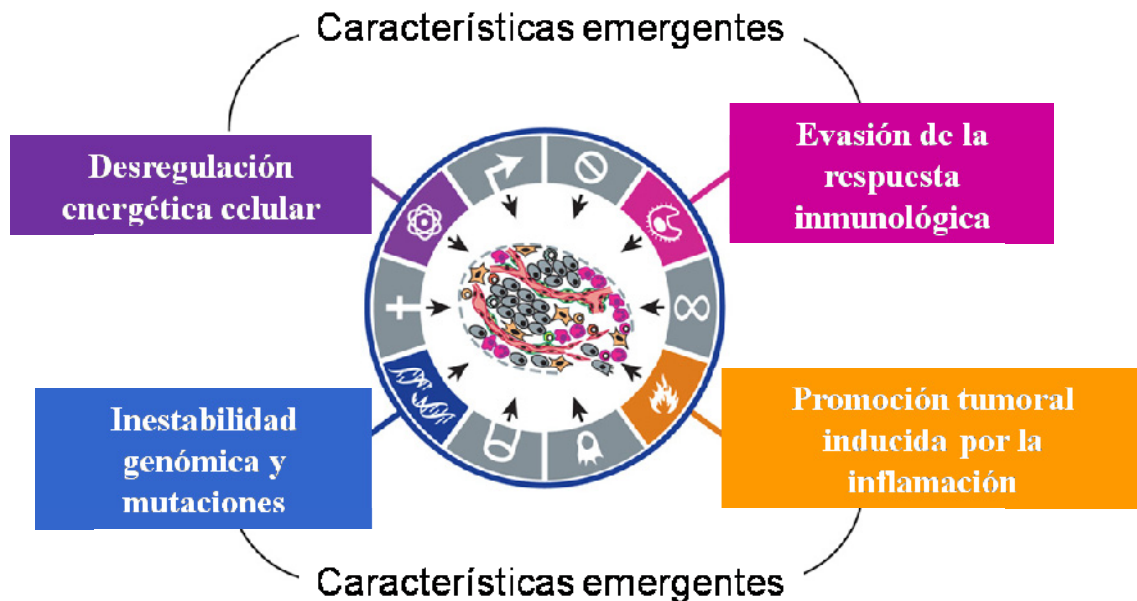


Figura 4: representación de las 4 nuevas características emergentes que se tienen que dar para la progresión tumoral. Adaptación de Hanahan D, Weinberg RA. Cell. 2011

Se ha observado que los tumores humanos están, generalmente, infiltrados por células inflamatorias (Whiteside 1993; Mihm et al. 1996; Balkwill y Mantovani 2001). Aunque estos infiltrados de células del sistema inmunitario pueden variar en densidad y composición de un tumor a otro, su presencia se considera un intento del huésped por detectar células tumorales emergentes y destruirlas, interfiriendo con la progresión tumoral (Zitvogel et al. 2006). Existen numerosos datos experimentales en ratones que demuestran la importancia del sistema inmunológico en la erradicación de los tumores. En ratones modificados genéticamente para ser deficientes en diversos componentes del sistema inmunológico se llegó a la conclusión de que los tumores aparecían y crecían con más rapidez en ratones que eran deficientes en linfocitos T citotóxicos CD8 + (CTL) o linfocitos CD4 + T Th1 o células NK, por otra parte, los ratones con inmunodeficiencias combinadas tanto en las células T y células NK eran aún más susceptibles al desarrollo del cáncer. Los resultados indicaron que, al menos en ciertos

modelos experimentales, tanto el sistema inmunológico innata y adaptativa son capaces de contribuir de manera significativa en la vigilancia inmunológica y por lo tanto en la erradicación del tumor (Teng et al. 2008; Kim et al. 2007).

Sin embargo, paralelamente, en la última década también se ha propuesto que ciertos elementos del sistema inmunológico, sobretodo el de la inmunidad innata, son promotores de la progresión neoplásica y participan sobre todo en el desarrollo y expansión de neoplasias incipientes (DeNardo et al. 2010; Grivennikov et al. 2010; Qian y Pollard 2010; Colotta et al. 2009). También durante la respuesta innata, las células inflamatorias liberan numerosas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que son altamente mutagénicas, contribuyendo al proceso de inestabilidad genética que facilita la aparición de variantes celulares que contienen los cambios genéticos que estamos considerando. (Grivennikov et al. 2010).

4.7.1. Composición del microambiente tumoral: respuesta inflamatoria y promoción del desarrollo tumoral

El microambiente tumoral contiene: células de la inmunidad innata (incluyendo macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células supresoras mieloide, células dendríticas, y células NK) y células de la inmunidad adaptativa (linfocitos T y B), además de la células cancerosas y su estroma circundante que consiste en fibroblastos, células endoteliales y células mesenquimales (de Visser et al. 2006). Esta diversidad de células se comunican unas con otras a través de un contacto directo o mediante la producción de citoquinas y quimioquinas, que actúan de manera autocrina y paracrina para controlar y modelar el crecimiento del tumor. Sin este conjunto de células no se puede explicar la biología ni el comportamiento in vivo de los distintos tumores.

Las células inmunológicas más frecuentes en el microambiente tumoral son los macrófagos asociados a tumores (TAMs) y las células T. La mayoría de los TAMs promueven el crecimiento tumoral y pueden ser obligatorios para que se produzca la angiogénesis, la invasión y la metástasis (Condeelis y Pollard 2006). Se ha visto que cuando se encuentra un alto contenido de TAMs casi siempre se correlaciona con un mal pronóstico (Murdoch et al. 2008). TAM es una de las células más importantes en el campo de la inflamación y el cáncer además de una fuente importante de citoquinas (Mantovani et al. 2008). Los macrófagos se pueden clasificar en dos tipos: M1 y M2

(Sica et al. 2008). Los macrófagos M1, activados por productos microbianos e IFN γ , expresan altos niveles de citoquinas que promueven la inflamación (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 o IL-23), las moléculas del MHC, inducen la síntesis de óxido nítrico y son capaces de matar a patógenos así como promover la respuesta inmunológica frente al tumor. Por el contrario, los macrófagos M2, que son activados *in vitro* por IL-4, IL-10 e IL-13, disminuyen la expresión de MHC de clase II, la expresión de IL-12 y muestra un incremento en la expresión de la citoquina anti inflamatoria IL-10, receptor scavenger A y la Arginasa. La mayoría de los TAMs se considera que tienen un fenotipo M2 que promueven la angiogénesis tumoral y la remodelación tisular (Sica et al. 2008). Sin embargo, la mayoría de citoquinas confirmadas que promueven la progresión tumoral son “citoquinas M1”, mientras que la IL-10, una citoquina M2, puede ser supresora del tumor como se muestra en cáncer de colon (Berg et al. 1996; Lin y Karin 2007).

Aparte de los macrófagos especializados en el estroma tumoral, se han encontrado una variedad de progenitores mieloides parcialmente diferenciadas (Murdoch et al. 2008). Estas células han demostrado tener una actividad promotora tumoral. Cabe destacar un tipo de célula mieloides de infiltración tumoral que coexpresan el marcador de macrófagos CD11b y marcador de neutrófilos Gr1 cuya acción es la de suprimir la actividad de las células NK y CTL. (Qian and Pollard 2010; Ostrand-Rosenberg y Sinha 2009). El reclutamiento de este tipo de célula conlleva un doble beneficio para el tumor, ya que, por un lado promueven la angiogénesis y progresión tumoral mientras que evaden la destrucción por parte del sistema inmunológico. Este subtipo de células inmunológicas (progenitores mieloides) son una de las principales fuentes de factores de crecimiento estromal, angiogénico y epitelial. Realizan también funciones de remodelación de las enzimas de la matriz extracelular, las cuales son necesarias para la curación de heridas. Es por ello que son un tipo de célula que son reclutadas para apoyar la progresión neoplásica y el desarrollo metastásico. En este sentido cabe destacar que, muy recientemente, se ha descrito en un modelo murino de melanoma como factores liberados por estas células contribuyen a la metástasis. Hasta ahora se pensaba que era la aparición de mutaciones al azar la que contribuía mayoritariamente a la aparición de características en las células tumorales para adquirir el fenotipo invasivo. Es muy posible que la capacidad móvil sea adquirida a través de un proceso de transdiferenciación epitelio mesenquimal (EMT) inducido por la liberación de citocinas específicas por las células mieloides supresoras (MDSC) (Benjamin Toh et al. 2011).

Las células T de la inmunidad adaptativa actuarían fundamentalmente frenando el proceso neoplásico. Se dividen en dos grandes grupos basándose en los receptores (TCR) que expresan: $\gamma\delta$ o $\alpha\beta$. Según las funciones efectoras que tenga las células $\alpha\beta$ T se clasifican en: linfocitos T CD8 citotóxicos (CTLs), linfocito CD4 helper (Th) (incluyen a las Th1, Th2, Th17 y los linfocitos T reguladores (Treg)) y también las células natural killer T (NKT). Éstas últimas pueden ejercer tanto efectos supresores como efectos que favorecen al tumor dependiendo de sus funciones efectoras (DeNardo et al. 2009; Langowski et al. 2007; Smyth et al. 2007). El incremento del número de células T, más concretamente de CTLs y Th1, se correlaciona con un mejor supervivencia en alguno de los cánceres, tales como el cáncer de colon invasivo, melanoma, mieloma múltiple y cáncer de páncreas (Galon et al. 2006; Laghi et al. 2009; Swann y Smyth 2007). Se ha visto que una deficiencia de células T o la interrupción de los mecanismos específicos citotóxicos pueden producir animales experimentales más susceptibles a un tumor espontáneo (Shankaran et al. 2001; Swann y Smyth 2007). Sin embargo también hay evidencias de que muchos de los subconjuntos de células T encontrados en tumores sólidos están involucrados en la promoción, progresión o metástasis, incluido los CTLs (Roberts et al. 2007), las células Th1 productoras de IFN- γ (Hanada et al. 2006), células Th2 (Aspord et al. 2007; DeNardo et al. 2009) y células Th17 (Langowski et al. 2006; Wang et al. 2009). En cáncer de mama, la presencia de una infiltración tumoral mediada por una alta cantidad de linfocitos CD4 + CD8+ y una alta relación Th2/Th1 es indicativo de un mal pronóstico (Kohrt et al. 2005). Las células CD4+ Th2 provocan la progresión y metástasis de las células cancerosas de la mama mediante la estimulación sobre los macrófagos asociados a tumores los cuales producen factores que provocan la progresión y metástasis de las células cancerosas. (DeNardo et al. 2009). En colitis asociado a cáncer (CAC), la infiltración por células T también parece que juega un papel de promoción del tumor (Waldner y Neurath 2009). Similar a los macrófagos asociados a tumores, las funciones de los linfocitos T que promueven el tumor están mediadas por citoquinas, mientras que las funciones antitumorales lo están tanto por citoquinas como por mecanismos citotóxicos de los linfocitos T (Lin and Karin 2007; Swann y Smyth 2007).

Lo que hace que un mismo conjunto de células T tenga funciones antitumorales en un cáncer y faciliten la progresión del tumor en otro cáncer sigue siendo en gran parte

desconocido y puede ser la clave para el desarrollo de inmunoterapias de éxito. Las únicas células que parece que no tienen ningún papel en la progresión del tumor son las células NK.

Las células Treg, que presuntamente actúan en su mayoría como células con actividad que facilitan la progresión tumoral mediante la supresión de la respuesta inmunológica antitumoral (Gallimore y Simon 2008), pueden también ejercer una función antitumoral en determinadas circunstancias en virtud de su capacidad para suprimir la inflamación que provoca la promoción tumoral (Erdman et al. 2005).

5. Inmunogenética de la inflamación: polimorfismos genéticos en citoquinas implicadas en el microambiente tumoral

Como ya hemos visto anteriormente, la producción de citoquinas por parte de las células inmunológicas e inflamatorias promueve el desarrollo tumoral proporcionando a las células malignas de señales de proliferación y de supervivencia en un microambiente inicialmente hostil. En la mayoría de los casos las citoquinas que facilitan el crecimiento tumoral actúan de una manera paracrina, aunque varios tipos de células cancerosas producen sus propias citoquinas, incluyendo IL-6, para lograr el mismo efecto de forma autocrina (Gao et al. 2007). No obstante la producción de citoquinas también puede inhibir el desarrollo tumoral y su progresión, independientemente de donde hayan sido producidas (Lin y Karin 2007). Por ello el perfil de citoquinas y quimioquinas expresadas en el microambiente tumoral puede ser de más relevancia que el tipo de células inmunológicas existente en el microambiente. A través de la activación de factores transcripcionales tales como el NF- κ B, AP-1, STAT y SMAD, además de caspasas y citoquinas, se realiza un control del medio inmunológico e inflamatorio que puede ser desfavorable para el tumor (IL-12, TRAIL, IFN- γ) o potenciar la progresión tumoral (IL-6, IL-17, IL-23) además de tener efectos directos en el crecimiento y supervivencia de las células cancerígenas (TRAIL, FasL, TNF- α , ligandos EGFR, TGF- β , IL-6). Existen fármacos que interfieren en la señalización de estas citoquinas y reducen la tumorigénesis y el crecimiento del cáncer. (Becker et al. 2004; Grivennikov et al. 2009; Hedvat et al. 2009), sirviendo como base de intervenciones preventivas y terapéuticas.

Los estudios de asociaciones basados en poblaciones se han convertido en una poderosas herramientas para analizar aquellos genes con un papel en las enfermedades multifactoriales comunes que tienen un fuerte componente ambiental. Estos estudios de asociación a menudo estiman el riesgo de padecer una determinada enfermedad en los portadores y no portadores de un polimorfismo genético particular. La inmensa mayoría de los estudiados son de un solo nucleótido (SNPs) que se producen con una frecuencia de > 1% en la población normal (en contraste con las "mutaciones" que se producen con una frecuencia de <1%). Se estima que hasta 10 millones de SNP están probablemente presentes en el genoma humano, aunque no todos han sido identificados hasta ahora. La mayoría de ellos no se producen en las secuencias de codificación e, incluso los que lo hacen, no están asociadas con ninguna alteración en la secuencia de aminoácidos y por lo tanto no tiene importancia funcional. Se ha producido un aumento exponencial en el número de estudios de asociación genética publicados, muchos de ellos relacionados con citoquinas, que están implicados en la inflamación y microambiente tumoral. Alguno de estos ejemplos son: estudios sobre polimorfismos en la IL-10 han sido relacionados con el riesgo de padecer cáncer de estómago (Huiping et al. 2012) y con la progresión del cáncer de mama (Fanjun Kong et al. 2010). 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). En el caso del TNF se ha visto una asociación entre el TNF y el carcinoma hepatocelular (Y. Ho et al. 2004) estómago (J.C at al. 2003), mama (S. Mestiri et al. 2001), leucemia crónica linfocítica (Demeter et al. 1997) y linfoma non-Hodgkin's (Warzocha et al. 1998). Los polimorfismos de IL 6 han sido relacionados con cáncer de mama (Margaret et al. 2012). Variaciones en las secuencias de diversos genes de la inflamación (RNASEL, MSR1, TLRs, MIC1, TNF-a, TNF-Rb1, IL1B, IL6, IL8, IL10, IL1RN, VEGF y COX2) han sido extensamente estudiados para la predicción del riesgo de padecer cáncer de próstata (De Marzo et al. 2007; van der Poel HG 2007). En el cáncer renal se han realizado múltiples estudios sobre citoquinas relacionadas con el microambiente tumoral y la inflamación. En el estudio de polimorfismos genéticos realizado por Bilkay Basxturk et al. 2005 en el cáncer renal sobre el TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6, IFN- γ se observó que el genotipado TNF- α -308 G/G y el codón TGF- β 10-25 T/T-G/C pueden ser factores de riesgos potencial para el carcinoma renal mientras que el genotipado TNF- α -308 G/A, IL-6 C/C y TGF- β 10-25 C/C-G/G puede ser un factor de protección frente al cáncer renal. Otro ejemplo es el estudio realizado por Cozar et al.

2007 donde se realizó un estudio genético del CTLA4, IL-4 e IL-10, en el que se observó que el gen de CTLA-4 puede ser un gen candidato para la susceptibilidad del adenocarcinoma renal.

6. Evasión de la respuesta Inmunológica: Inmunoedición

Las células inflamatorias presentes en el infiltrado tumoral, como se ha comentado, bien pueden promover el desarrollo del cáncer, bien interferir activamente en su progresión. Hoy en día está bastante claro, al menos en los tumores establecidos, que predomina la primera condición, no sólo porque el tumor consigue usurpar un proceso normal de inflamación para facilitar su propio crecimiento y progresión (Dunn et al. 2006; Bui et al. 2007; Stewart et al. 2007), sino porque también establece mecanismos para escapar de la acción del sistema inmunológico. Sabemos que el sistema inmunitario, a través de la interacción con el tumor y como consecuencia de la intensa inmuno-vigilancia, esculpe el fenotipo del cáncer y favorece la inmuno-selección de variantes tumorales menos inmunogénicas que, finalmente, facilitan el sobrecrecimiento tumoral. Este complejo papel que desempeña el sistema inmunitario en el cáncer, protegiendo y ayudando al crecimiento y progresión del tumor, ha llevado a introducir un nuevo término que redefine la teoría de la inmuno-vigilancia: la inmuno-edición del cáncer (Dunn et al. 2002)

La definición de inmunoedición en el cáncer viene dada como un mecanismo supresor extrínseco del tumor que se produce solo cuando ha ocurrido la transformación celular y los mecanismos intrínsecos supresores del tumor han fallado. La inmunoedición del cáncer consta de tres fases secuenciales: la eliminación, el equilibrio y, por último, el escape. En la primera fase, la inmunidad innata y adaptativa trabajan juntas para destruir el tumor en desarrollo mucho antes de que se hagan clínicamente evidentes. Muchas de las células y moléculas inmunológicas que participan en la fase de eliminación de la inmunoedición han sido identificadas pero es necesario un mayor trabajo en la comprensión de su secuencia exacta de acción. Si se completa esta fase, el paciente está libre de tener cáncer y la fase de eliminación representa, por tanto, la extensión completa del proceso. Sin embargo, si alguna de las células del cáncer no han sido destruidas en esta fase, entonces se entra en la segunda, en la que mecanismos inmunológicos impedirán su crecimiento. Las células T, la IL-12 e IFN- γ son requeridas para mantener

un estado de latencia funcional a las células tumorales. Es ésta una fase en la que participa la inmunidad adaptativa solamente, ya que se ha visto que no son necesarias ni las células de la inmunidad innata con función efectora, ni las células NK, ni las moléculas que participan en el reconocimiento. La presión ejercida por la inmunovigilancia es suficiente para controlar la progresión tumoral, pero no elimina por completo a estas células malignas. Durante este periodo de equilibrio, aparecen células tumorales con alteraciones o cambios en su fenotipo: 1) ya no son reconocidos por la inmunidad adaptativa (mediante la pérdida de variantes antigénicas o defectos en el procesamiento o presentación de los antígenos), 2) se vuelven insensibles a mecanismos efectores inmunes, 3) inducen un estado de inmunosupresión en el microambiente tumoral. Estas células tumorales pueden entonces entrar en la fase de escape, en la que su extensión ya no está bloqueada por el sistema inmunológico. Las que han surgido son las causantes de la enfermedad clínicamente aparente (Schreiber et al. 2011) (**figura 4**).

6.1. Papel de las moléculas HLA en el mecanismo de evasión tumoral

Como se ha descrito anteriormente, existe una compleja interacción entre el tumor y el sistema inmunitario así como una gran variedad de mecanismos que favorecen el escape tumoral. De entre todos los mecanismos que explican el escape de las células tumorales de la inmunovigilancia y que previamente hemos comentado, las alteraciones en la expresión de moléculas de HLA de clase I quizás sea el que se detecta con una mayor frecuencia y el que tiene una gran repercusión funcional, puesto que modula la susceptibilidad de las células tumorales a las lisis por CTLs y NKs (Garrido et al. 1993).

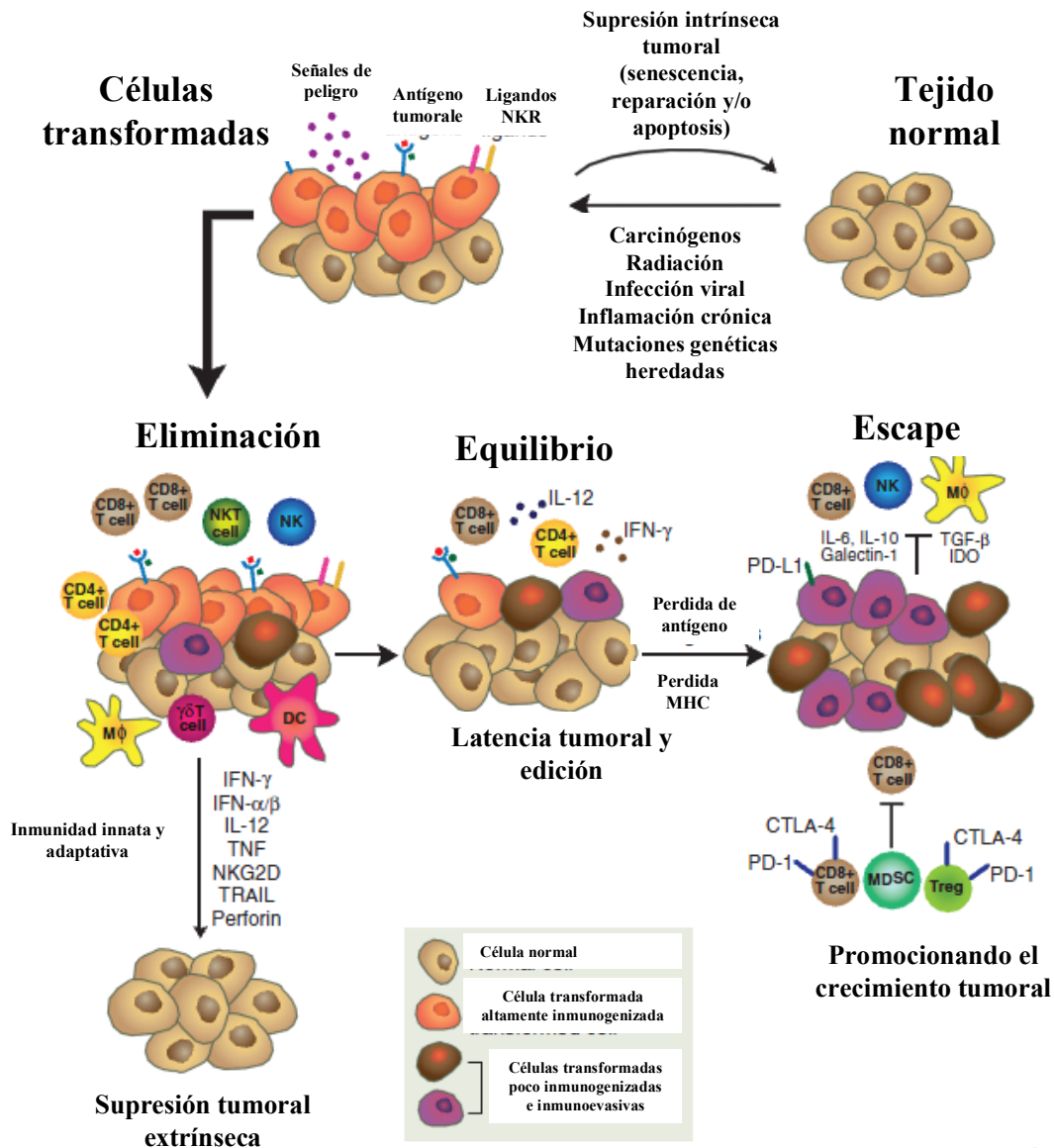


Figura 4: Representa las tres fases de inmunoección. Las células normales sujetas a estímulos oncogénicos se transforman en células tumorales. Desde etapas tempranas de la tumorigénesis las células transformadas expresan señales de “peligro” dando como consecuencia el inicio del proceso de inmunoección. En la primera fase (eliminación) las células de la inmunidad innata y adaptativa pueden eliminar el tumor y proteger frente a su formación. Si el proceso no se desarrolla con éxito las células del tumor pueden entrar en una fase de equilibrio donde las células tumorales se mantienen o son esculpidas. Adaptación de Schreiber RD et al. 2011

Las moléculas MHC de clase I son glicoproteínas de la superficie celular; compuestas por dos subunidades polipeptídicas no asociadas covalentemente (Cresswel et al. 1973), una subunidad está formada por una cadena polimórfica de 45 kDa (cadena pesada o cadena α) y la segunda subunidad por una proteína no polimórfica 12 kDa, llamada β2-microglobulina (β2m). Las moléculas MHC en humanos se llaman HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos), los genes que codifican para la cadena pesada se encuentran

localizados en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos, mientras que el gen de la β_2m es independiente del complejo MHC (HLA) y está localizado en el cromosoma 15.

Existen dos grandes grupos de moléculas MHC: las del MHC de clase I, representado en el hombre por las moléculas HLA-A, -B y -C; y las del MHC de clase II, que incluye las moléculas HLA-DP, -DQ y -DR. Como medio de presentación de antígenos intracelulares, las moléculas HLA de clase I juegan un papel fundamental en el reconocimiento de células tumorales por el sistema inmunológico. HLA de clase I presenta péptidos derivados de proteínas específicas de las células tumorales a los CTLs. El ensamblaje correcto del complejo cadena pesada- B_2m -péptido y su transporte hasta la superficie celular sigue un proceso dependiente de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM), que incluye las subunidades del proteosoma como por ejemplo. LMP2 y LMP7, los transportadores peptídicos TAP1 y TAP2, y un número de chaperonas residentes en el retículo endoplasmático como calnexina, calreticulina, ERp57 y tapasina (Cresswell et al. 1999) (**figura 5**). Cualquier defecto en el proceso de ensamblaje conducirá a una expresión anómala de antígenos de clase I.

Es bien sabido que la mayoría de los tumores derivan de epitelios que expresan HLA de clase I, y que la baja regulación de estas moléculas, se produce con frecuencia como un mecanismo de escape del tumor frente a la vigilancia inmunológica (Garrido et al 1997; Marincola et al 2000). Los mecanismos responsables de este fenómeno son múltiples, produciendo diversos tipos de alteraciones (fenotipos). Estas alteraciones se han agrupado en nuestro laboratorio en 7 fenotipos (Garrido et al 1997; Garrido y Algarra 2001) (**figura 6**). Fenotipo I: pérdida total de moléculas HLA de clase I. Este fenotipo se caracteriza por la ausencia total de expresión en superficie de los antígenos HLA de clase I y ha sido descrita en tumores de diferente histología. Fenotipo II: pérdida de un haplotipo HLA. Los tumores pueden perder parcial o totalmente uno de los dos haplotipos HLA. Fenotipo III: falta de expresión de un locus; HLA A, B, o C.

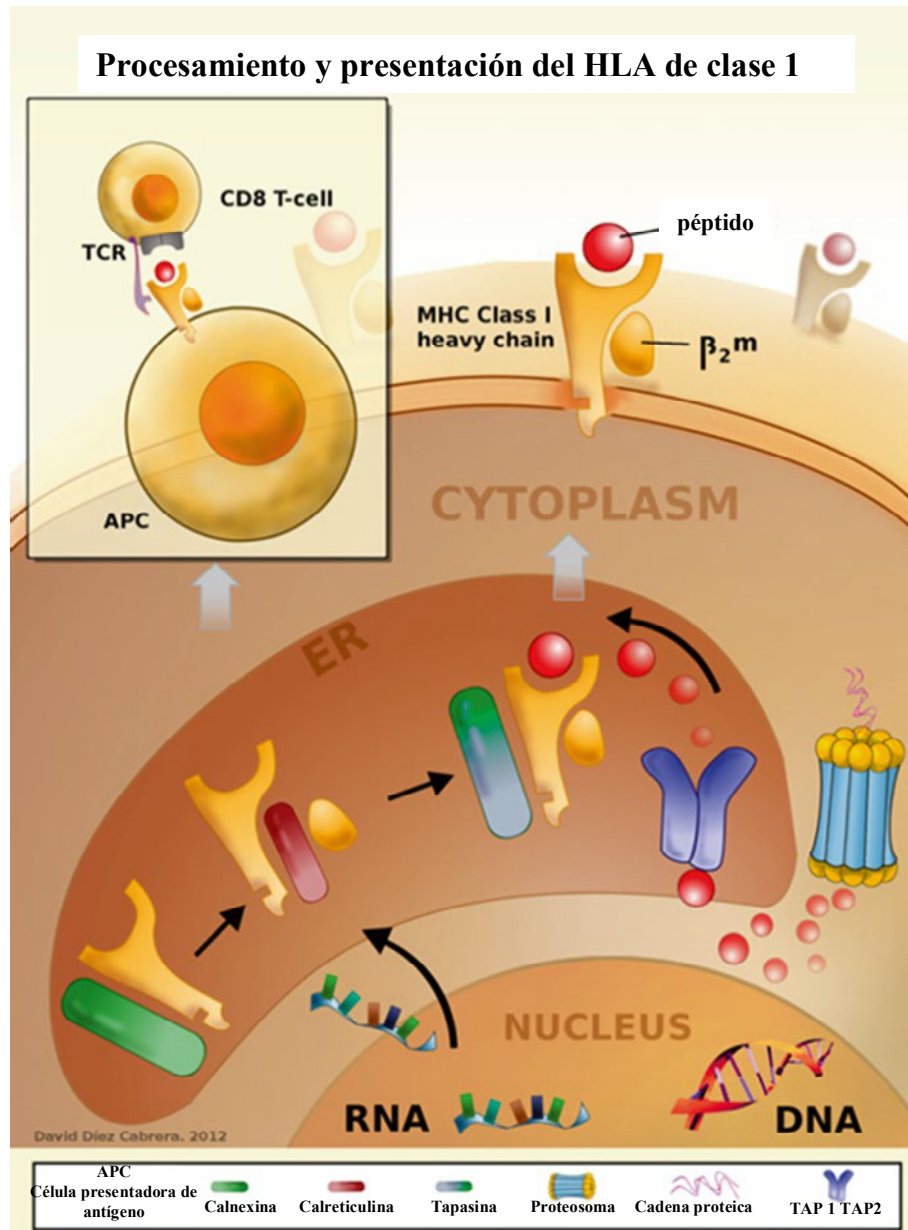


Figura 5: Ensamblaje intracelular de la molécula MHC de clase I y su transporte a la superficie celular. Los antígenos son degradados por el proteosoma formándose los péptidos. Estos péptidos son transportados al retículo endoplasmático (ER) gracias a dos subunidades transportadoras (TAP 1 y TAP 2). En el ER se degradan más los péptidos mediante aminopeptidasas del ER y se unen al complejo cadena pesada/ β_2m gracias a la ayuda de la chaperona Tapasina. El complejo formado, con la ayuda de las chaperonas calnexina, calreticulina, ERp57, es transportado fuera del ER. El complejo estable es transportado vía el sistema de Golgi hasta la superficie celular, donde los péptidos son presentados para su reconocimiento por las células T cd8+ citotóxicas mediante su receptor T (TCR). Adaptación de Aptsiauri N et al. 2013.

Fenotipo IV: pérdidas alélicas. Esta alteración se define como la pérdida de un alelo HLA de clase I. Se necesitan anticuerpos monoclonales (AcMos) frente a alelos HLA individuales para su diagnóstico en tejidos. Fenotipo V: fenotipo mixto. Es el resultado de la combinación de dos alteraciones diferentes, por ejemplo, una pérdida de haplotipo HLA y una falta de expresión del locus HLA B o A (combinación de los fenotipos II y

III). En este caso, el resultado final es una célula tumoral que expresa uno o dos alelos HLA. Fenotipo VI: ausencia de inducción con IFNs. Algunas células tumorales expresan o no antígenos HLA de clase I en condiciones basales, y no responden a ciertos agentes activadores como citoquinas e IFN- α ó γ . Fenotipo VII: falta de expresión de las moléculas clásicas HLA A, B, C y aparición de las moléculas no clásicas HLA E ó HLA G.

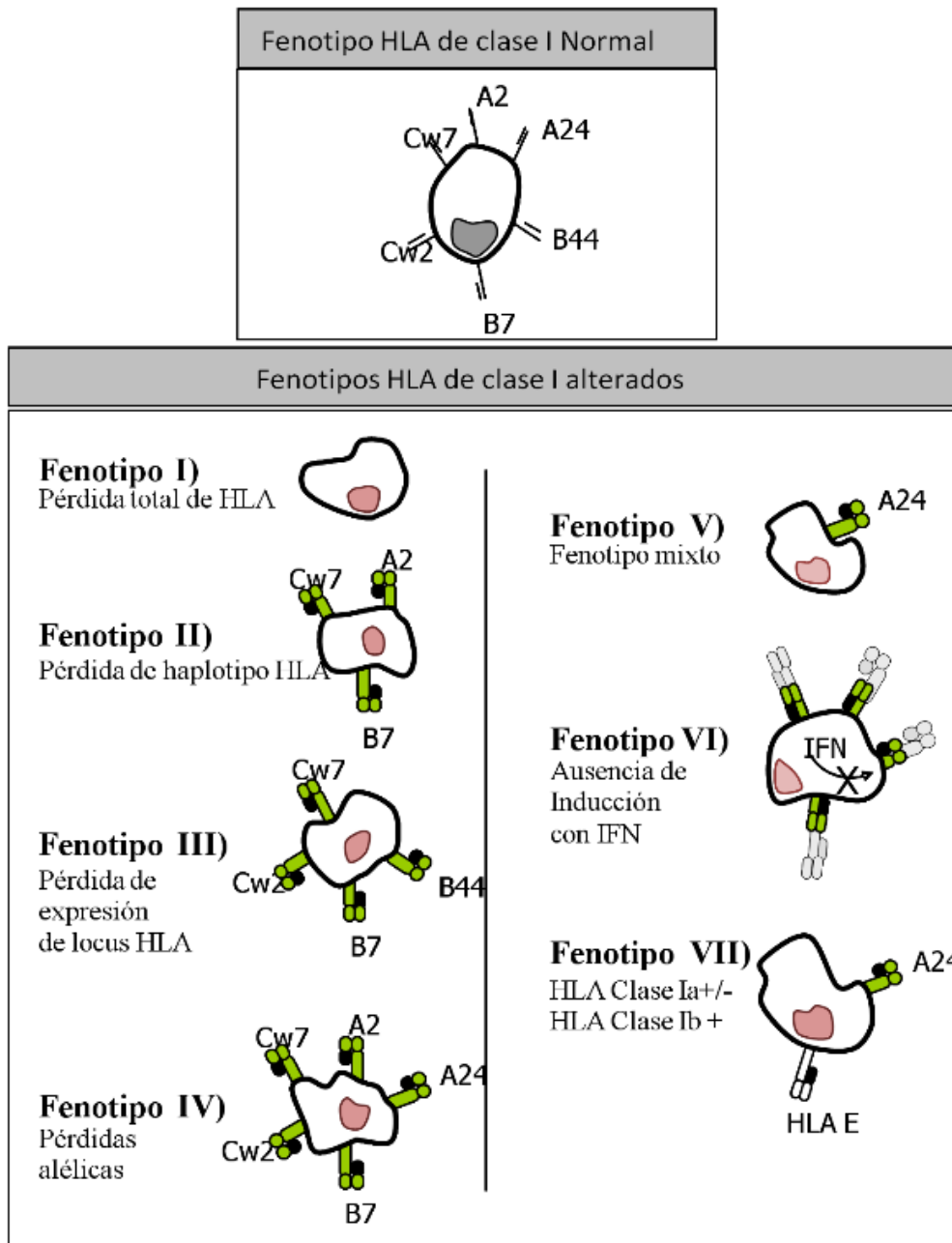


Figura 6: Fenotipos HLA de clase I normales y alterados encontrados en tumores humanos. En las células normales nos encontramos una expresión de 6 alelos de HLA de clase I. los fenotipos I – V se dan cuando Las moléculas HLA están total o parcialmente ausentes en las células tumorales. Las células tumorales pueden no responder a IFN (Fenotipo VI) o pueden expresar moléculas HLA-E aberrantes en células con baja expresión de HLA A, B o C (Fenotipo VII). Adaptación de García-Lora et al. 2003

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La interacción del sistema inmune con el cáncer es muy compleja pudiendo a la vez participar como un elemento protector y promotor del desarrollo neoplásico. Este papel dual del sistema inmune se puede comprender si se contextualiza en función de la etapa del cáncer. Por otra parte, también es conocido que numerosas tipos de cáncer se desarrollan sobre procesos inflamatorios crónicas persistentes. Por último, la inflamación es un proceso multifactorial, que en gran medida está regulado genéticamente.

HIPOTESIS: Si el sistema inmune influye en el desarrollo del cáncer renal, el análisis de las características inmunogenéticas del tumor y de la respuesta inflamatoria intratumoral, podría proporcionar datos que se puedan correlacionar con las características clinicopatológicas del tumor.

OBJETIVOS:

- 1. Investigar el papel de las moléculas HLA en el cáncer renal, su relación con características clinicopatológicas y su impacto en el proceso de escape inmunológico.*
- 2. Investigar el infiltrado inflamatorio en el cáncer renal.*
- 3. Investigar factores genéticos asociados a inflamación y que predispongan o modifiquen el curso del cáncer renal.*

V. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

Higher HLA class I expression in renal cell carcinoma than in autologous normal tissue

P. Sáenz-López¹, C. Gouttefangeas², J. Hennenlotter³, A. Concha⁴, I. Maleno¹, F. Ruiz-Cabello^{1,5}, J. M. Cózar⁶, M. Tallada⁶, A. Stenzl³, H.-G. Rammensee², F. Garrido^{1,5} & T. Cabrera^{1,5}

- 1) Servicio de Análisis Clínico, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain
- 2) Department of Immunology, Institute for Cell Biology, Eberhard-Karls University, Tübingen, Germany
- 3) Clinic for Urology, University Hospital, Tübingen, Germany
- 4) Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain
- 5) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología, Universidad de Granada, Granada, Spain
- 6) Servicio de Urología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain

Tissue Antigens 2009 75, 110–118

Abstract

A total of 93 frozen primary renal cell carcinoma (RCC) samples and 31 frozen samples of corresponding normal renal tissue were analyzed for human leukocyte antigen (HLA) class I and HLA-DR expression. Unexpectedly, HLA class I expression was much higher on RCC cells than on normal renal tubular cells. Immunohistochemistry analysis of frozen and paraffin-embedded tissue samples, applying an extended panel of specific anti-HLA monoclonal antibodies, showed elevated HLA class I antigen expression in 95.6% of the tumors *vs* only 12.9% of normal renal tissues. These findings were confirmed by molecular analysis of HLA heavy chain and β 2-microglobulin (β 2m) transcription levels using quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) on microdissected tissue samples (isolated tumor nests and autologous normal renal tubules) from four patients. These results might help to explain the relatively high success rate of immunotherapy in patients with RCC. The molecular mechanism underlying the increased HLA class I expression in RCC has yet to be elucidated.

Introduction

Human renal cell carcinoma (RCC) represents 3–6% of all adult malignancies (1). The immune system is known to play a major role in the control of malignant cell growth in RCC. RCC responds relatively well to immunotherapy, including treatment with interleukin 2 (IL-2) and/or interferon-alpha 2 (IFN) (2–4). RCCs are a heterogeneous group of tumors with distinct clinical, histopathological, and genetic features (5, 6). The most common histological type of RCC is clear cell carcinoma, which arises from the proximal convoluted tubules (70–80%). The next most common subtype is papillary RCC (10–15%), which arises from the distal convoluted tubules. The remaining 5% of RCCs are described as chromophobe carcinomas that arise from intercalated cells of the renal parenchyma (7, 8).

It is well established that most tumors derive from human leukocyte antigen (HLA) class I positive epithelia and that downregulation of these molecules frequently occurs as a mechanism of tumor escape from immune surveillance (9,10). Multiple mechanisms are responsible for this phenomenon, producing various types of alterations, including total HLA class I loss, HLA class I haplotype loss, downregulation of one of the HLA locus gene products, and selective loss of HLA class I allospecificities (11).

Two recent studies published contradictory results on HLA class I expression in RCC and normal renal tissues. One reported that β 2-microglobulin (β 2m) and HLA class I heavy chain expression levels were similar between primary RCC and normal renal tissue (12), whereas the other group found a higher expression of HLA class I in tumor cells than in normal tubules (13). In both studies, formalin-fixed paraffin-embedded tissue was labeled with monoclonal antibodies against HLA-B and -C free heavy chain (HC-10) and β 2m.

The objective of the present study was to address this controversial issue by using immunohistological analysis, microdissection technique, and quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). The immunohistological analysis was performed on 93 cryopreserved RCC specimens and 31 cryopreserved normal autologous tissues, for which 20 paired tumor/normal formalin-fixed paraffin-embedded samples were also available. Tumor nests and autologous normal renal tubules from four patients were microdissected for molecular analysis of HLA heavy chain and β 2m transcription levels by quantitative real-time PCR.

Material and methods

Samples

We studied 93 frozen primary RCC samples and 31 frozen samples of autologous normal renal tissue obtained by radical nephrectomy. Out of these samples, 73 frozen tumor specimens and 11 frozen autologous normal samples were obtained from Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain. The remaining 20 tumor specimens and 20 normal samples (both frozen and formalin-fixed paraffin-embedded) were provided by the Urology Clinic of Universitat Tubingen, Germany. Among the 93 studied samples, 79 were clear cell type, 9 papillary and 5 chromophobe. Informed consent was obtained from all patients, and the research protocol was approved by the institutional review boards.

Immunohistochemistry

Immunohistological analysis of cryopreserved tissue was performed with the Biotin–Streptavidin System (supersensitive Multilink-HRP/DAB kit, BioGenex, The Hague, The Netherlands). HLA class I expression was studied with the following mAbs: W6/32

(anti-HLA-ABC), GRH1 (anti- β 2m), 1082C5 and TU-155 (anti-HLA-A locus), 42-IB5 (anti-HLA-B locus), and HC-10 (anti-HLA-B and -C free heavy chain). HLA class II expression was analyzed with GRB-1 (anti-HLA-DR) mAb. Immunolabeling was also performed on formalin-fixed paraffin-embedded samples using the streptavidin–biotin peroxidase system with high-temperature pre-treatment for antigen unmasking (14). HLA class I expression was studied with mAbs against HLA-B and -C free heavy chain (HC-10), HLAABC (EMR8-5), and β 2m (Dako, Glostrup, Denmark). Immunoreactivity with the different mAbs was graded in accordance with the recommendations of the 12th IHW (15) as negative (<25% cells stained), heterogeneous (25–75% cells stained), or positive (>75% cells stained).

Laser microdissection

Tissue sections of 5–8 μ m thickness from four tumor specimens and corresponding autologous normal cryopreserved tissues (from four patients) were stained with 0.05% w/v solution of toluidine blue and then microdissected using a laser micromanipulator (PALM Microlaser Systems, Zeiss Bernried, Germany). Microdissected tubules from normal tissue and tumor nests from the tumor samples were collected in PALM Adhesive Caps. These fragments were used for RNA isolation.

RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was extracted using Absolutely RNA Nanoprep Kits (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's recommendations. The extracted RNA was dissolved in 10 μ l elution buffer. cDNA synthesis was performed with the RNA Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI) using 1 ng RNA and following the manufacturer's instructions.

Real-time quantitative PCR

Reverse transcription (RT) products from the four cryopreserved normal and four tumor tissues were analyzed for the expression of HLA class I heavy chain and β 2m target genes by quantitative real-time PCR. The results were expressed as the mean of three independent microdissection experiments. G6PDH was tested as a housekeeping gene to control for variations in the amounts of RNA. All PCRs were performed in a Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using DNA Master HyProbe Kit

(Roche Diagnostics). Commercial kits (Roche Diagnostics and TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) were used for G6PDH and β 2m amplification. Amplification reactions of HLA class I heavy chain was previously described (16). In brief, amplification reactions of HLA class I heavy chains and β 2m were performed in a Light Cycler instrument using DNA Master hyprobe kit (Roche Diagnostics) in a final volume of 5 μ l containing 1 μ l cDNA, 4 mmol/l MgCl₂, and 0.5 μ mol/l of each specific primer, and 1 μ l LC-Fast Start DNA master SYBR green. After 10 min of initial denaturation at 95°C, the cycling conditions consisted of denaturation at 95°C for 6 s, annealing at 58°C for 10 s, elongation at 72°C for 12 s, and reading at 85°C. After amplification, the temperature was slowly raised above the melting point of the PCR product for fluorescence melting curve analysis. mRNA levels for the target genes were calculated according to the calibration curves. All PCR products were checked by melting point analysis and by gel electrophoresis to verify the correct size of the products.

Results

HLA class I expression was higher in RCC than in normal renal tubules HLA class I expression in renal tissues was studied by staining the 93 cryopreserved RCC specimens and 31 autologous normal cryopreserved tissues with specific mAbs against HLA-ABC, β 2m, HLA-A locus, HLA-B locus, and HLA-B and -C free heavy chain, finding that 95.6% of the RCCs were positive for HLA class I. Comparison of HLA class I expression among the different types of renal tumor cells showed that 97.5% of clear cells, 100% of chromophobe cells, and 77.8 % of the papillary tumor cells positively expressed HLA-ABC and β 2m (**Figure 1A, B**). A high percentage of positive immunolabeling for HLA-A and HLA-B loci was also observed in all three types of renal tumor cells, although three cases (two clear cell tumors and one papillary tumor) were negative for both molecules. In addition, one papillary and one chromophobe tumor showed a locus B-specific loss, and two clear cell carcinomas showed a locus A-specific loss. Only 12.9% of the 31 frozen normal tissue samples were positive for HLA-ABC and β 2m in tubular cells (**Figure 2A, B**). Four cases were heterogeneous for HLA class I and negative for loci A and B. The remaining samples were negative except for a few cases with a small number of highly positive distal tubules. The inflammatory cells and endothelial cells were strongly labeled, whereas the glomerular mesangial cells were negative (**Figure 3**).

HLA IN RCC

(A)

RCC SAMPLES (93)	HLA-ABC No. (%)	β 2m No. (%)
Clear cells (79 samples):		
Positive	77 (97.5%)	77 (97.5%)
Negative	2 (2.5%)	2 (2.5%)
Heterogeneous	0	0
Chromophobe (5 samples):		
Positive	5 (100%)	5 (100%)
Negative	0	0
Heterogeneous	0	0
Papillary (9 samples):		
Positive	7 (77.8%)	7 (77.8%)
Negative	1 (11.1%)	1 (11.1%)
Heterogeneous	1 (11.1%)	1 (11.1%)

(B) Frozen RCC tissue

W6/32 positive

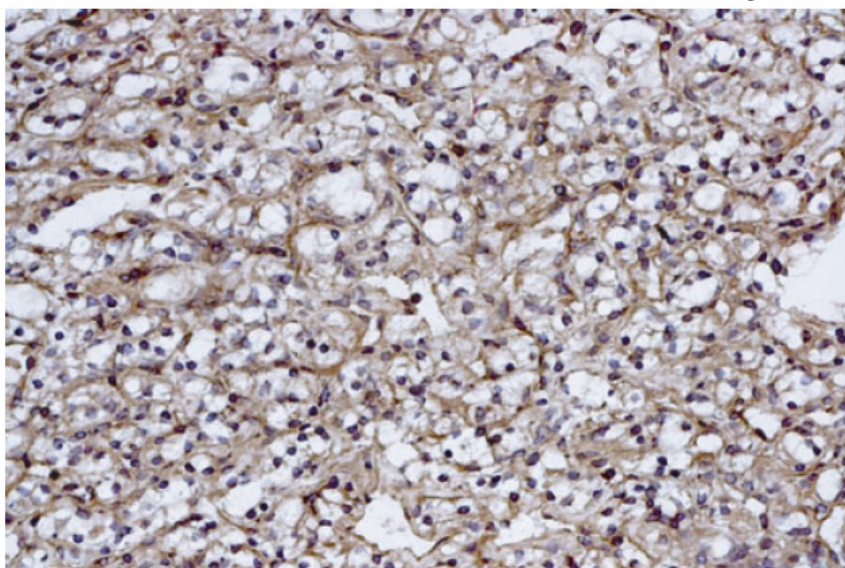


Figure 1: Human leukocyte antigen (HLA) class I expression in renal cell carcinoma (RCC). (A) Results of expression of HLA-ABC and β 2-microglobulin (β 2m) in cryopreserved primary RCC tissue of different subtypes. (B) Immunohistochemical analysis of cryopreserved clear cell RCC tissue shows positive staining at the RCC surface for HLA-ABC using the W6/32 mAb.

HLA IN NORMAL RENAL TUBULES

(A)

NORMAL RENAL TISSUES (31)	HLA-ABC No. (%)	β 2m No. (%)
Positive	4 (12.9%)	4 (12.9%)
Negative	21 (67.7%)	21 (67.7%)
Heterogeneous	6 (19.4%)	6 (19.4%)

(B) Frozen normal renal tissue

W6/32 negative

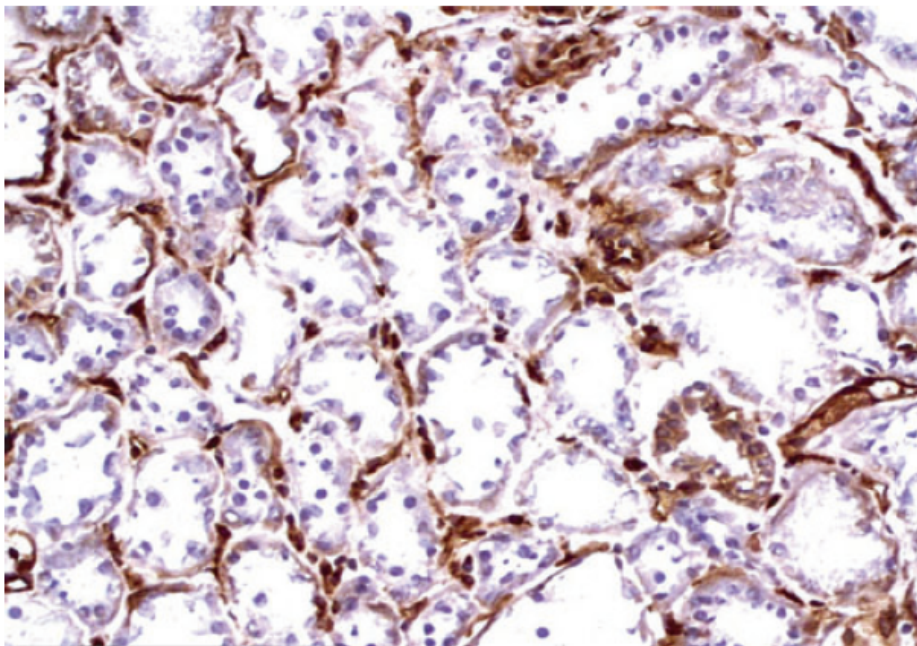


Figure 2: Human leukocyte antigen (HLA) class I expression in renal tubules. (A) Results of expression of HLA class I in cryopreserved normal renal tubules. (B) Immunohistochemical analysis in frozen normal renal tissue shows negative staining for HLA-ABC at the tubular cell surface using the W6/32 mAb.

The 20 RCC specimens obtained from the University of Tübingen showed a similar pattern of tissue immunostaining between the frozen and paraffin-embedded tissue samples (**Figures 3 and 4**).

HLA class II expression was analyzed in cryopreserved RCC (77 cases) and autologous normal tissues (30 cases). Samples were stained with an anti-HLA-DR specific mAb (GRB-1): in the tumor samples, 60% were negative, 24% positive, and 16%

heterogeneous; in normal tissues (tubules), 56.7% were heterogeneous, 10% positive, and 33% negative.

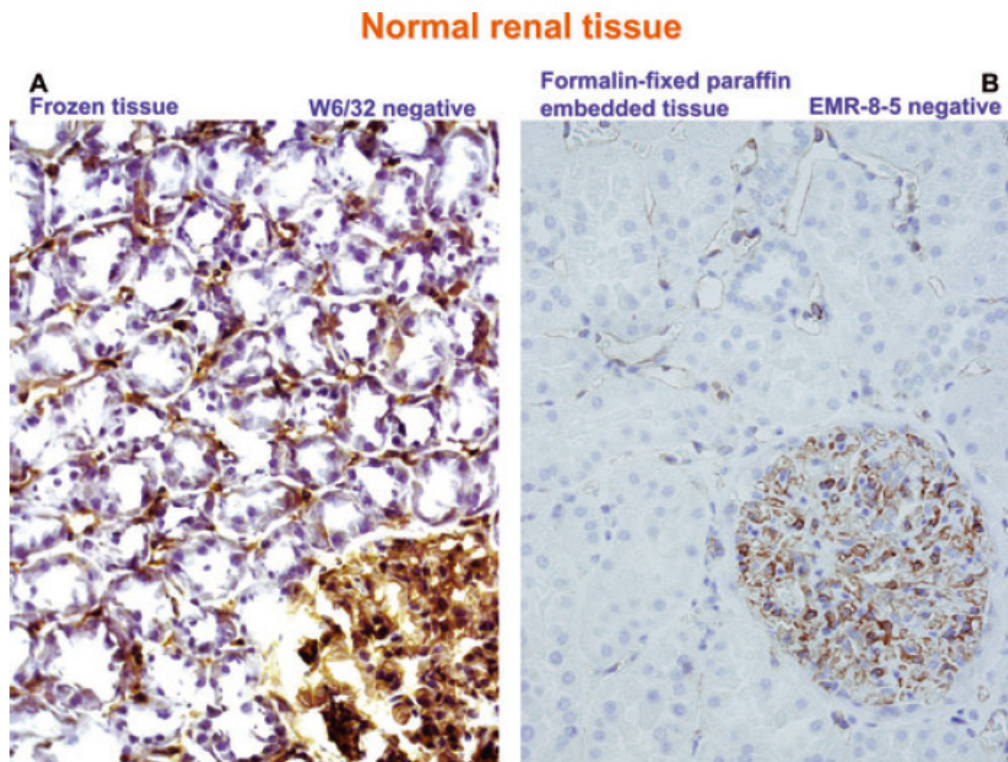


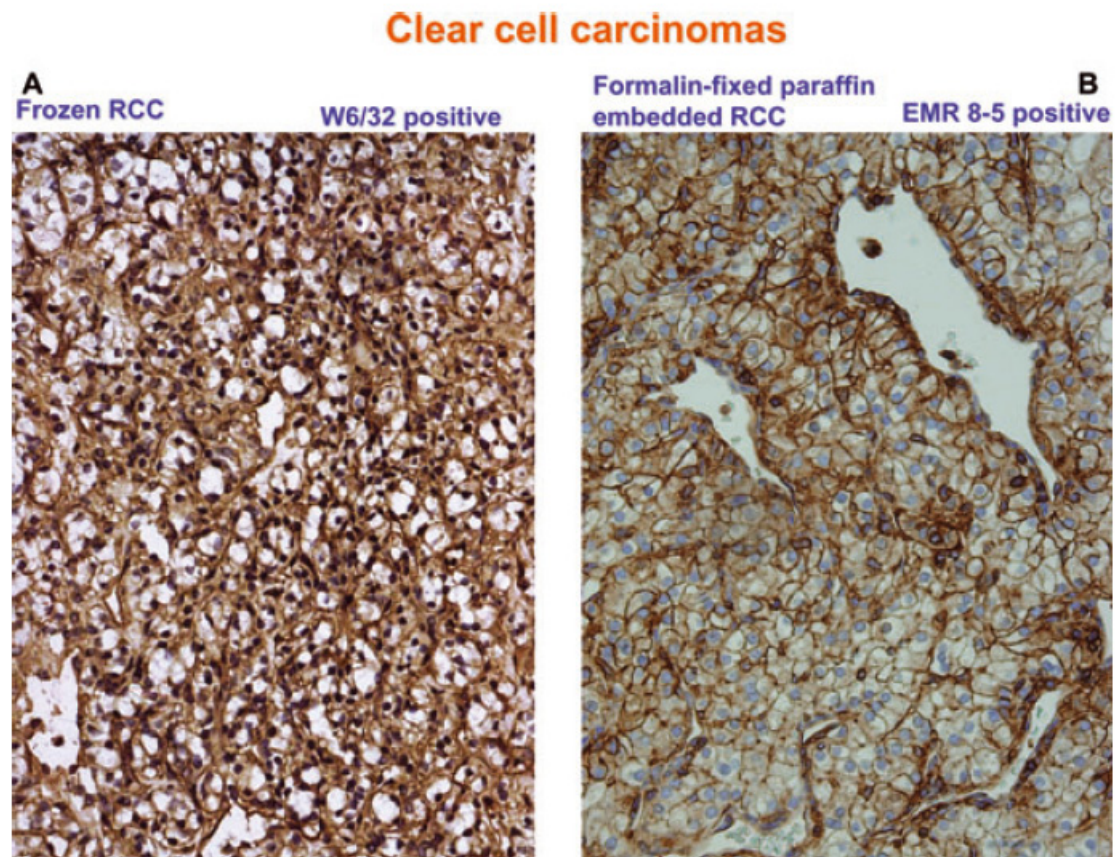
Figure 3: Immunohistological study of cryopreserved normal renal tubules (A) and formalin-fixed paraffin-embedded normal renal tubules (B). Both images show negative staining with monoclonal antibodies that detect human leukocyte antigen (HLA)-ABC (W6/32 on cryopreserved tissue, EMR8-5 on formalin-fixed paraffin-embedded tissue). Endothelial cells of glomerules and stroma were stained.

Quantitative PCR analysis

We confirmed our immunohistochemistry results in RCC and normal tubules by analyzing the HLA class I gene transcription. We determined whether the low or negative expressions in normal tubular tissue were due to a transcriptional downregulation by examining the mRNA expression of heavy chain and β 2m using real-time PCR in microdissected frozen tissue samples from four cases of RCC and their autologous normal tissue. G6PDH was tested as housekeeping gene to control for variations in amounts of RNA.

RNA obtained from tumor nest and tubule normal cells by laser microdissection was reverse transcribed to cDNA and analyzed for heavy chain and β 2m levels. **Figure 5** shows the results using pairs of consensus primers for HLA-ABC and β 2m. qRT-PCR of this cDNA showed higher levels of HLAABC and β 2m mRNA in tumor tissue than in

tubular cells. Furthermore, in three of the four RCC cases (cases 11, 58, and 147), HLA-ABC and β 2m mRNA levels were fourfold higher than in their corresponding normal tubules (**Figure 5**).



Discussion

Downregulation or absence of MHC class I molecules has been observed in various human tumor types (9, 17). Multiple mechanisms can be implicated in the total loss or downregulation of MHC class I genes, including β 2m mutation, selective loss of heavy chain or a locus, total downregulation at a transcriptional level (18–21). Decreased or absence of HLA class I expression has been associated with invasive and metastatic lesions, and is probably associated with tumor immune escape during cancer progression (16). However, the present study shows a significant upregulation of HLA class I expression in RCCs in comparison to normal renal tissue.

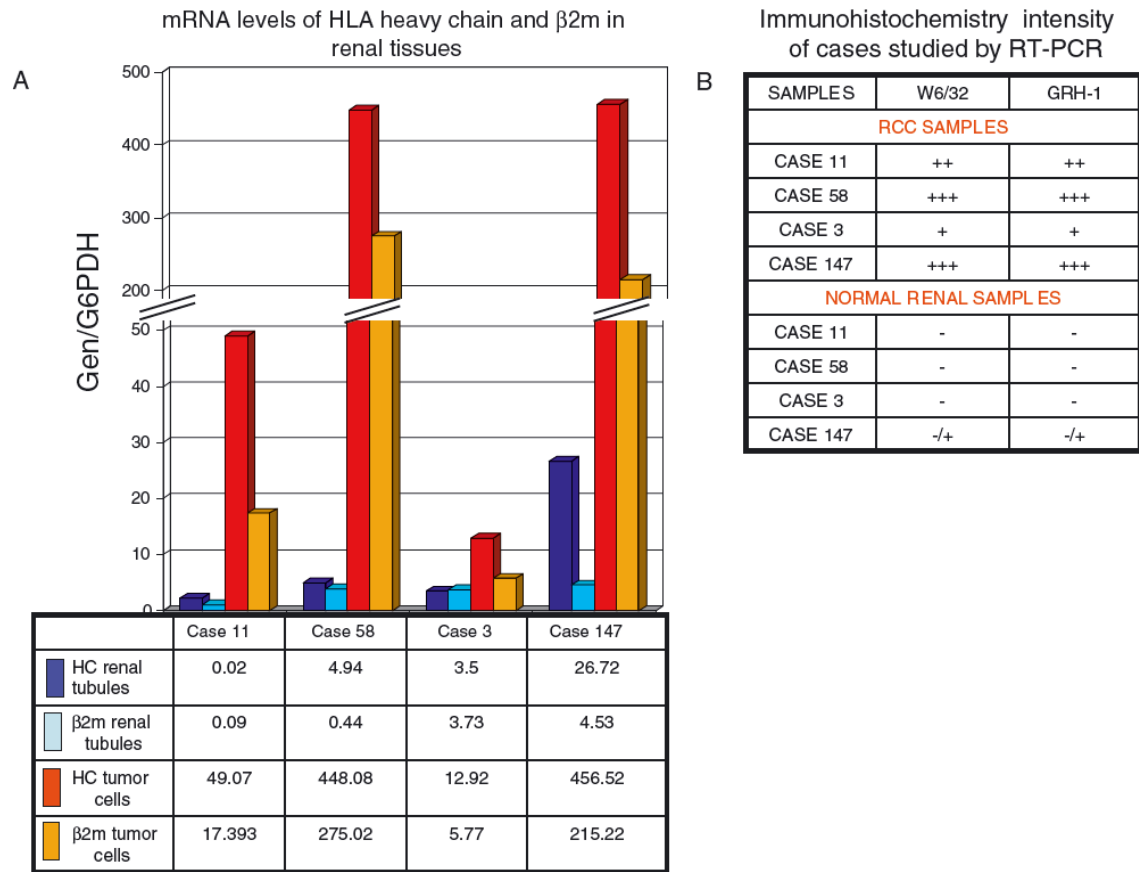


Figure 5 (A) Results of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. Median values of heavy chain (HLA-HC) and β 2-microglobulin (β 2m) mRNA copy numbers normalized against G6PDH in tumor and normal cells. Expression of human leukocyte antigen (HLA)-HC and β 2m is higher in the tumor nest than in tubular cells of the normal kidney tissue. (B) Table shows that cell surface intensity of staining of the HLA-ABC and β 2m is higher in tumor cells than in normal cells from the same patient.

Immunohistochemistry analysis showed a strong positive pattern of expression of HLA class I antigens in 95.6% of RCC samples, whereas positive expression was detected in only 12.9% of normal tissue samples. Real-time quantitative PCR analysis in microdissected samples confirmed that the absence of expression in tubular cells was due to a significant reduction in the mRNA levels.

Most normal tissues are known to express HLA class I, although some are only weakly positive, including skeletal smooth muscle, hepatocytes, and pancreatic cells (22, 23). Several studies have been published on HLA class I expression in normal renal tissue, reporting different levels of expression (12, 13, 22, 23). Daar et al. (22) used indirect immunofluorescence techniques on frozen sections and observed positive HLA class I expression in normal tubules. In studies of paraffin-embedded normal and tumor tissues, Ibrahim et al. (13) reported that HLA class I expression was more evident in all RCC

subtypes than in normal adjacent tubular cells, whereas Atkin et al. (12) show a similar intensity of staining with HC-10 and anti- β 2m antibodies between primary RCCs and normal kidney specimens.

In both studies, the authors used only anti- β 2m antibody and the HC-10 antibody, which recognizes free intracytoplasmic HLA-BC heavy chains but does not detect the cell surface expression of HLA class I molecules. In a study using the EMR8-5 mAb in paraffin-embedded tissues, a 37.5% downregulation of HLA class I expression was reported in tumor cells (24).

The present study provides new more complete data using both paraffin tissue and frozen samples with a wide panel of monoclonal antibodies (Material and methods). All of our RCC samples except for two (one clear cell and one papillary type) showed positive HLA class I expression (Figure 1A) The higher HLA class I expression in tumor than in autologous normal tissues was confirmed by quantitative PCR analysis of microdissected samples obtained from four patients with RCC.

Although the mechanism of HLA class I upregulation in RCC is unclear, we consider that the production and local secretion of proinflammatory cytokines by infiltrating cells may be involved. We previously reported that the expression of HLA heavy chain and β 2m was associated with the expression of proinflammatory chemokines and cytokines, finding low or undetectable cytokine levels in normal and advanced RCC tumors with low HLA class I expression (25).

Total or selective HLA class I loss has been observed in practically all types of cancer. HLA class I total downregulation has been found in 90% of cervical carcinomas (26), 73% of colorectal carcinomas (27), 88% of breast carcinomas (28), 51% of melanomas (29), and 66% of laryngeal carcinomas (30). In addition, HLA haplotype loss was reported in 48% of head and neck squamous cell carcinomas (31), 50% of cervix carcinomas (32), 49% of laryngeal carcinomas (33), and 40% of colorectal carcinomas (34).

Unlike in most tumor types, RCC showed a low frequency of HLA class I alterations and higher levels of HLA class I expression in comparison with the normal tissue. Likewise, haplotype loss is also rarely observed in RCC (35). We previously identified

numerous HLA class I and class II binding peptides in fresh RCC samples, indirectly indicating the expression of MHC molecules by renal tumors (36, 37).

HLA class I downregulation in various types of tumor is associated with a deregulation of HLA class I antigen processing machinery (APM) components (38, 39). Defects in the expression of LMP and TAP subunits have been previously described in RCC (12, 40). In our study, we observed an upregulation of the HLA class I expression. One can speculate that there is a possible correlation between high HLA class I level and increased APM expression in RCC tumors, but we have not analyzed it in our study.

HLA class I loss has been associated with cancer progression and may constitute a major tumor immune escape mechanism (9, 16, 41). Furthermore, HLA class I downregulation appears to limit the successful outcome of T-cell-based immunotherapy in cancer, whereas upregulation increases the immunogenicity of tumor cells and their recognition by cytotoxic T. It is possible that the relative success of immunotherapy in RCC (42, 43) is attributable to the low frequency of alterations in HLA class I expression. Several factors might contribute to the failure of immunotherapy in many RCC patients (44). Thus, lack of expression of costimulatory molecules (ligands for T-cell activation) can induce tolerance to neoplastic cells. Tumor cells also produce immune suppressive factors [vascular endothelial growth factor (VEGF) (45), transforming growth factor- β (TGF- β), interleukin 10 (IL-10), and prostaglandin E2 (PGE2) (46)], which have systemic effects on immune cell function. Finally, alterations in the differentiation, maturation, migration, and function of dendritic cells are of special importance in immune control failure, because they are the most potent antigen-presenting cells (APCs) of the immune system, interacting with T-cells to induce and modulate immune responses (44). Hence, the type of inflammation within the tumor microenvironment can either inhibit or promote tumor development and growth. We recently described genetic polymorphisms in IL10 and IL18 that are associated with tumor growth and invasion in RCC (47 and unpublished results).

In conclusion, the high HLA class I expression in RCC sets it apart from most types of cancer. First, the malignant transformation of renal tissue produces a significant upregulation of HLA class I expression. Second, HLA class I alterations are rare events in renal carcinogenesis and are probably not a key factor in immune evasion.

Acknowledgments

The authors would like to thank Ms Ana Isabel Rodriguez and Maria Dolores Galvez for technical assistance. This work was partially supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Red Genómica del Cancer (RETICRD 06/020), Consejería de Salud, Junta de Andalucía, and by the Plan Andaluz de Investigación (PAI) in Spain, and from the European Network for the identification and validation of antigens and biomarkers in cancer and their application in clinical tumor immunology (ENACT) project (European Community LSHC-CT-2004-503306), the Cancer Immunotherapy project (European Community OJ 2004/c158,18234), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft, SFB685/B4 and /C5.

References

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics 1999. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 8–31.
2. Atzpodien J, Buer J, Sel S, Janssen J, Oevermann K. Chemoimmunotherapy in the systemic treatment of advanced renal carcinoma. *Urologe A* 1999; 38: 474–8.
3. Figlin RA. Renal cell carcinoma: management of advanced, disease. *J Urol* 1999; 161: 381–6.
4. Cozar JM, Tallada M, Espejo E, Vicente J. Estado actual de la inmunoterapia en el cáncer renal diseminado. *Rev Urol* 2002;3: 62–72.
5. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol* 1997; 183: 131–3.
6. Reuter VE, Presti JC Jr. Contemporary approach to the classification of renal epithelial tumors. *Semin Oncol* 2000; 27: 124–37.
7. Zambrano NR, Lubensky IA, Merino MJ, Linehan WM, Walther MM. Histopathology and molecular genetics of renal tumors toward unification of a classification system. *J Urol* 1999; 162: 1246–58.
8. Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ. Human chromophobe cell renal carcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1985; 48: 207–17.
9. 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.
10. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumours from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000; 74: 181–263.
11. Aptsiauri N, Cabrera T, Garcia-Lora A, Lopez-Nevot MA, Ruiz-Cabello F, Garrido F. MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells. *Int Rev Cytol* 2007; 256: 139–89.
12. Atkins D, Ferrone S, Schmahl GE, Störkel S, Seliger B. Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol* 2004; 171: 885–9.
13. Ibrahim EC, Allory Y, Commo F, Gattegno B, Callard P, Paul P. Altered pattern of major histocompatibility complex expression in renal carcinoma: tumor-specific expression of the nonclassical human leukocyte antigen-G molecule is restricted to clear cell carcinoma while up-regulation of other major histocompatibility complex antigens is primarily distributed in all subtypes of renal carcinoma. *Am J Pathol* 2003; 162: 501–8.
14. Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME et al. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 908–18.
15. Garrido F, Cabrera T, Accolla RS et al. HLA and cancer: 12th International Histocompatibility Workshop study. In: Charron D, ed. HLA, Genetic Diversity of HLA. Functional and Medical Implications, EDK: Paris, France, Vol. I. 1997, 445–52.
16. Cabrera T, Lara E, Romero JM et al. HLA class I expression in metastatic melanoma correlates with tumor development during autologous vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 709–17.

17. Garrido F, Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 2001; 83: 117–58.
18. D'Urso CM, Wang ZG, Cao Y, Tataka R, Zeff RA, Ferrone S. Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J Clin Invest* 1991; 87: 284–92.
19. Benitez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA 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.
20. P´erez B, Benitez R, Fern´andez MA et al. A new beta 2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens* 1999; 53: 569–72.
21. Brady CS, Bartholomew JS, Burt DJ et al. Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens* 2000; 55: 401–11.
22. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ. The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation* 1984; 38: 287–92.
23. Singer DS, Maguire JE. Regulation of the expression of class I MHC genes. *Crit Rev Immunol* 1990; 10: 235–57.
24. Kitamura H, Honma I, Torigoe T, Asanuma H, Sato N, Tsukamoto T. Down-regulation of HLA class I antigen is an independent prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 2007; 177: 1269–72.
25. Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F et al. Analysis of the expression of HLA class I, proinflammatory cytokines and chemokines in primary tumors from patients with localized and metastatic renal cell carcinoma. *Tissue Antigens* 2006; 68: 303–10.
26. Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M et al. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br J Cancer* 1995; 72: 405–11.
27. Cabrera T, Collado A, Fernandez MA et al. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* 1998; 52: 114–23.
28. 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.
29. Kageshita T, Ishihara T, Campoli M, Ferrone S. Selective monomorphic and polymorphic HLA class I antigenic determinant loss in surgically removed melanoma lesions. *Tissue Antigens* 2005; 65: 419–28.
30. Cabrera T, Salinero J, Fernandez MA, Garrido A, Esquivias J, Garrido F. High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas. *Hum Immunol* 2000; 61: 499–506.
31. Feenstra M, Verdaasdonk M, van der Zwan AW, de Weger R, Slootweg P, Tilanus M. Microsatellite analysis of microdissected tumor cells and 6p high density microsatellite analysis in head and neck squamous cell carcinomas with down-regulated human leukocyte antigen class I expression. *Lab Invest* 2000; 80: 405–14.
32. Koopman LA, Corver WE, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 2000; 191: 961–76.
33. Maleno I, L´opez-Nevot MA, Cabrera T, Salinero J, Garrido F. Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 389.
34. Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T et al. Distribution of HLA class I phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 2004; 56: 244–53.
35. 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.
36. Kruger T, Schoor O, Lemmel C et al. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 826–36.
37. Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C et al. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4163–70.
38. Ferrone S, Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 1995; 16: 487–94.
39. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms. *Adv Immunol* 2000; 74: 181–273.
40. 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.
41. Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 690: 42–9.

42. Yagoda A, Abi-rached B, Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983–1993. *Semin Oncol* 1995; 22: 42–60.
43. Bleumer I, Oosterwijk E, de Mulder P, Mulders PF. Immunotherapy for renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2003; 44: 65–75.
44. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 263–74.
45. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249–57.
46. Sombroek CC, Stam AG, Masterson AJ, Lougheed SM, Schakel MJ, Meijer CJ et al. Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2002; 168: 4333–43.
47. Romero JM, Saenz-Lopez P, Cozar JM et al. A polymorphism in the interleukin-10 promoter affects the course of disease in patients with clear-cell renal carcinoma. *Hum Immunol* 2009; 70: 60–4. 118

**Estudio de expresión de HLA en tumor primario
y metástasis en pacientes con carcinoma renal
tratados con inmunoterapia.**

El objetivo de este estudio era comprobar si la progresión del cáncer renal en pacientes sometidos a inmunoterapia transcurre a través de la selección de clonas débilmente inmunogénicas tras la inmuno-intervención. Como antecedentes de este estudio, nuestro grupo había revelado que se producen alteraciones significativas y selección de clonas celulares con ausencia total o parcial de moléculas HLA en pacientes sometidos a distintos regímenes de inmunoterapia (Benítez et al; 1998, Carretero et al. 2011). También en modelos experimentales de ratones inmunodeficientes el fenotipo del tumor refleja probablemente la activación del sistema inmunitario y la inmunoselección (García-Lora et al; 2003).

Material y Métodos

Pacientes

Se ha realizado un estudio de expresión de HLA en seis pacientes tratados con inmunoterapia. Tres pacientes recibieron IL2/INF- α (las muestras procedían del del Servicio de Urología del Hospital Universitario Virgen de las nieves) y los otros tres fueron sometidos a inmunoterapia específica con péptidos (las muestras provenían del Laboratorio del Dr. G. Rammensee (Department of Immunology, Institute for Cell Biology, Eberhard-Karls-University, Tübingen, Alemania)) (**figura 1 y 2 respectivamente**).

Pacientes tratados con inmunoterapia IL2/INF- α

El paciente 1 tenía un tumor renal de células claras, al que se le practicó nefrectomía radical en el 2000. En diciembre de 2003 se le extirpo una recidiva local y se le trato con inmunoterapia con IL2/INF- α , en diciembre del 2004 se extirpo una metástasis hepática. Posteriormente el paciente falleció.

Al paciente 2 se le realizo una nefrectomía radical del riñón izquierdo en febrero del 2000, diagnosticado de carcinoma renal de células claras y fue sometido a inmunoterapia adyuvante con IL2/INF- α . En abril del 2001 se le detecto una metástasis ganglionar, que fue extirpada. Posteriormente recibió tratamiento adyuvante con inmunoterapia y quimioterapia. No hay recogidos datos de este paciente hasta la actualidad

Al paciente 3 se le realizo una nefrectomía radical en agosto del 2003, también diagnosticado de adenocarcinoma renal de células claras. Se le trato con inmunoterapia y en septiembre del 2004 se le detecto una metástasis pulmonar que fue extirpada, por lo que fue sometido a un nuevo tratamiento con inmunoterapia. Posteriormente el paciente falleció.

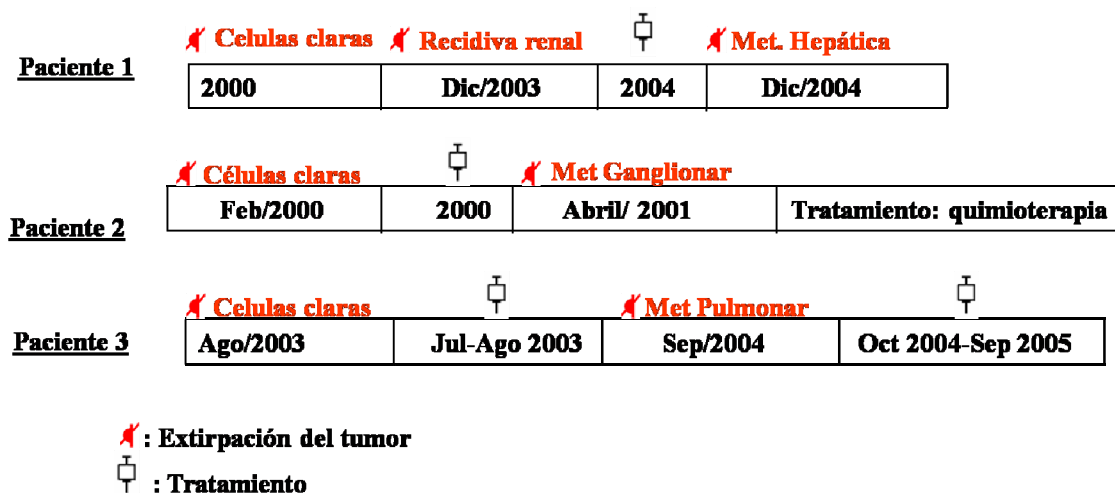


Figura 1: Pacientes tratados con IL2/IFN. Los tres pacientes tuvieron un tumor renal de células claras que les fue extirpado por nefrectomía radical. El paciente numero uno antes del tratamiento tuvo una recidiva. Después del tratamiento los tres pacientes tuvieron metástasis. Dos de ellos en la actualidad fallecieron y uno se desconoce su estado.

Pacientes tratados con inmunoterapia con péptidos

Al paciente 1 se le realizo una nefrectomía radical a causa de un tumor renal de células claras en julio del 2005. Entre agosto y octubre de ese mismo año se le suministro 8 inyecciones de péptidos. En mayo del 2007 se le extirpo una metástasis muscular y en marzo del 2008 una metástasis de hueso. Falleció en noviembre del 2011.

Al paciente 2 se le detectó y se le extirpo en octubre del 2005 un tumor renal de células claras. Se le aplicó un tratamiento de inmunoterapia con péptidos durante un año (enero 2006- enero 2007) y en abril del 2007 se le detectó y extirpó una metástasis pulmonar. En marzo del 2008 se extirpó una recidiva contralateral renal. A febrero del 2013 el paciente seguía vivo.

Al paciente 3 se le detectó un tumor renal reseado mediante nefrectomía radical en octubre del 2005. Se le administró inmunoterapia con péptidos en los primeros meses del

2006 detectándose una recidiva local en un nódulo linfático en noviembre del 2006. A marzo del 2013 el paciente seguía vivo.

Paciente 1:	★ Células claras	☐	★ Met muscular	★ Met.de hueso
	Jul /2005	Ago - Oct 2005	May/2007	Mar/2008
Paciente 2:	★ Células claras	☐	★ Met. pulmonar	★ Recidiva renal
	Oct/2005	Ene/2006-Ene/2007	Abr/2007	Mar/2008
Paciente 3:	★ Células claras	☐	★ Recidiva renal	
	Oct/2005	Ene/ 2006-Abr/06	Nov2006	

★ : Extirpación del tumor
☐ : Tratamiento

Figura 2: Pacientes tratados con una **terapia con péptidos**. Los tres pacientes tuvieron un tumor renal de células claras que les fue extirpado por nefrectomía radical. Posterior a la terapia, los tres pacientes desarrollaron metástasis. El paciente numero 1 falleció en noviembre del 2011, el paciente 2 en febrero del 2013 seguía vivo y el paciente 3 en marzo de 2013 también seguía vivo.

Material

En el grupo de pacientes tratados con inmunoterapia IL2/IFN- α , hemos estudiado muestras en parafina de todos los tumores extirpados. Del paciente uno, las muestras del tumor renal, la recidiva local y la metástasis hepática. Del paciente dos, la muestra tumoral renal, la metástasis ganglionar y del paciente tres, la muestra del tumor renal y la metástasis pulmonar.

En el grupo de pacientes tratados con inmunoterapia con péptidos hemos estudiado en el paciente uno el tumor primario, tejido normal y las metástasis muscular y de hueso, del paciente dos su tumor renal, su tejido normal autólogo, la metástasis pulmonar y su tejido normal pulmonar, y la recidiva tumoral renal. Del paciente tres estudiamos su tumor primario renal su tejido normal autólogo y la recidiva. Todos los tejidos de los tres pacientes fueron estudiadas a partir de sus muestras en parafina.

Inmunohistoquímica

Se realizo la inmunohistoquímica de todas las muestras en parafina utilizando el sistema de streptavidin-biotin peroxidasa con un pretratamiento de desenmascaramiento antigénico. La expresión de HLA de clase I fue estudiada con anticuerpos monoclonales frente a la cadena pesada HLA-BC intracitoplasmática (HC-10, hibridoma cedido por

HL. Ploegh), HLA-ABC intracitoplasmática (EMR8-5) (MBL Naka-ku Nagoya Japon), y β 2m (L-368) (Dako, Glostrup, Denmark). La inmunoreactividad con los diferentes anticuerpos monoclonales fue analizada en concordancia con las recomendaciones del 12th IHW (12th International Histocompatibility Workshop study). La valoración se realiza de la siguiente forma: negativo cuando en el tejido hay menos del 25% de las células que han sido marcadas por el anticuerpo, heterogéneo si la positividad está entre un 25%-75% y finalmente positivo cuando más del 75% de las células están marcadas con el anticuerpo.

Resultados

Tratamiento con inmunoterapia IL2/IFN- α

En la **tabla 1** se muestran los resultados que se han obtenido en la inmunohistoquímica realizada en estos tres pacientes. La expresión de HLA de clase I en el paciente 1 fue positiva para el tumor primario, la recidiva local y la metástasis hepática. Se observó un aumento en la intensidad de la positividad y por consiguiente en la expresión de HLA de clase I en la recidiva local y la metástasis frente al tumor primario. En el paciente 2, se observó una positividad en la expresión de HLA de clase I tanto en el tumor primario y su metástasis ganglionar. No existió una diferencia significativa en su intensidad. El paciente 3 tenía un patrón positivo en la expresión de HLA de clase I en el tumor renal y su metástasis pulmonar (**figura 3**).

Tratamiento con inmunoterapia de péptidos

En la **tabla 2** se reflejan los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica. En el paciente 1, la expresión de HLA de clase I del tejido normal renal fue negativa con algún túbulo distal positivo, mientras que el tejido tumoral renal dio claramente positivo. Tanto el tejido metastático muscular y como el de hueso dieron una positividad con una intensidad similar al tejido tumoral primario.

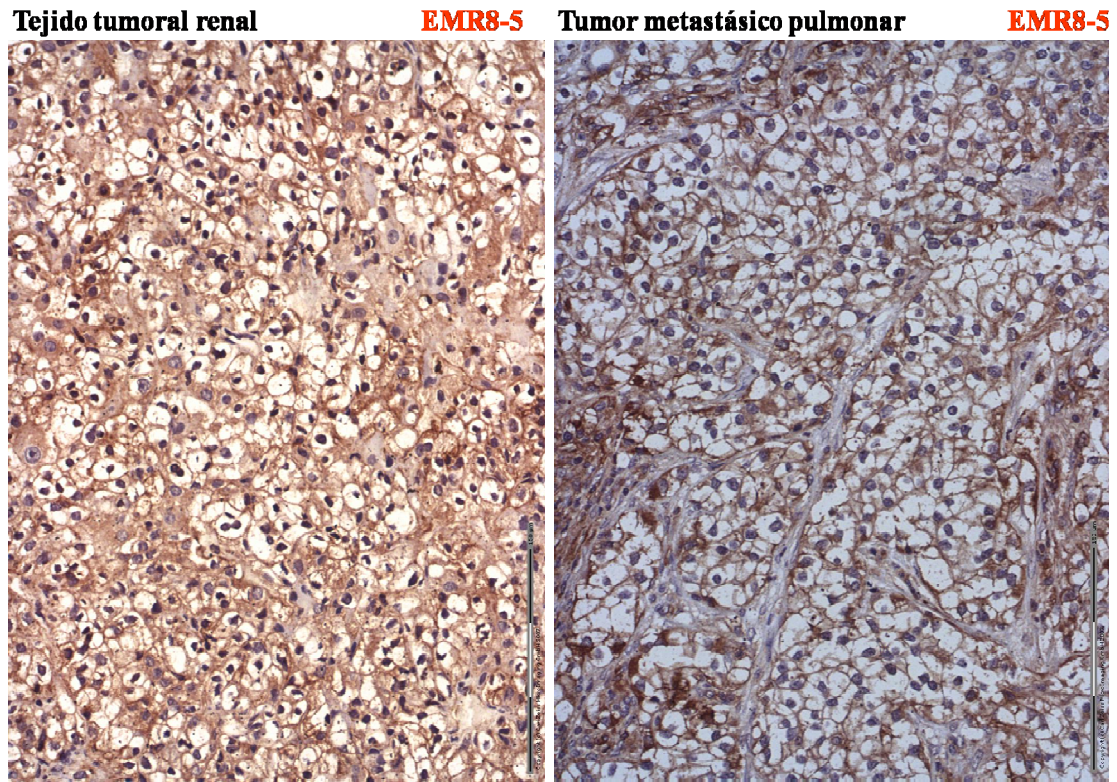


Figura 3: Análisis inmunohistoquímico del tejido tumoral renal y su metástasis pulmonar en el paciente 3, utilizando el anticuerpo monoclonal EMR8-5 que detecta la cadena pesada intracitoplasmática.

Paciente	EMR8-5 (HLA-ABC intracitoplasmático)	L-368 (β2microglobulina)	HC-10 (HLA-BC intracitoplasmático)
Paciente 1			
Tumor primario	Positivo +	Positivo +	Positivo +
Recidiva local	Positivo +++	Positivo +++	Positivo ++
Metástasis hepática	Positivo ++	Positivo ++	Positivo +
Paciente 2			
Tumor primario	Positivo ++	Positivo +	Positivo +
Metástasis Ganglionar	Positivo ++	Positivo ++	Positivo +
Paciente 3			
Tumor primario	Positivo +++	Positivo +++	Positivo ++
Metástasis pulmonar	Positivo +++	Positivo +++	Positivo ++

Tabla 1: nos muestras los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica para la expresión de HLA de clase I realizada con los tres anticuerpos (EMR8-5, L-368 y HC-10) de los tres pacientes tratados con inmunoterapia de IL-2 e IFN-α. Las cruces (+) nos indica la intensidad del marcaje del anticuerpo, cuyo baremo va de una a tres cruces.

La expresión de HLA de clase I en el tejido tumoral renal del paciente 2 fue claramente positiva frente al patrón de negatividad en gran parte del tejido autólogo normal (con la excepción de algunos túbulos distales que fueron positivos). Tanto el tejido metastático pulmonar como su tejido normal fueron positivos para la expresión de HLA de clase I. La intensidad de expresión fue similar en la recidiva tumoral renal y en el tumor primario (**figura 4**). Se ha observado en el paciente 3, que tanto el tejido renal normal, tumoral y la recidiva son positivos en su expresión de HLA de clase I.

Paciente	EMR8-5 (HLA-ABC intracitoplasmático)	L-368 (β 2microglobulina)	HC-10 (HLA-BC intracitoplasmático)
Paciente 1			
Tumor renal primario	Positivo +++	Positivo +++	Positivo +++
Tejido normal renal	Negativo	Negativo	Negativo
Metástasis muscular	Positivo +++	Positivo +++	Positivo +++
Metástasis ósea	Positivo +++	Positivo +++	Positivo +++
Paciente 2			
Tumor renal primario	Positivo +++	Positivo +++	Positivo ++
Tejido normal renal	Negativo	Negativo	Negativo
Tejido pulmonar normal	Positivo +++	Positivo +++	Positivo ++
Metástasis pulmonar	Positivo +++	Positivo +++	Positivo ++
Recidiva renal	Positivo +++	Positivo +++	Positivo ++
Paciente 3			
Tumor renal primario	Positivo +++	Positivo +++	Positivo +++
Tejido normal renal	Positivo +++	Positivo +++	Positivo +++
Recidiva renal	Positivo +++	Positivo +++	Positivo +++

Tabla 2: nos muestras los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica para la expresión de HLA de clase I realizada con los tres anticuerpos (EMR8-5, L-368 y HC-10) de los tres pacientes tratados con una inmunoterapia con péptidos. Las cruces (+) nos muestra la intensidad del marcaje del anticuerpo, cuyo baremo va de una a tres cruces.

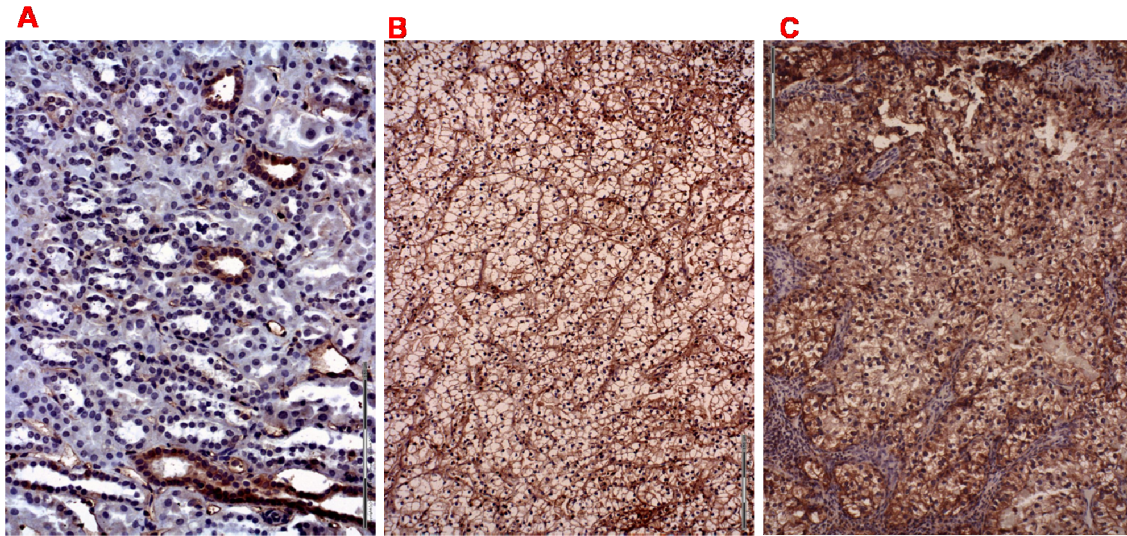


Figura 4: Análisis inmunohistoquímico utilizando el anticuerpo monoclonal EMR8-5. A-B) Mientras que el tejido tumoral (B) es claramente positivo el tejido normal (A) es negativo con algún túbulo distal positivo. C) La recidiva renal tiene una positividad similar a la que se obtuvo en el tumor renal primario.

**Estudio del infiltrado inflamatorio en pacientes
con carcinoma renal.**

Material y Métodos

Pacientes y Material

El estudio del infiltrado tumoral se ha llevado a cabo en 19 pacientes con carcinoma renal, diagnosticados en el departamento de Urología del Hospital Virgen de las Nieves entre 1997 y 2009. El material recogido de los pacientes fue: 19 muestras tumorales y 8 muestras del tejido normal autólogo, todas ellas criopreservadas. De las 19 muestras tumorales estudiadas, 15 tumores fueron diagnosticados como carcinoma renal de células claras, 3 muestras eran cromóforos y un carcinoma papilar. Todos los pacientes fueron intervenidos de una nefrectomía radical o parcial. La edad media de los pacientes en el momento de la intervención es de 63 años (rango entre 30 – 84 años). Las características clinicopatológicas se muestran en la **Tabla 1**. El estudio histopatológico lo realizaron dos patólogos, los cuales emitieron de forma independiente el diagnóstico sobre tinción de hematoxilina y eosina. Los tumores fueron clasificados de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud. La escala Fuhrman se utilizó para evaluar el grado nuclear. El estadio tumoral fue asignado de acuerdo a la clasificación TNM de 2002. La tasa de supervivencia a 5 años fue del 75% en pacientes con estadio I (T1N0M0), del 67% en los pacientes con estadio III (T1, T2; N1; M0 o T3; cualquier N; M0) y el 25% en pacientes con estadio IV (T4; cualquier N; M0 o cualquier T, cualquier N, M1). Los pacientes fueron seguidos activamente desde el diagnóstico hasta diciembre de 2008. En total 8 de los 19 pacientes murieron antes de llegar a los 5 años de supervivencia.

Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica para el estudio de los tejidos en criopreservación fue realizada con el sistema Biotin-Streptavidin (supersensitive Multilink HRP/DAB kit, BioGenex, The Hague, The Netherlands).

Los anticuerpos monoclonales utilizados para detectar el infiltrado fueron los siguientes: **GRT2** (anti-CD45), producido en nuestro laboratorio, **OKT3** (anti-CD3 hybridoma, ATCC, Teddington, UK), **OKT8** (anti-CD8 hybridoma, ATCC), **anti-CD4** (Clone RPA-T4, Becton–Dickinson Biosciences (BDB), San Jose, CA), **anti-CD64** (Clone 10.1, BD Biosciences) **anti-CD163** (Macrophage scavenger receptor; Clone Ber-Mac3, MBL,

Woburn, MA), y **anti-CD206** (Macrophage mannose receptor; Clone 19.2, BD Biosciences), **anti-CD56** (Clone 123C3, Dako, Barcelona, España) y un anticuerpo que detecta la cadena ζ del complejo CD3 (1D4.1), cedido por el Dr. Jaime Sancho (Department of Cellular Biology and Immunology, Instituto de Parasitología y Biomedicina, Granada, Spain).

Tabla 1: Características clinicopatológicas del los tumores de cáncer renal

Edad (años)	Media (rango)	63 (30-84)
Genero	Masculino	9
	Femenino	10
Tamaño del tumor	Media (rango)	7 (3-18)
	≤ 7	10
	> 7	9
T crecimiento local	pT1	8
	pT2	1
	pT3	9
	pT4	1
Grado nuclear*	G1	4
	G2	4
	G3-4	10
Nódulos linfáticos regionales afectados	N0	14
	N1	0
	N2	3
	Nx	2
Metástasis	M0	15
	M1	4
	Mx	0
Estadio	I	8
	II	0
	III	7
	IV	4
Histopatología	celulas claras	15
	papilar	1
	cromofobo	3

*Se desconoce el grado nuclear de uno de los pacientes.

Análisis estadístico

Las características de la infiltración fueron comparadas con los parámetros clinicopatológicos utilizando el test de la chi-cuadrado de Pearson en tablas de 2x2. Los pacientes fueron clasificados de manera dicotómica para cada uno de los parámetros clinicopatológicos siguientes: tamaño del tumor, grado nuclear, estadio y supervivencia.

El Odd ratio (ORs) y el valor de p fueron calculados. Un valor de p menor del 0,05 fue considerado significativo. Para el análisis estadístico se utilizó la versión 15.0 del programa SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL).

Sistema de evaluación del infiltrado inflamatorio

Para el análisis del infiltrado inflamatorio del tejido tumoral se utilizó un objetivo del 10x y se evaluó de la siguiente forma:

Patrón (figura 1):

- infiltrado inflamatorio rodeando la masa tumoral (**peritumoral**)
- en septos fibrosos intratumorales (**intersticial**)
- células inflamatorias en contacto con las células epiteliales neoplásicas (**intratumoral**)

Grado (figura 2):

- ausencia de infiltrado inflamatorio (**0**)
- bajo infiltrado inflamatorio (+)
- Moderado/bajo infiltrado inflamatorio (++)
- moderado infiltrado inflamatorio (++)
- alto infiltrado inflamatorio (+++)

Tipo: predominio de un tipo de célula leucocitaria.

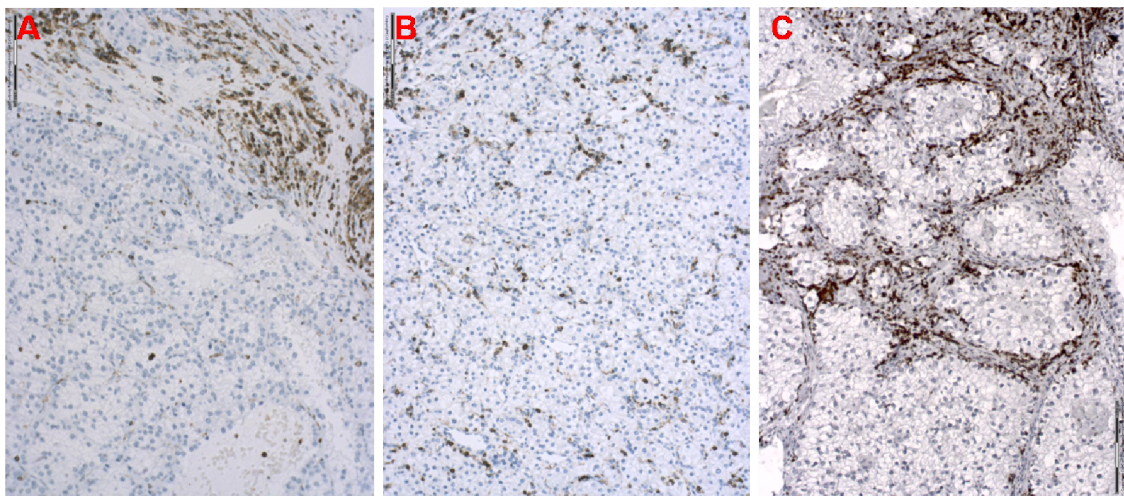


Figura 1: Ejemplos de patrones de infiltrado inflamatorio en el tumor mediante el análisis inmunohistoquímico de tres muestras de carcinoma renal utilizando el anticuerpo GRT2 (antiCD45). A) patrón de infiltración peritumoral. B) infiltración intratumoral. C) infiltración intersticial.

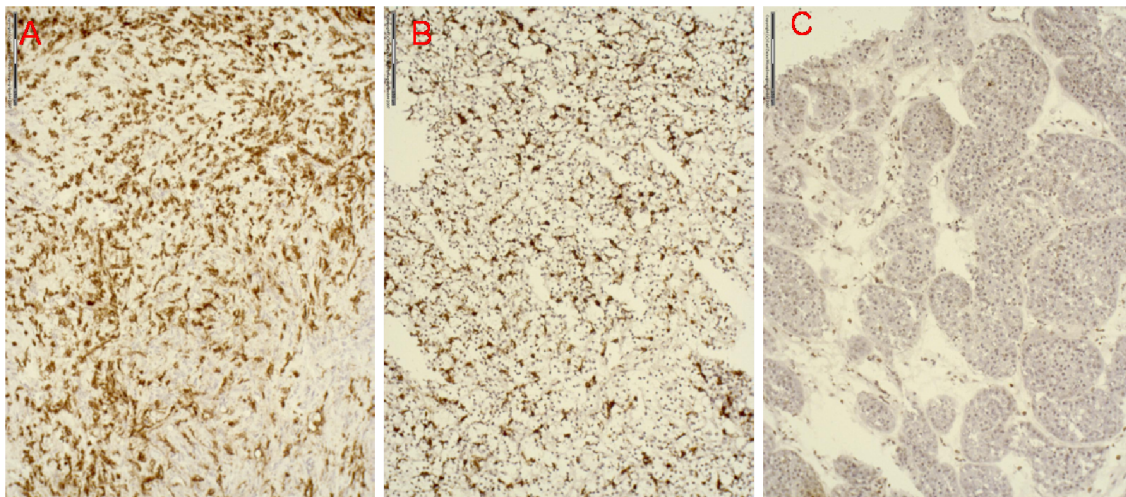


Figura 2: Ejemplos de grado de infiltración tumoral mediante el análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo GRT2 (antiCD45) en muestras de cáncer renal. A) alta infiltración (+++). B) moderada infiltración (++) . C) baja infiltración (+)

Resultados

1. Estudio de la infiltración leucocitaria en tejido normal y neoplásico

Los resultados del tipo, grado y patrón de infiltración leucocitaria observados se representan en la **tabla 2**. De las 19 muestras tumorales estudiadas el 32% (6 casos) tenían una alta infiltración (+++), el 21% (4 casos) tenían una infiltración moderada (++) , el 26% (5 casos) una infiltración moderada baja (++) y el 21% (4 casos) tenía una baja infiltración (+). De los 8 casos de tejido normal autólogo estudiados, 4 casos (50%), tenían una infiltración moderada (++) , 2 casos (25%) una infiltración alta (+++) y 2 casos poca infiltración (+).

El patrón de infiltración fue el siguiente: el 79% de los casos (15 casos) su patrón de infiltración era intratumoral mientras que el 21% (4 casos) son intersticiales. Destacar que todos los tumores de células claras tenían un patrón intratumoral mientras que todos los tumores cromófobos y el tumor papilar tenían un patrón de infiltración intersticial.

Tabla 2: Resultados del infiltrado leucocitario tumoral en los pacientes con cáncer renal

Identificación	Tipo de tumor	Grado de Infiltración leucocitaria (CD45)	Patrón de Infiltración leucocitaria	Tipo de infiltrado leucocitario
CR 33	Células claras	+++	Intratumoral	*Predominio Macrófagos
CR 34	Células claras	+ / ++	Intratumoral	Predominio NK
CR 41	Células claras	+ / ++	Intratumoral	Predominio Macrófagos M2
CR 43	Cromóforo	+	Intersticial	Predominio Macrófagos
CR 46	Células claras	+ / ++	Intratumoral	Predominio Macrófagos
CR 49	Células claras	++	Intratumoral	Predominio CD 8
CR 50	Cromóforo	+	Intersticial	Predominio Macrófagos
CR 53	Células claras	+++	Intratumoral	Predominio Macrófagos
CR 60	Células claras	+ / ++	Intratumoral	Predominio Macrófagos M2
CR 70	Células claras	+	Intratumoral	Predominio Macrófagos
CR 76	Células claras	++	Intratumoral	Predominio Macrófagos
CR 81	Células claras	++	Intratumoral	Predominio CD8
CR 86	Células claras	+ / ++	Intratumoral	Predominio Macrófagos M2
CR89	Células claras	+++	Intratumoral	Predominio Macrófagos y CD 8
CR97	Células claras	+	Intratumoral	Predominio Macrófagos
CR 99	Células claras	+++	Intratumoral	Predominio Macrófagos M2
CR 106	Células claras	+++	Intratumoral	Predominio Macrófagos
CR 112	Cromóforo	+++	Intersticial	Predominio Macrófagos
CR 138	Papilar	++	Intersticial	Predominio Macrófagos

*Predominio de macrófagos: no observamos diferencias entre el número de macrófagos M1 y M2

Se observó que en 15 de los 19 casos predominaba una infiltración por macrófagos (79%). Dentro de esos 15 casos con predominio de macrófagos, el 27% (4 casos) tenía una infiltración de macrófagos M2 y el 73% de los casos (11 casos) no se observó una diferencia entre macrófagos M1 y M2. No hemos encontrado ningún tejido con predominio de macrófagos M1. En 2 de los 19 casos había un predominio de linfocitos T CD8 (11%). Un caso (5%) se vio un patrón de infiltración por células NK y otro caso tenía una infiltración similar de macrófagos y linfocitos T CD8. En las muestras del tejido normal el predominio del infiltrado fue el siguiente: siete de los ocho casos tenían

un predominio de infiltración de macrófagos mientras que uno de los casos tenía una infiltración similar de macrófagos y linfocitos T CD8.

No se observó ninguna diferencia entre la inmunohistoquímica de las muestras de los pacientes con el anticuerpo anti-CD3 y el anticuerpo anti- ξ . El patrón de CD3 y CD8 en la mayoría de los tumores analizados reveló que gran parte de la infiltración por linfocitos T en estos tumores correspondían a linfocitos de fenotipo CD8.

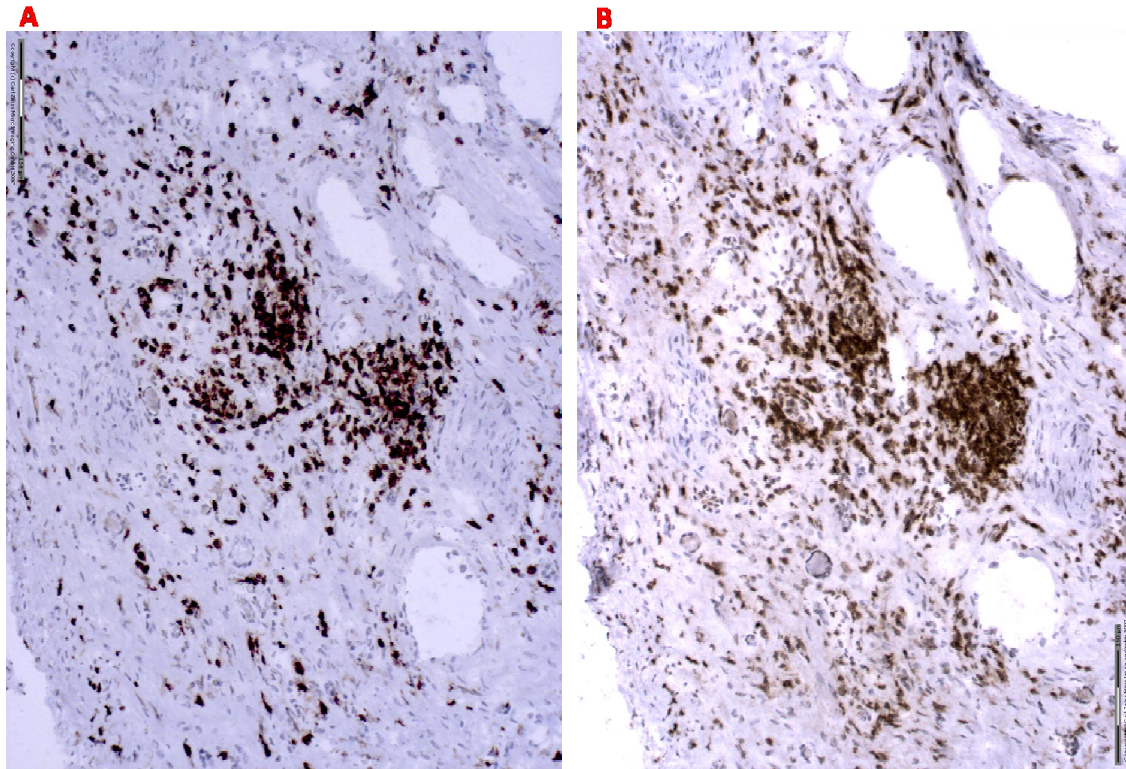


Figura 3: inmunohistoquímica realizada con los anticuerpos frente a CD3 (B) y la cadena ξ (A). No se observa ninguna diferencia en el marcaje entre los dos anticuerpos.

1.2 Relación del estudio de la infiltración leucocitaria con las características clinicopatológicas y pronóstico de los pacientes.

Hemos realizado un estudio estadístico para comprobar si existía una posible relación entre el grado y patrón de infiltración con las características clinicopatológicas de los pacientes (tamaño tumoral, estadio, grado nuclear y supervivencia). Los resultados se muestran en la **tabla 3**. No se encontró una asociación significativa entre el grado de infiltración y el tamaño, grado nuclear y estadio ($p=0.628$, $p=0.569$ y $p=0.506$ respectivamente). Tampoco se ha encontrado una significación entre el patrón de infiltración con las restantes características clinicopatológicas consideradas anteriormente ($p=0.303$, $p=0,673$, $p=0,603$ respectivamente).

Además, hemos realizado diferentes agrupaciones con la variante de predominio de un tipo de infiltrado y las hemos relacionado con los parámetros clínico-patológicos antes descritos. No hemos encontrado ninguna asociación significativa (los datos no se muestran).

Finalmente, también se realizaron análisis de supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier y el test long Rank (Mantel-Cox). Se analizó la supervivencia a 5 años (60 meses) en relación al grado de infiltración (**figura 4**), el patrón de infiltración y el predominio de un tipo de infiltración leucocitaria. No se encontró ninguna asociación significativa entre estos tres parámetros. No obstante, debido a que la supervivencia media (50% de mortalidad) no se alcanzó, no podemos descartar definitivamente la influencia estadística de esta variable como factor pronóstico.

Tabla 3: Asociación de las características del infiltrado leucocitario con los parámetros clinicopatológicos de los pacientes

Características de la infiltración.		Grado tumoral		Odss ratio (95%CI)	P*	Estadio		Odss ratio (95%CI)	P*
		G1	G2-4			I	II-IV		
Grado de infiltración	Alta	2 (50%)	4 (28.6%)	0.4 (0.41-3.9)	0.569	3 (37.5%)	3 (27.3%)	0.625 (0.089-4.4)	0.506
	Moderada + baja	2 (50%)	10 (71.4%)			5 (62.5%)	8 (72.7%)		
Patrón de infiltración	Intratumoral	3 (75%)	11 (78.6%)	0.81 (0.61-10.9)	0.673	7 (87.5%)	8 (72.7%)	2.625 (0.22-31.34)	0.603
	Intersticial	1 (25%)	3 (21.4%)			1 (12.5%)	3 (27.3%)		

Características de la infiltración.		Tamaño tumoral		Odss ratio (95%CI)	P*
		≤7	>7		
Grado de infiltración	Alta	4 (40%)	2 (22.2%)	0.429 (0.57-3.22)	0.628
	Moderada + baja	6 (60%)	7 (77.8%)		
Patrón de infiltración	Intratumoral	9 (90%)	6 (66.7%)	4.5 (0.374-54.15)	0.303
	Intersticial	1 (10%)	3 (33.3%)		

CI, intervalo de confianza
*Test de la χ^2

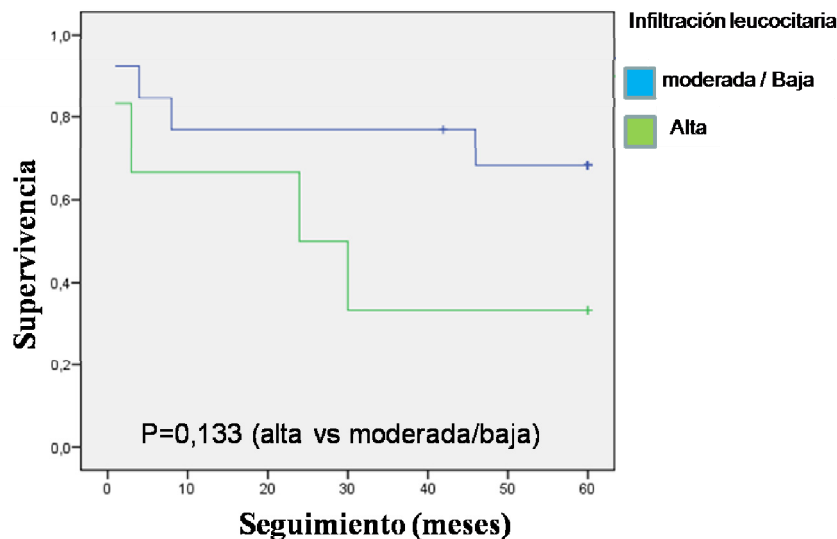


Figura 4: Supervivencia global mediante Kaplan-Meier estimada para el parámetro leucocitario de grado de infiltración. Las diferencias entre las curvas se evaluaron por medio del test long Rank (Mantel-Cox) (p). No existe una diferencia significativa $p=0.133$.

2. Estudio de la infiltración por linfocitos T CD8 citotóxicos en pacientes con carcinoma renal.

Hemos querido analizar específicamente el infiltrado tumoral de los linfocitos T citotóxicos en las 19 muestras de pacientes con carcinoma renal, dado que ha sido descrito en otros tumores, particularmente en colon, que la intensidad y el patrón de infiltración de linfocitos T CD8/CD3 es un factor pronóstico independiente de la supervivencia en esta neoplasia. En la **tabla 4** se representa los resultados obtenidos en cáncer renal. Cinco de los 19 casos (27%) tenían una alta infiltración (+++), destacar que 4 de los cinco casos con una infiltración alta (80%) habían fallecido. Tres de los 19 casos (15%) tenían una infiltración moderada o baja moderada (++ & +/++) mientras que 11 de los 19 casos (58%) tenían una baja infiltración o nula (+ & 0).

El patrón de infiltración fue el siguiente: en 16 de los 19 casos (85%) el patrón de infiltración era intratumoral frente a 3 de los 19 casos (15%) que era intersticial. Todos los pacientes con un patrón intersticial de infiltración por linfocitos CD8 estaban vivos.

2.1 Relación del estudio de infiltración por linfocitos T citotóxicos con las características clinicopatológicas y pronóstico de los pacientes.

Hemos realizado un estudio estadístico para comprobar si existía una relación entre el grado y el patrón de infiltración de linfocitos T citotóxicos con las características clinicopatológicas de los pacientes (tamaño tumoral, estadio, grado nuclear y

supervivencia). En la **tabla 5** se muestran los resultados. No se ha encontrado asociación significativa entre el grado de infiltración y el tamaño, grado nuclear y estadio ($p=0.33$, $p=0.446$ y $p=0.426$ respectivamente). Tampoco se obtuvo significación al comparar el patrón de infiltración con las respectivas características clinicopatológicas ($p=0.458$, $p=0.446$ $p=0.624$).

Tabla 4: Estudio de los linfocitos T citotóxicos en los pacientes con cáncer renal.

Identificación	Tipo de tumor	Infiltración por CD8	Patrón de Infiltración	Vivo / éxitus
CR 33	Células claras	+	Intratumoral	Vivo
CR 34	Células claras	0	Intratumoral	Vivo
CR 41	Células claras	+	Intratumoral	Vivo
CR 43	Cromóforo	+	Intersticial	Vivo
CR 46	Células claras	+ / ++	Intersticial	Vivo
CR 49	Células claras	+++	Intratumoral	Vivo
CR 50	Cromóforo	0	Intratumoral	Vivo
CR 53	Células claras	++	Intratumoral	Vivo
CR 60	Células claras	+	Intratumoral	Vivo
CR 76	Células claras	+	Intratumoral	Vivo
CR 138	Papilar	+	Intersticial	Vivo
CR 70	Células claras	+	Intratumoral	éxitus
CR 81	Células claras	+++	Intratumoral	éxitus
CR 86	Células claras	+	Intratumoral	éxitus
CR89	Células claras	+++	Intratumoral	éxitus
CR97	Células claras	+	Intratumoral	éxitus
CR 99	Células claras	+ / ++	Intratumoral	éxitus
CR 106	Células claras	+++	Intratumora	éxitus
CR 112	Cromóforo	+++	Intratumoral	éxitus

También se analizó el impacto de la infiltración CD8 sobre la supervivencia de los pacientes. No se encontró ninguna asociación en el análisis por Kaplan-Meier y el test long Rank (Mantel-Cox) entre la supervivencia a 5 años (60 meses) y el grado (**figura 5**) y el patrón de infiltración por linfocitos T CD8. Aunque estadísticamente no es significativo observamos en la gráfica una tendencia hacia una menor supervivencia en los pacientes con un alto grado de infiltración por linfocitos CD8. Sin embargo, como se comentó anteriormente, debido a que la supervivencia media (50% de mortalidad) no se logró, no podemos confirmar o descartar la influencia estadística de esta variable como factor pronóstico.

Tabla 5: Asociación de las características de la infiltración por linfocitos T citotóxicos con los parámetros clinicopatológicos de los pacientes

Características de la infiltración.		Grado tumoral		Odds ratio (95%CI)	P*	Estadio		Odds ratio (95%CI)	P*
		G1	G2-4			I	II-IV		
Grado de infiltración	Alta	0 (0%)	3 (21.4%)	0.733 (0,54-0.99)	0.446	1 (12.5%)	3 (27.3%)	2.625 (0.22-31.34)	0,426
	Moderada + baja	4 (100%)	11 (78.6%)			7 (87.5%)	8 (72.7%)		
Patrón de infiltración	Intratumoral	4 (100%)	11 (78.6%)	0.733 (0.540-0.995)	0.446	7 (87.5%)	9 (81.8%)	1.55 (0.11-20.85)	0.624
	Intersticial	0 (0%)	3 (21.4%)			1 (12.5%)	2 (18.2%)		

Características de la infiltración.		Tamaño tumoral		Odds ratio (95%CI)	P*
		≤7	>7		
Grado de infiltración	Alta	3 (30%)	1 (11.1%)	0.29 (0.24-3.48)	0.33
	Moderada + baja	7 (70%)	8 (88.9%)		
Patrón de infiltración	Intratumoral	9 (90%)	7 (77.8%)	2.571 (0.192-34.47)	0.582
	Intersticial	1 (10%)	2 (22.2%)		

CI, intervalo de confianza

*Test de la χ^2

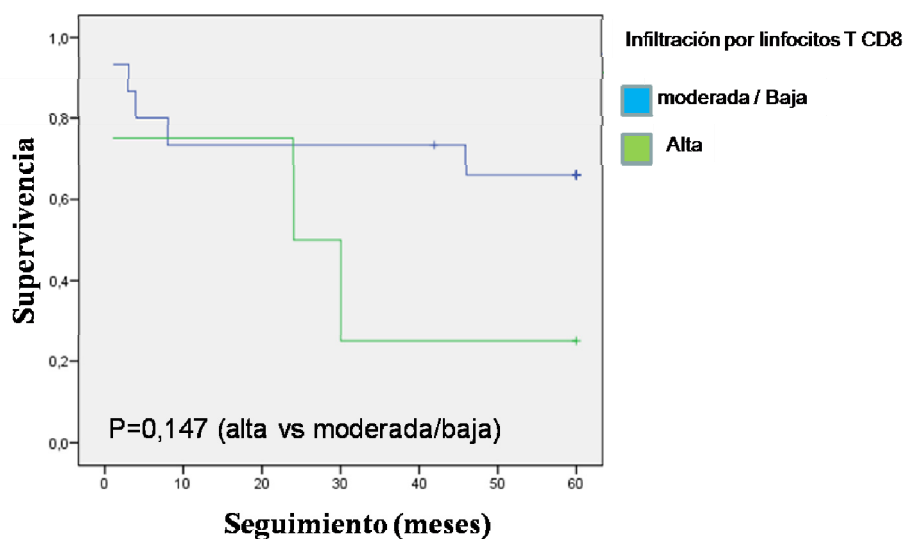


Figura 5: Nos muestra la supervivencia global mediante Kaplan-Meier estimada para el parámetro grado de infiltración por linfocitos T CD8. Las diferencias entre las curvas se evaluaron por medio del test long Rank (Mantel-Cox) (p). No existe una diferencia significativa p=0.147.

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

José María Romero ^a, Pablo Sáenz-López ^a, José Manuel Cózar ^b, Rafael Carretero ^a, Julia Canton ^a, Fernando Vazquez ^b, Angel Concha ^c, Miguel Tallada ^b, Federico Garrido ^a, Francisco Ruiz-Cabello ^a,*

a) Servicio de Análisis Clínicos, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Inmunología, Universidad de Granada, Granada, Spain

b) Servicio de Urología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain

c) Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain

Abstract

In the tumor microenvironment, interleukin (IL-10) production has a pleiotropic ability to positively and negatively influence the function of innate and adaptive immunity against cancer. This study investigated whether IL-10 genetic polymorphisms that influence gene expression levels play a role in the risk and clinical course of clear-cell renal cell carcinoma (RCC). We analyzed the allelic and haplotype frequency formed by alleles at -1082(G/A), -819(C/T), and -592(C/A) of the IL-10 gene in RCC ($n = 126$) and healthy individuals ($n = 176$). The frequency of IL-10 polymorphic variants was similar between patients and controls. However, -1082 G/A IL-10 genotype showed a significant association with three prognostic indicators: advanced disease stage ($p = 0.002$), higher tumor size ($p = 0.001$), and presence of adenopathy ($p = 0.006$). Our results can be explained by the contradictory antitumor or pro-tumorigenic relationship between this molecule and cancer. Genotypes associated with high or low levels of IL-10 gene expression (GG or AA-1082 IL-10) were both associated with a more favorable course of the disease. We propose the hypothesis that the -1082 GA medium expression genotype confers a tumor-promoting phenotype, likely resulting from the immunosuppressive effects of anti-tumor Th-1 responses in conjunction with the insufficient inhibition of tumor angiogenesis at this intermediate level of IL-10 expression.

Introduction

Chronic or recurrent inflammation is known to play a causative role in the promotion and progression of many human tumors, including liver, esophagus, stomach, large intestine, and urinary bladder cancers [1–3]. The association of different cytokines with tumor development is well documented. Numerous mediators released in dysregulated chronic inflammation have been found to promote cell growth and invasion, induce mutagenesis, and increase angiogenicity. The cytokine interleukin (IL)-10 is pleiotropic and may act as a cancer-promoting agent [4]. Classically, IL-10 is considered a potent Th-2 cell cytokine with a wide range of immunosuppressive and anti-inflammatory activities via the inhibition of lymphocyte and monocyte function and the secretion of inflammatory cytokines [5]. Nevertheless, the role of IL-10 in tumor development remains unclear, and its production in the tumor microenvironment is controversial.

Thus, elevated IL-10 levels in peripheral blood samples have been related to a worse prognosis but high levels in tumor samples to a better prognosis [6,7].

IL-10 gene expression is strongly influenced by genetic factors. Some of the polymorphisms identified in cytokine and chemokine genes affect the transcriptional rate or biologic activity [8,9] and may therefore play an important role in tumorigenesis. GG genotype at the -1082 position has been associated with high *in vitro* IL-10 production, AG genotype with intermediate production and AA with low production [10]. A further two polymorphisms at positions -819 and -592 are in linkage disequilibrium and form three haplotypes: GCC, ACC, and ATA. Finally, IL-10 -1082 AG polymorphism was found to be a key factor in the regulation of IL-10 mRNA levels in a healthy Spanish population [11].

Reports on the relationship between IL-10 polymorphisms and cancer risk or prognosis have also been controversial [4,12]. Thus, one case-control study found no association with renal cancer risk [13], whereas another reported a higher frequency of IL-10 -1082 AA polymorphism in RCC patients than in controls [14]. No comparative analysis of this issue has considered the clinical data of patients [13,14]. The objective of this study was to investigate the relationship between clinical findings and several IL-10 polymorphisms in RCC patients and healthy controls.

Subjects and methods

Patients

The study included 127 patients diagnosed with clear-cell renal carcinoma at the Department of Urology of Virgen de las Nieves Hospital between 1997 and 2006. All patients had undergone total or partial nephrectomy. The mean age was 60 years (range, 23–84 years) and 66.7% were female (male/female ratio of 2:1). Two consulting pathologists retrospectively and independently reviewed the hematoxylin and eosin-stained tissue slides according to the World Health Association classification. The Fuhrman scale was used to assess the nuclear grade. Tumor stage was assigned according to the 2002 TNM classification: 66.7% of patients had localized tumor (T1–2N0M0), 18.4% locally advanced stage (T3–4N0M0), and 14.9% metastatic stage (N1M1) (Table 1). Patients were actively followed up from diagnosis to September

2008. Mean patient follow-up was 5.3 years (range, 1–9 years). The survival rate was 95% in patients with localized cancer, 80% in patients with locally advanced stage, and 40% in patients with metastatic cancer. Cancer characteristics were gathered according to the University of California–Los Angeles (UCLA) integrating staging system (UISS), which includes TNM stage, histologic grade (Fuhrman), and performance status (ECOG) as prognostic factors. Only the first two parameters were assessed because the performance status was equal to zero in all cases and were not considered relevant for the statistical analysis [15]. No other risk factors for an adverse prognosis were evaluated. The control group comprised 176 healthy blood donors from the Spanish Bone Marrow Donor Registry, with mean age of 55 years (range, 29–67 years) and a male:female ratio of 2:1. Control samples were collected in 2005 or 2006. All patients and controls were Caucasian and of Spanish origin. All patients and controls signed informed consent to participate in this study.

IL-10 genotyping

Total genomic DNA was isolated from peripheral blood of renal cancer patients and healthy controls using the QIAamp DNA Mini kit. SNP samples were genotyped by means of a Taqman 5' allelic discrimination assay. SNP genotyping was carried out using the Assays-on-Demand SNP genotyping kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Single nucleotide polymorphism amplification assays were used according to the manufacturer's instructions. In short, 25 µl of reaction solution containing 10 ng of DNA was mixed with 12.5 µl of 2X TaqMan Universal PCR Mix (Applied Biosystems) and 1.25 µl of predeveloped assay reagent from the SNP genotyping product (Applied Biosystems) containing two primers and two MGB-Taqman probes. Reaction conditions consisted of preincubation at 50°C for 2 minutes and at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and at 60°C for 1 minute. Amplifications and analysis were performed in an ABI Prism 7750 Sequence. Detection System (Applied Biosystems) using the SDS 1.4 software for allelic discrimination (Applied Biosystems, Foster City, CA). The following single-nucleotide polymorphisms SNPs were typed: IL-10-1082A>G (rs1800896), IL-10-592A>C (rs1800872), IL-10-819 C >T (rs1800871).

Table 1: Statistical analysis of IL-10 haplotypes and IL-10-1082 SNP in clear-cell RCC patients versus control group

IL= interleukin; RCC = Renal Cell Carcinoma; SNP = single nucleotide polymorphism;

Genotype	RCC patients (n = 127)	Controls (n = 176)	χ^2 Significance
IL-10 haplotype			
-/- (low production)	42 (33.3%)	58 (33.3%)	0.99 ^a
GCC/- (medium production)	62 (49.2%)	86 (49.4%)	
GCC/GCC (high production)	22 (17.5%)	30 (17.2%)	
IL-10 1082			
AA (low production)	42 (33.3%)	58 (33.1%)	1.01 ^a
AG (medium production)	62 (49.2%)	87 (49.7%)	
GG (high production)	22 (17.5%)	30 (17.1%)	

- = haplotype ATA or ACC.

^aNot statistically significant.

Statistical analysis

SNPs allele frequencies were tested against departure from Hardy-Weinberg equilibrium before analysis. Genotype frequencies were compared using the Pearson χ^2 test for the 2x2 tables or Fisher's exact test when the expected frequency value was < 5 . Patients were classified in a dichotomous manner for each of the following clinical parameters: tumor diameter, nuclear grade, tumor stage, UCLA risk, presence of adenopathy, malignant thrombosis, and metastasis. The distribution of the polymorphism for each parameter was studied by analyzing the allele frequency and allele positivity according to Sasieni *et al.* [16] as shown in Table 3. Odds ratios (OR) and significance (p values) were also calculated. Based on a significance level of $p < 0.05\%$, and because multi-test correction was done by dividing among the seven parameters studied, significance was established at $p < 0.007$. Multivariate binary logistic regression analysis was used to confirm the observed differences. The Mann-Whitney test was used to study differences in tumor size between haplotypes when tumor size was considered as a continuous variable. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method and compared by using the log-rank test. The SPSS version 15.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for analyses. The power of the study to detect the effect of a polymorphism on disease susceptibility was estimated by means of Granmo 5.0 software (IMIM, Barcelona, Spain). The power was estimated as $z\text{-alfa} = 1.96$ and $OR = 2$ based on

frequencies in the general population of southern Spain. The power of heterozygous risk was 0.85 and the power of allele G risk was 0.80.

Results

Case-control study

This case-control study revealed similar frequencies in the distribution of the IL-10-1082 polymorphism between healthy controls and patients with clear-cell RCC. Table 1 summarizes results of the statistical analysis. None of the SNP genotype frequencies deviated from Hardy-Weinberg equilibrium, and the distribution of alleles in the control group was in agreement with findings in other Spanish Caucasian [17] population. Genotype frequency of AA was 33.3% in case patients and 33.1% in controls ($\chi^2=1.02$); AG frequency was 49.2% and 49.7% in controls and patients, respectively ($\chi^2=1.00$), and GG frequency showed similar results; none of these differences were significant ($\chi^2=1.01$). Groups of haplotypes were formed according to their IL-10 production capacity [7]: high (GCC/ GCC; n = 23), intermediate (GCC/ATA and GCC/ACC; n = 72), and (ATA/ATA, ATA/ACC, and 275 ACC/ACC; n = 45). The distribution of IL-10 haplotypes was previously reported to be similar between RCC patients and controls [13].

Association with clinical and prognostic parameters

IL-10 gene polymorphisms were compared with various prognostic factors in renal cell cancer. Haplotype analysis of IL-10- 1082A > G, IL-10-819 C > T, and IL-10-592 A > C showed that no significant information was added to that provided by the -1082 polymorphism; therefore, we report only the relationship between clinical parameters and the IL-10-1082A>G polymorphism, which showed the strongest association. Relative frequencies for each clinical parameter are shown in Table 2 and the statistical analysis is given in Table 3. A higher frequency of the AG genotype was observed in patients with tumors >7 cm long, with an OR for heterozygous AG of 4.41 (95% confidence interval [CI] =1.765–11.003, p =0.001). Allele G emerged as a risk allele with an OR of 3.66 (CI =1.519–8.817, p =0.003). However, these data were obtained because of the high frequency of heterozygous and low frequency of homozygous GG

observed. Furthermore, no significant differences between homozygous AA and GG were found. Results in Table 2 show the similarity in percentage of homozygous GG between patients with tumors shorter and longer than 7 cm. These results were confirmed by analysis of tumor size as a continuous variable (Table 4), which showed that heterozygous patients had larger tumors ($p=0.001$). Therefore, the main risk factor is the heterozygous AG status rather than G allele presence. This polymorphism was not associated with any differences in nuclear grade, UCLA risk or the presence of malignant thrombosis or metastases. Moreover, no relationship with UCLA risk was detected when low-medium risk scores were combined and compared with high risk scores (data not shown). Only 10 patients had adenopathy but all were heterozygous (OR = 1.79, CI = 1.485–2.162, $p = 0.006$, Fisher's exact test). The distribution of -1082 A/G polymorphism also differed as a function of tumor stage, with a higher OR for heterozygous A/G (OR =14.10; CI =1.782–111.485, $p=0.002$).

Table 2 Relative frequency of IL-10-1082 SNP in clear-cell RCC patients

Clinical parameter	Genotype AA (%)	Genotype AG (%)	Genotype GG (%)	Allele A positivity (%)	Allele G positivity (%)
Tumor diameter					
<7 cm	28 (45.2)	24 (38.7)	10 (16.1)	52 (83.9)	34 (54.8)
≥7 cm	9 (18.4)	34 (69.4)	6 (12.2)	43 (87.8)	40 (81.6)
Nuclear grade					
G1–2	25 (33.8)	38 (51.4)	11 (14.9)	63 (85.2)	49 (66.3)
G3–4	13 (34.2)	20 (52.6)	5 (13.2)	33 (86.8)	25 (65.8)
Adenopathy					
No	38 (37.3)	48 (47.1)	16 (15.7)	86 (84.4)	64 (62.8)
Yes	0 (0)	10 (100)	0 (0)	10 (100)	10 (100)
Malignant thrombosis					
No	35 (35)	49 (49)	16 (16)	84 (84)	65 (65)
Yes	3 (25)	9 (75)	0 (0)	12 (100)	9 (75)
Metastasis					
No	31 (33.3)	49 (52.7)	13 (14)	80 (86)	62 (66.7)
Yes	7 (36.8)	9 (47.4)	3 (15.8)	16 (84.2)	12 (63.2)
Tumor stage					
Local not advanced	37 (39.4)	42 (44.7)	15 (16)	79 (84.1)	57 (60.7)
Local advanced or more advanced	1 (5.6)	16 (88.9)	1 (5.6)	17 (94.5)	17 (94.5)
UCLA risk					
Low	14 (41.2)	17 (50)	3 (8.8)	31 (91.2)	20 (58.8)
Medium-high	16 (25)	37 (57.8)	11 (17.2)	53 (82.8)	48 (75)

IL= Interleukin; RCC = Renal Cell Carcinoma; SNP =Single Nucleotide Polymorphism; UCLA = University of California –Los Angeles.

Results for tumor stage are the same as for tumor diameter, with the G allele reported as a risk allele but with no significant differences between homozygous GG and AA for the studied polymorphism. Therefore, AG heterozygous status is the main risk factor for higher tumor stage. Multivariate logistic regression analysis of IL10-1082, IL10-819, and IL10-592 SNPs as explicative variables confirmed the significance of IL10-1082 in tumor size ($p=0.002$) and tumor stage ($p=0.024$), but did not confirm an association with adenopathy.

Table 3: Statistical analysis of IL-10-1082 SNP in relation to clinical parameters of clear-cell RCCOR

Clinical parameter	Allele	Allele frequency	Heterozygous	Homozygous	Allele positivity
Tumor diameter ≥ 7 cm	Allele A	OR = 0.62 <i>p</i> = 0.084	OR = 2.36 ^a <i>p</i> = 0.133	OR = 0.54 ^c <i>p</i> = 0.328	OR = 1.38 ^d <i>p</i> = 0.563
	Allele G	OR = 1.61 <i>p</i> = 0.084	OR = 4.41^b <i>p</i> = 0.001	OR = 1.87 <i>p</i> = 0.328	OR = 3.66 <i>p</i> = 0.003
Nuclear grade G3–4	Allele A	OR = 1.04 <i>p</i> = 0.877	OR = 1.16 <i>p</i> = 0.809	OR = 1.14 <i>p</i> = 0.833	OR = 1.15 <i>p</i> = 0.807
	Allele G	OR = 0.96 <i>p</i> = 0.877	OR = 1.01 <i>p</i> = 0.978	OR = 0.87 <i>p</i> = 0.833	OR = 0.98 <i>p</i> = 0.964
Occurrence of adenopathy	Allele A	OR = 0.65 <i>p</i> = 0.348	OR = 0.56 <i>p</i> = 0.074	OR = 0.43 <i>p</i> = 1.000	OR = 0.63 <i>p</i> = 0.176
	Allele G	OR = 1.55 <i>p</i> = 0.348	OR = 1.79 <i>p</i> = 0.006	OR = 2.33 <i>p</i> = 1.000	OR = 1.59 <i>p</i> = 0.015
Occurrence of malignant thrombosis	Allele A	OR = 1.13 <i>p</i> = 0.776	OR = 0.84 <i>p</i> = 0.210	OR = 0.69 <i>p</i> = 0.547	OR = 0.84 <i>p</i> = 0.210
	Allele G	OR = 0.88 <i>p</i> = 0.776	OR = 2.14 <i>p</i> = 0.269	OR = 1.46 <i>p</i> = 0.547	OR = 1.62 <i>p</i> = 0.489
Appearance of metastasis	Allele A	OR = 1.04 <i>p</i> = 0.923	OR = 0.80 <i>p</i> = 0.756	OR = 0.98 <i>p</i> = 0.97	OR = 0.87 <i>p</i> = 0.84
	Allele G	OR = 0.96 <i>p</i> = 0.923	OR = 0.81 <i>p</i> = 0.709	OR = 1.02 <i>p</i> = 0.98	OR = 0.86 <i>p</i> = 0.77
Tumor stage local advanced or more advanced	Allele A	OR = 0.62 <i>p</i> = 0.189	OR = 0.78 <i>p</i> = 0.097	OR = 0.40 <i>p</i> = 0.509	OR = 0.31 <i>p</i> = 0.462
	Allele G	OR = 1.61 <i>p</i> = 0.189	OR = 14.10 <i>p</i> = 0.002	OR = 2.48 <i>p</i> = 0.509	OR = 11.04 <i>p</i> = 0.005
UCLA medium or high risk	Allele A	OR = 0.60 <i>p</i> = 0.097	OR = 0.59 <i>p</i> = 0.462	OR = 3.21 <i>p</i> = 0.109	OR = 0.47 <i>p</i> = 0.260
	Allele G	OR = 1.67 <i>p</i> = 0.097	OR = 1.90 <i>p</i> = 0.167	OR = 0.31 <i>p</i> = 0.109	OR = 2.10 <i>p</i> = 0.098

=odds ratio; RCC = Renal Cell Carcinoma; SNP = Single Nucleotide Polymorphism; UCLA = University of California–Los Angeles; boldface = data with statistical significance.

^aCalculated by comparison of heterozygous AG vs homozygous GG.

^bCalculated by comparison of heterozygous AG vs homozygous AA.

^cCalculated by comparison of homozygous AA vs homozygous GG.

^dCalculated by comparison of homozygous AA plus heterozygous AG vs homozygous GG.

The other two polymorphisms were ruled out (statistically not significant). All patients were clinically followed up at varying intervals according to the stage of the patient. A slight trend towards a worse survival was observed in patients genotyped as —1082AG, although the differences were not statistically significant (Figure 1). Analysis of the Kaplan-Meier curves and application of the log-rank test yielded a non-significant result (*p* = 0.752), which may be caused by the small number of deaths attributed to RCC (15.2%).

Table 4: Correlation of IL-10-1082 genotype with tumor size

Genotype	Mean (cm)	SD (cm)	<i>p</i> Value ^a
GG	6.56	2.73	0.073
GA	7.76	3.89	0.001 ^b
AA	5.27	2.96	Ref ^c

IL = interleukin; SD= standard deviation.

^aMann-Whitney test.

^bStatistically significant.

^cUsed as reference genotype.

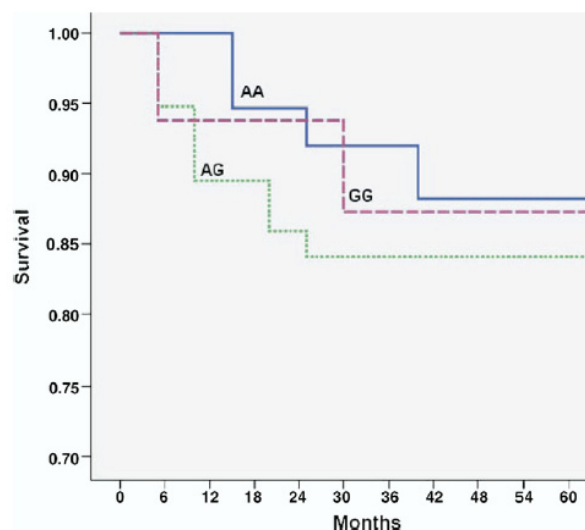


Fig. 1. Sixty-month survival curves. Kaplan-Meier was estimated according to IL- 10-1082 genotype. Differences between curves of individuals were evaluated by means of the log-rank test. Survival was analyzed in the whole series according to the genotype carriage. Log-rank test results were not significant ($p=0.752$).

Discussion

IL-10 is involved in many different aspects of the immune response, mediating pleiotropic effects on both adaptive and innate immunity cell mediators [5]. Although some studies (especially *in vitro*) show that IL-10 can actively mediate immune suppression, other experimental models have led to the opposite conclusion [6]. Several studies in different ethnic groups reported that distinct IL-10 alleles or haplotypes were a key factor in IL-10 production *in vivo*, and there is considerable evidence indicating that genetic control of IL-10 production influences the serum levels of this cytokine in patients [4, 18, 19].

IL-10-1082 SNP was associated with a higher risk of RCC in an English population, finding a higher frequency of homozygous AA in RCC patients versus controls [14], which was related to a low production of IL-10 [10]. These differences were not observed in the present Spanish population. The discrepant results may be explained by effects of genetic heterogeneity and different gene– environment interactions. In studies of melanoma patients, similar discrepancies in the allelic distribution of IL-10 between English [14] and Spanish [17] populations were attributed to an overrepresentation of the

AA genotype in the Spanish population. The distribution of the allelic frequencies in our study was similar to findings by other Spanish studies [20].

IL-10 gene polymorphisms have been associated with the risk of malignant disease and its prognosis [12], but both low and high expressions have been associated with susceptibility or a poorer outcome, depending on the tumor type [12]. Thus, -1082 GG (highproduction) genotype was significantly more frequent in patients with lung and oral squamous cell carcinoma [21], whereas the [22] AA (low-production) genotype was associated with the risk of prostate cancer and cutaneous melanoma [23,24]. IL-10 can affect different aspects of anticancer immunity: IL-10 may facilitate tumor growth by suppressing proinflammatory T helper 1 (Th-1) lymphocytes and cytotoxic responses, and acts as a potent Th-2 immunosuppressive cytokine [5]. IL-10 can also impair tumor-associated antigen (TAA) cross-presentation by DC, thereby potentially preventing T cells from mounting an effective immune response against malignant cells [6]. Thus, -1082 GG genotype associated with high producers of IL-10 have been related to high risk of tumor onset and progression resulting from reduced immunosurveillance [4,22]. However, IL-10 may also act as an immunostimulating cytokine, mediating the regression of established melanoma and breast cancer metastases in various preclinical in vivo models [25–28]. These anticancer effects may be mediated by an increase in NK activity [25]. However, this molecule can also influence anticancer growth and progression by affecting other phenomena, such as angiogenesis and malignant cell proliferation/ apoptosis [6]. IL-10 acts by inhibiting tumor stroma formation via different target cells, interfering with the development of a blood supply by the tumor [29]. IL-10 also deactivates macrophages that are important for tumor progression and neovascularization and are present in almost all solid tumors [30,31]. Furthermore, IL-10 downregulates the synthesis of vascular endothelial growth factor, a potent angiogenic factor. Thus, in IL-10–producing tumors or in a local microenvironment with a high production of this cytokine, the expression of vascular endothelial growth factor is downregulated and angiogenesis is inhibited [32,33].

This dual effect of IL-10 may explain our results. A high production of IL-10 may, for example, exert an immunosuppressive effect on anti-tumor immune mechanisms but at the same time inhibit tumor growth by activating anti-angiogenic mechanisms that predominate over the former. A low production of IL-10 may enhance anti-tumor

responses. In RCC patients, heterozygous (-1082-IL-10 G/A) status may favor tumor progression (higher tumor size, adenopathy, and more advanced stage). Hence an intermediate production of IL-10, in this case conferred by genotype, may exert an effective immunosuppressive effect by inhibition of proinflammatory Th-1 and cytotoxic responses, without inducing a potent antiangiogenic effect, favoring tumor progression in RCC. In our view, the composition and intensity of stromal reaction and the level of local production may be crucial for one or other response, explaining the apparently contradictory results in different tumor types. It has been hypothesized that the effects of IL-10 on the anticancer immune response may differ according to the site of IL-10 production [6]. Thus, in secondary lymphoid organs, IL-10 might inhibit the cross-presentation of TAA to T cells and favor the development of Treg cells, which have potent immunosuppressive functions [6]. This may explain why a higher level of IL-10 and greater frequency of IL-10-1082-GG genotype have been associated with the clinical outcomes in patients with diffuse large-cell lymphoma [4]. In other tumors, however, overexpression of IL-10 in the microenvironment might enhance immune rejection, increasing the innate immune response and likely primary immune response [32,33]. Our results indicate that heterozygous status for the -1082 gene IL-10 G/A polymorphism is associated with higher clinical aggressiveness of clear-cell renal carcinoma. We hypothesize that the IL-10-G/A genotype, associated with an intermediate production of this cytokine, may successfully inhibit Th-1 responses without substantially inhibiting angiogenic processes.

In this study, AG heterozygous status was the main risk factor for higher tumor stage but no association was found between IL-10 polymorphisms and survival. Figure 1 depicts the survival curves for each IL-10. Because the median survival (50% mortality) has not yet been reached, the statistical influence of this variable as a prognostic factor cannot be ruled out. Nevertheless, we were able to detect a slight tendency to a higher mortality for heterozygote patients in this small sample of only 17 events. Studies of a larger number of patients with RCC and other potential functional polymorphisms in linkage disequilibrium are required to test our findings and to establish the role of these polymorphisms in this disease.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Luis Miguel Real (Department of Structural Genomics, Seville, Spain) for critical reading of the statistical analysis. We thank Ms. Anabel Rodríguez and Eva García for technical assistance. The study was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Red Genómica del Cáncer (RETIC RD 06/0020), Plan Andaluz de Investigación (Group CTS 143), Consejería Andaluz de Salud (SAS), Proyecto de Excelencia de Consejería de Innovación (CTS 695), Proyecto de investigación I+D (SAF 2007-63262) in Spain, and the Integrated European Cancer Immunotherapy Project (OJ2004/C158, 518234).

References

- [1] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860–7.
- [2] Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005;7:211–7.
- [3] Ben-Baruch A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:357–71.
- [4] 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;103:3529–34.
- [5] Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22:929–79.
- [6] Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: A counterpoint. *J Leukoc Biol* 2005;78:1043–51.
- [7] Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9465–70.
- [8] Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391–9.
- [9] 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;423:506–11.
- [10] Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1–8.
- [11] Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003;75:711–7.
- [12] Howell WM, Rose-Zerilli MJ. Interleukin-10 polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis. *Fam Cancer* 2006;5:143–9.
- [13] Cozar JM, Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F, Vilchez JR, Tallada M, et al. High incidence of CTLA-4 AA (CT60) polymorphism in renal cell cancer. *Hum Immunol* 2007;68:698–704.

- [14] 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;173:709–12.
- [15] 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; discussion 472; quiz 801.
- [16] Sasieni PD. From genotypes to genes: Doubling the sample size. *Biometrics* 1997;53:1253–61.
- [17] Alonso R, Suarez A, Castro P, Lacave AJ, Gutierrez C. Influence of interleukin-10 genetic polymorphism on survival rates in melanoma patients with advanced disease. *Melanoma Res* 2005;15:53–60.
- [18] Lim S, Crawley E, Woo P, Barnes PJ. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet* 1998;352:113.
- [19] Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: Differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000;1:185–90.
- [20] Rueda B, Roibas B, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Influence of interleukin 10 promoter polymorphisms in susceptibility to giant cell arteritis in Northwestern Spain. *J Rheumatol* 2007;34:1535–9.
- [21] Seifart C, Plagens A, Dempfle A, Clostermann U, Vogelmeier C, von Wichert P, et al. TNF-alpha, TNF-beta, IL-6, and IL-10 polymorphisms in patients with lung cancer. *Dis Markers* 2005;21:157–65.
- [22] Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, et al. The interleukin-10 (-1082A/G) polymorphism is strongly associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2008;28: 309–14.
- [23] Howell WM, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM. IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun* 2001;2:25–31.
- [24] McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62:3369–72.
- [25] Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F, Roth C, Maxwell E, Li Z, et al. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *J Exp Med* 1996;184:579–84.
- [26] Kundu N, Beaty TL, Jackson MJ, Fulton AM. Antimetastatic and antismog activities of interleukin 10 in a murine model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:536–41.
- [27] Kaufman HL, Rao JB, Irvine KR, Bronte V, Rosenberg SA, Restifo NP. Interleukin-10 enhances the therapeutic effectiveness of a recombinant poxvirus-based vaccine in an experimental murine tumor model. *J Immunother* 1999;22:489–96.
- [28] Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: The melanoma experience. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19: 697–703.
- [29] Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007;117:1175–83.

- [30] Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularization and nonlymphoid mesenchymal cell proliferation by macrophage cell lines. *J Leukoc Biol* 1985; 37:279–88.
- [31] Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 2001;193: 727–40.
- [32] Di Carlo E, Coletti A, Modesti A, Giovarelli M, Forni G, Musiani P. Local release of interleukin-10 by transfected mouse adenocarcinoma cells exhibits pro- and anti-inflammatory activity and results in a delayed tumor rejection. *Eur Cytokine Netw* 1998;9:61–8.
- [33] Huang S, Xie K, Bucana CD, Ullrich SE, Bar-Eli M. Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: Potential inhibition of angiogenesis. *Clin Cancer Res* 1996;2:1969–79.

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

Pablo Sáenz-López a,* , Rafael Carretero a,* , Fernando
Vazquez b, Javier Martin c, Elena SÂnchez c, Miguel
Tallada b, Federico Garrido a, José Manuel Cózar b,
Francisco Ruiz-Cabello a.

*a Servicio de Anàlisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las,
Nieves, Granada, Spain*

b Servicio de Urología, Hospital Universitario Virgen de las, Nieves, Granada, Spain

c Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Granada, Spain

Human Immunology 71 (2010) 309–313

Abstract

Current evidence suggests that chronic inflammation is associated with tumor development and progression. Interleukin-18 (IL-18) plays a central role in inflammation and the immune response, contributing to the pathogenesis and pathophysiology of infectious and inflammatory diseases. The objective of this study was to determine whether the presence of *IL-18* polymorphisms -137 G/C (rs187238) and -607 A/C (rs1946518) was associated with size, grade, TNM stage, and survival in patients with renal cell carcinoma (RCC). The study cohort included 158 patients with RCC. Control group consisted of 506 samples from Spanish population. The studied *IL-18* gene polymorphisms did not influence susceptibility to RCC in the analyzed group of patients (*IL-18*-607, $p=0.318$; *IL-18*-137 $p=0.740$) but may contribute to disease onset and aggressiveness. *IL-18*-607 CC genotype was significantly associated with higher tumor size ($p=0.001$), grade ($p=0.030$), T ($p=0.001$), M ($p=0.012$), and stage ($p=0.002$). *IL-18*-103 GG genotype was correlated with higher tumor size ($p=0.036$), grade ($p=0.017$), T ($p=0.026$), and stage ($p=0.011$). The Cox proportional hazard model showed that nuclear grade and stage grouping were independent prognostic factors but *IL-18* polymorphism was not. Polymorphism variants in the *IL-18* gene (*IL-18*-607 and *IL-18*-137) may be associated with a worse prognosis for RCC. High levels of *IL-18* production may play a major role in the growth, invasion and metastasis of renal cancer.

Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common renal tumor and represents 2% – 3% of all malignancies. RCC is two fold more frequent in men than in women, and the highest RCC incidence is observed in the sixth decade [1]. Considerable evidence has been published over the past few years linking increased tumor risk with inflammation, and clinical and experimental studies have associated tumor progression with the upregulation of proinflammatory molecules, especially during late stages of the disease [2,3]. Chronic inflammation, alongside the intrinsic properties of premalignant cells and other determinants, may be one of the driving forces of tumor initiation and promotion. Thus, numerous mediators released in dysregulated chronic inflammation were found to promote cell growth and invasion, inducing mutagenesis and increasing angiogenicity [4]. In this context, genetic polymorphisms in different inflammatory cytokine have been

associated with cancer risk and the growth or invasiveness of RCC and others types of tumor [5–7].

Interleukin (IL)-18 was discovered as an interferon (IFN)- γ - inducing factor. IL-18 is a member of the IL-1 family, and its receptor belongs to the IL-1 receptor family. When IL-18 binds to IL-18R β , IL-18R β transduces its signal to stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway, which is involved in producing IFN- γ [8]. IL-18 can activate immune cells, with or without IL-12 [9], promoting the activation and proliferation of T and natural killer cells [10,11]. Transformed cells and tumors are effectively eliminated by IL-18-mediated activation of immune cells such as cytotoxic T cells and natural killer cells [12]. Intratumoral injection of IL-18 DNA enhances IFN- γ production, causes regression of liver tumor and has been proposed as a cancer treatment [13]. B7-1 costimulatory molecule in combination with IL-18 was used by Cho et al. against malignant skin tumors, including melanoma [14].

However, IL-18 can also promote tumor cells, as evidenced by the elevated expression of IL-18 in tumor cells [15,16]. IL-18 expression was also elevated in the tumor versus nontumor area in gastric cancer patients and was related to distant metastasis [17].

Higher IL-18 levels were found in serum from breast cancer patients with than without metastasis and were proposed as an important marker of breast cancer progression [18]. It also enhances immune escape by promoting the expression of Fas ligand in tumor cells and downregulating major histocompatibility complex class I expression [19, 20].

We have described previously that the proangiogenic function of other interleukins (e.g., IL-10) [6] could have an important role in RCC growth and metastasis. IL-18 plays a major role in angiogenesis. The induction of IL-18 by hypoxia or inflammatory cells augments the expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and tumor cell metastases [21]. IL-18 proangiogenic functions are essential for tumor growth [22].

Hence, IL-18 can stimulate the immune system against tumor cells but can also induce angiogenesis, metastasis, proliferation, and immune escape [23]. The objective of this study was to determine the role in RCC of two single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IL-18 promoter region, which are known to alter IL-18 promoter activity. Allele C

at -607 position and allele G at -137 position (-607 A/C [rs1946518] and -137 G/C [rs187238], respectively) are correlated with higher serum levels of IL-18 [24].

Subjects and methods

Patients

The study included 158 patients diagnosed with clear-cell renal carcinoma (RCC) at the Department of Urology of Virgen de las Nieves Hospital between 1997 and 2008. All patients had undergone radical or partial nephrectomy. The mean age was 60 years (range, 23–84 years). Clinicopathological characteristics are shown in Table 1. Two consulting pathologists retrospectively and independently reviewed the hematoxylin and eosin-stained tissue slides according to the World Health Association classification. The Fuhrman scale was used to assess nuclear grade. Tumor stage was assigned according to the 2002 TNM classification. The 5-year survival rate was 95% in patients with localized cancer (T1–2 N0M0), 80% in patients with locally advanced stage (T3N0–1M1), and 40% in patients with metastatic cancer (T1–2 N2 or M1). Patients were actively followed up from diagnosis to December 2008. Cancer characteristics were gathered according to the University of California, Los Angeles integrating staging system, which includes TNM stage, histologic grade (Fuhrman), and performance status as prognostic factors. Only the first two parameters were assessed, because a performance status higher than zero was found in only a very low percentage of patients and was not deemed relevant for the statistical analysis [25]. No other risk factors for an adverse prognosis were evaluated. The control group comprised 506 healthy blood donors from the Spanish Bone Marrow Donor Registry, with a mean age of 45 years (± 2.75). Control samples were collected between 2005 and 2006. All patients and controls were Caucasian and of Spanish origin, and all signed informed consent to participate in this study, which was approved by the ethics committee of our hospital.

DNA extraction and IL-18 genotyping

Total genomic DNA was isolated from peripheral blood of renal cancer patients and healthy controls using the QIAamp DNA Mini kit. The genotyping of the two IL-18 polymorphisms was performed using predesigned TaqMan SNP Genotyping Assays

(Applied Biosystems, Foster City, CA). The Assays-on-Demand SNP genotyping kit was used for the polymerase chain reaction (Applied Biosystems). Single-nucleotide polymorphism amplification assays were performed according to the manufacturer's instructions. In brief, 25 µl of reaction solution containing 10 ng of DNA was mixed with 12.5 µl of 2x TaqMan Universal PCR Mix (Applied Biosystems) and 1.25 µl of predeveloped assay reagent from the SNP genotyping product (Applied Biosystems) containing two primers and two MGB TaqMan probes. Reaction conditions consisted of preincubation at 50°C for 2 minutes and at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and at 60°C for 1 minute. Amplifications and analysis were performed in an ABI Prism 7,500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), using the SDS 1.4 software for allelic discrimination (Applied Biosystems). The following single-nucleotide polymorphisms were typed: IL-18-137 G/C (rs187238) and IL-18-607 A/C (rs1946518).

Statistical analysis

SNP allele frequencies were tested against departure from Hardy–Weinberg equilibrium before analysis. Genotype frequencies were compared using the Pearson χ^2 -test for the 2 X 2 tables or Fisher's exact test when the expected frequency value was <5 . Patients were classified in a dichotomous manner for each of the following clinical parameters: tumor diameter, nuclear grade, tumor stage, lymph node metastasis, distant metastasis, stage grouping, and survival. The distribution of the polymorphism for each parameter was studied by analyzing genotype group and allele frequency. Odds ratios (ORs) and significance (p values) were also calculated. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The SPSS version 15.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for analyses. The power of the study to detect the effect of a polymorphism on disease susceptibility was estimated by means of Granmo 5.0 software (Department of Preventive Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA). The influence of each variable on survival was assessed by means of the Cox proportional hazard model. The power was estimated as $z - \alpha - 1.96$ and $OR > 2$, based on frequencies in the general population of southern Spain. The power of all analyses was > 0.80 .

Results

IL-18 genotypes and cancer risk

This case-control study revealed similar frequencies in the distribution of IL-18-137 and -607 polymorphisms between healthy controls and patients with RCC ($p=0.1$ and $p=0.3$, respectively, for allele frequencies). Table 2 presents the genotype distributions and statistical analysis.

Table 1
Clinicopathologic characteristics of renal cell carcinoma patients

Age, yr	Median (range)	60.82 (14–89)
Gender (%)	Male	93 (58.9)
	Female	65 (41.1)
Tumor size	Median (range)	7.14 (1–20)
	≤6	75 (47.5)
	>6	78 (49.4)
	Unknown	5 (3.2)
Tumor stage (%)	pT1	71 (44.9)
	pT2	36 (22.8)
	pT3	44 (27.8)
	pT4	4 (2.5)
	Unknown	3 (1.9)
Tumor grade (%)	G1	24 (15.2)
	G2	78 (49.4)
	G3–4	49 (31.0)
	Unknown	7 (4.4)
Lymph node metastasis (%)	Negative	144 (91.1)
	Positive	11 (7.0)
	Unknown	3 (1.9)
Metastasis (%)	Negative	114 (72.2)
	Positive	41 (25.9)
	Unknown	3 (1.9)
Stage (%)	I	64 (40.5)
	II	26 (16.5)
	III	25 (15.8)
	IV	23 (14.6)
	Unknown	20 (12.7)
Histopathology (%)	Clear-cell carcinoma	135 (85.4)
	Papillary renal cell carcinoma	8 (9.5)
	Chromophobe cell carcinoma	15 (5.1)

Table 2

Associations of IL-18 genotypes with tumor risk

IL-18 polymorphisms	RCC patients (%)	Healthy controls	Odds ratio (95% CI)	p*
-137 C/G				
Genotype				
CC	6 (3.8)	31 (6.2)	1.39 (0.55–3.45)	0.486
CG	59 (37.8)	220 (43.8)	1.00 (Reference)	
GG	91 (58.3)	251 (50.0)	0.77 (0.51–1.08)	0.740
Allele				
C	71 (22.8)	282 (28.1)	1.00 (Reference)	
G	241 (77.2)	721 (71.9)	1.32 (0.98–1.78)	0.067
-607 A/C				
Genotype				
AA	19 (12.3)	73 (14.6)	1.12 (0.64–1.96)	0.697
AC	76 (49.4)	261 (52.2)	1.00 (Reference)	
CC	59 (38.3)	166 (33.2)	0.819 (0.55–1.21)	0.318
Allele				
A	114 (37.4)	407 (40.7)	1.00 (Reference)	
C	194 (62.6)	593 (59.3)	1.17 (0.90–1.52)	0.248

CI, confidence interval.

* χ^2 Test or Fisher's exact test.

The observed genotype frequencies were in accordance with Hardy–Weinberg equilibrium. The allele distribution and haplotypes of the control group were previously published [26] and were similar to other reports on Caucasian populations [27]. We found no association of IL-18 -137 or -607 polymorphism with age ($p=0.085$ and $p=0.873$, respectively) or gender ($p=0.310$ and $p=0.530$, respectively). The haplotype estimation for the -607 A/C and -137 IL-18 promoter variants revealed linkage disequilibrium between them [$D=0.57$ and $r^2 = 0.17$].

IL-18 polymorphisms and tumor characteristics

The association of the IL-18 genotypes with tumor size, grade, and stage are shown in Table 3. Genotype GG of IL-18-137 was associated with larger tumors (OR, 2.06; 95% CI, 1.05–4.04; $p = 0.036$), with more advanced cancer stage (OR, 2.55; 95% CI, 1.30–5.23; $p = 0.006$) and with higher (G2–G4) tumor grade (OR, 3.06; 95% CI, 1.19–7.87; $p = 0.017$). IL-18-137 G allele was correlated with more advanced stage (OR, 1.84; 95% CI, 1.07–3.17; $p = 0.026$) and with higher tumor grade (OR, 2.02; 95% CI, 1.02–3.96; $p = 0.040$) the IL-18-607 CC genotype was significantly more frequent in patients with larger tumor (OR, 3.35; 95% CI, 1.60–7.02; $p=0.001$), more advanced cancer stage (OR, 3.60; 95% CI, 1.70–7.64; $p=0.001$) and higher tumor grade (OR, 3.40; 95% CI, 1.06–10.76; $p=0.030$). IL-18-607 C allele was associated with larger tumor (OR, 2.08; 95%

CI, 1.38–3.57; $p=0.002$) and more advanced cancer stage (OR, 2.22; 95% CI, 1.38–3.57; $p = 0.001$).

The associations of the IL-18 genotypes with lymph node metastasis, distant metastasis, and stage grouping are shown in Table 4. IL-18-137 GG genotype was associated with more advanced stage grouping (OR, 3.38; 95% CI, 1.63–7.01; $p=0.001$). IL-18-137Gallele was significantly more frequent in patients with lymph node metastasis (OR, 3.71; 95% CI, 1.06–13.01; $p=0.030$) and II-IV stage grouping (OR, 2.09; 95% CI, 1.19–3.71; $p=0.011$). IL-18-607 CC genotype was associated with distant metastasis (OR, 2.70; 95% CI, 1.22–5.96; $p=0.012$) and advanced stage grouping (OR, 3.44; 95% CI, 1.58–7.48; $p=0.002$).

IL-18 polymorphisms and cancer survival

Twenty-three patients died of cancer-related causes during the follow-up period. Kaplan–Meier curves were calculated for cancerspecific survival by IL-18-607 genotype (AC and CC) (Fig. 1). Patients with AC genotype showed a tendency to more favourable cancer-specific survival than those with CC genotype ($p=0.083$; Log-rank test). The number of AA genotype patients was too small for evaluation. No significant differences were found for the IL-18-137 polymorphism ($p=0.918$; log-rank test). Cox proportional hazard model demonstrated that nuclear grade and stage grouping were independent prognosis factors (Table 5). However, IL-18 polymorphisms, at least in this series of patients, do not serve as independent prognosis factors.

Discussion

The etiology of renal cancer is highly complex and involves both environmental and genetic factors. Chronic inflammation appears to make an essential contribution [28]. In addition, genetic polymorphisms in cytokine genes can influence the expression or function of these cytokines, and polymorphisms in genes that regulate the intensity of immune responses may contribute to the pathogenesis of renal cancer and influence the clinical outcome of patients [6,29]. This study analyzed genetic polymorphisms in IL-18 promoter gene, a proinflammatory cytokine that may influence the immune response, and which has been reported a significant common factor in several cancer types,

including melanoma, stomach, breast, lung, prostate, and colorectal cancer [17–19,30–32]. IL-18 has pleiotropic functions in cancer development and has been reported to both activate tumor progression and contribute to its elimination by the immune system [23].

Table 3
Associations of IL-18 genotypes with tumor size, stage, and grade

IL-18 polymorphisms	Tumor size		Odds ratio (95% CI)	p*	Tumor stage		Odds ratio (95% CI)	p*	Tumor grade		Odds ratio (95% CI)	p*
	≤6 (%)	>6 (%)			pT1 (%)	pT2–pT4 (%)			G1 (%)	G2–G4 (%)		
-137 C/G												
Genotype												
CC	3 (4.0)	3 (3.9)	1.22 (0.28–8.20)	0.623	3 (4.3)	3 (3.6)	1.46 (0.27–7.87)	0.659	1 (4.3)	5 (4.0)	1.59 (0.17–17.24)	0.681
CG	35 (46.7)	23 (30.3)	1.00 (Reference)		35 (50.0)	24 (28.9)	1.00 (Reference)		14 (60.9)	44 (34.9)	1.00 (Reference)	
GG	37 (49.3)	50 (65.8)	2.06 (1.05–4.04)	0.036	32 (45.7)	56 (67.5)	2.55 (1.30–5.23)	0.006	8 (34.8)	77 (61.1)	3.06 (1.19–7.87)	0.017
Allele												
C	41 (27.3)	29 (19.1)	1.00 (Reference)		39 (28.9)	30 (18.1)	1.00 (Reference)		16 (34.8)	54 (20.9)	1.00 (Reference)	
G	109 (72.7)	123 (80.9)	1.60 (0.93–2.74)	0.089	96 (71.1)	136 (81.9)	1.84 (1.07–3.17)	0.026	30 (65.2)	198 (79.1)	2.02 (1.02–3.96)	0.040
-607 A/C												
Genotype												
AA	11 (15.5)	7 (9.0)	0.88 (0.31–2.51)	0.803	11 (16.4)	7 (8.3)	0.76 (0.27–2.18)	0.614	3 (13.0)	14 (11.2)	1.24 (0.32–4.85)	0.753
AC	44 (62.0)	32 (41.0)	1.00 (Reference)		42 (62.7)	35 (41.7)	1.00 (Reference)		16 (69.6)	60 (48.0)	1.00 (Reference)	
CC	16 (22.5)	39 (50.0)	3.35 (1.60–7.02)	0.001	14 (20.9)	42 (50.0)	3.60 (1.70–7.64)	0.001	4 (17.4)	51 (40.8)	3.40 (1.06–10.76)	0.030
Allele												
A	66 (46.5)	46 (29.5)	1.00 (Reference)		62 (47.3)	48 (29.4)	1.00 (Reference)		22 (20.6)	23 (13.1)	1.00 (Reference)	
C	76 (53.5)	110 (70.5)	2.08 (1.29–3.35)	0.002	69 (52.7)	115 (70.6)	2.22 (1.38–3.57)	0.001	85 (79.4)	153 (86.9)	1.69 (0.90–3.18)	0.103

CI, confidence interval.

* χ^2 Test or Fisher’s exact test.

Table 4
Associations of IL-18 genotypes with Lymph node metastasis, metastasis and Stage grouping

IL-18 polymorphisms	Lymph node metastasis		Odds ratio	p*	Metastasis		Odds ratio	p*	Stage grouping		Odds ratio	p*
	Negative (%)	Positive (%)			Negative (%)	Positive (%)			I (%)	II–IV (%)		
-137 C/G												
Genotype												
CC	6 (4.2)	0 (0.0)	0.95 (0.89–1.01)	0.572	4 (3.5)	2 (5.0)	2.18 (0.35–13.51)	0.391	2 (3.2)	3 (4.1)	2.68 (0.41–14.54)	0.287
CG	56 (39.4)	3 (27.3)	1.00 (Reference)		48 (42.5)	11 (27.5)	1.00 (Reference)		34 (54.0)	19 (26.0)	1.00 (Reference)	
GG	80 (56.3)	8 (72.7)	1.87 (0.47–7.35)	0.366	61 (54.0)	27 (67.5)	1.93 (0.87–4.28)	0.102	27 (42.9)	51 (69.9)	3.38 (1.63–7.01)	0.001
Allele												
C	68 (37.0)	3 (13.6)	1.00 (Reference)		54 (24.8)	15 (19.7)	1.00 (Reference)		37 (30.3)	24 (17.4)	1.00 (Reference)	
G	116 (63.0)	19 (86.4)	3.71 (1.06–13.01)	0.030	164 (75.2)	61 (80.3)	1.43 (0.76–2.70)	0.272	85 (69.7)	114 (82.6)	2.09 (1.18–3.71)	0.011
-607 A/C												
Genotype												
AA	18 (12.9)	0 (0.0)	0.95 (0.90–1.00)	0.323	12 (10.9)	6 (14.6)	2.25 (0.72–7.04)	0.156	8 (13.1)	7 (10.8)	1.14 (0.37–3.48)	0.822
AC	73 (52.1)	4 (36.4)	1.00 (Reference)		63 (57.3)	14 (34.1)	1.00 (Reference)		39 (62.3)	30 (40.5)	1.00 (Reference)	
CC	49 (35.0)	7 (63.6)	2.61 (0.72–9.38)	0.131	35 (31.8)	21 (51.2)	2.70 (1.22–5.96)	0.012	14 (24.6)	37 (48.6)	3.44 (1.58–7.48)	0.002
Allele												
A	106 (39.6)	4 (18.2)	1.00 (Reference)		84 (39.6)	26 (33.3)	1.00 (Reference)		55 (45.1)	54 (30.7)	1.00 (Reference)	
C	162 (60.4)	18 (81.8)	2.87 (0.95–8.70)	0.053	128 (60.4)	52 (66.7)	1.41 (0.82–2.42)	0.211	67 (54.9)	104 (69.3)	1.58 (0.97–2.57)	0.064

CI, confidence interval.

* χ^2 Test or Fisher’s exact test.

In the present study, we found no association between IL-18 polymorphisms and a higher risk of renal cancer. However, as in other studies [18,30], these polymorphisms were correlated with more advanced cancer stages. IL-18 promoter polymorphisms have been associated with other cancers, including prostate and colorectal carcinomas [31,32], although other authors found no association between IL-18 polymorphisms and cancer risk [33,34]. Our findings support the recent suggestion that the pleiotropic cytokine IL-18 can exert both anticancerous and pro-cancerous activities [23]. In fact, IL-18 activities

are influenced by the tumor microenvironment. So, IL-18 could exert its antitumor activity by augmenting IFN- γ production particularly in the presence of IL-12 [35]. However, recent data also suggest a procancerous activity for this multifunctional cytokine under certain conditions depending on the tumor immune response at different tumor sites and probable genetic background [8,36]. According to our patient group with RCCs, IL-18 polymorphisms do not appear to be associated with renal cell cancer susceptibility. However, once the tumor appears, high productive IL-18 polymorphism promotes more advanced tumor grade, stage, etc. These results may be explained by the fact that IL-18 induce the production of angiogenic and growth factors [21,37].

We found that a genotype related to higher production of IL-18 is associated with larger size and pT stage of the tumor. It is demonstrated that IL-18 activates HIF [21] and vascular endothelial growth factor [37], and it can activate angiogenesis in tumor nests [23]. Therefore, IL-18 polymorphisms that increase its production would increase angiogenesis and provide adequate nutrients to transformed cells, promoting larger tumors and more advanced Pt stage. IL-18 is also correlated with the progression of the disease. High-production polymorphisms in IL-18 are associated with dedifferentiation of tumor cells, leading to a more advanced tumor grade and stage grouping. Elevated IL-18 expression was found to be correlated with the malignancy of skin cancers [15] and with the progression of breast cancer [18]. Therefore, IL-18 can directly promote proliferation by regulating proliferation stimulators.

IL-18 was recently implicated in the migration of lung cancer [38] and human melanoma cell lines through the generation of region of interest and the mitogen-activated protein kinase pathway [39]. Proinflammatory cytokines also induce adhesion receptors of endothelial cells for cancer cell attachment [40], which is necessary for blood-borne metastasis. In the present study, polymorphisms related to IL-18 production were associated with the development of metastasis and lymph node involvement. Nevertheless, metastasis is a highly complex process that may involve numerous genes. This adds further complexity to the analysis of a specific polymorphism, as each individual gene is likely to contribute only moderately to the risk [41]. This may explain the low correlation found in this study, in which IL-18 production only plays a minor role.

The association between overall survival and IL-18-607 polymorphism was also analyzed. Because the median survival (50% mortality) was not achieved, we cannot confirm or rule out the statistical influence of this variable as a prognostic factor. Although polymorphisms related to IL-18 production were strongly correlated with more advanced stages of renal cell carcinoma, explaining the tendency to an association with death risk [$p = 0.083$], Cox analyses revealed that IL-18 polymorphisms are not independent survival factors. IL-18-137 polymorphism did not influence risk of death in our analyzed patients. We propose that the influence of IL-18-607 polymorphism is more significant than that of IL-18-137, promoting higher-risk phenotypes, as also reported in nasopharyngeal carcinoma [32].

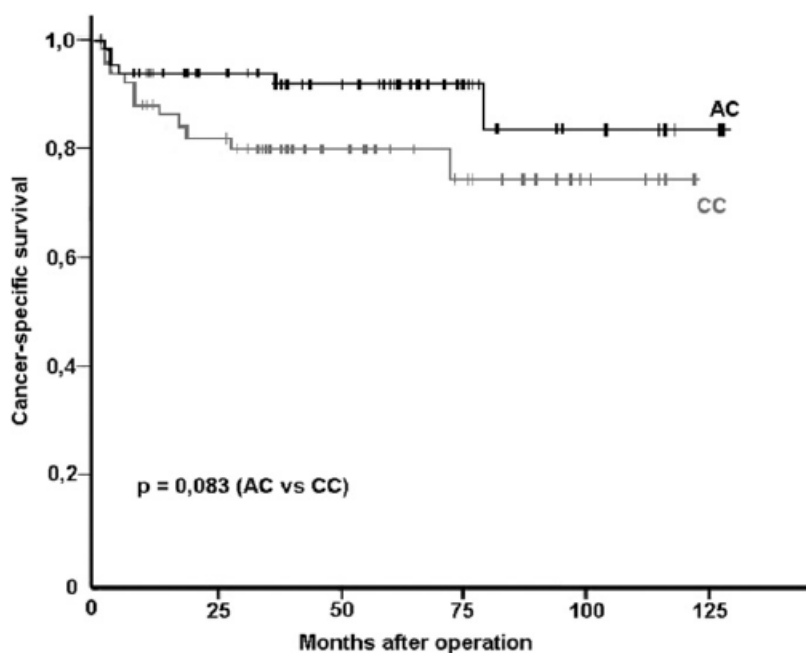


Fig. 1. Kaplan-Meier overall survival estimate according to IL-18-607 polymorphism. Differences between curves was evaluated by means of the long-rank test (p).

Table 5

Multivariate analysis of overall survival in RCC

Variable	B	SE	Wald	df	p	Exp(B)
Nuclear grade	1.377	0.611	5.081	1	0.024	3.962
Stage group	1.587	0.437	13.177	1	0.000	4.891
IL18 -137	-1.833	1.022	3.216	1	0.073	0.160
IL18 -607	0.304	0.446	0.466	1	0.495	1.356

In conclusion, this study found that IL-18 promoter production polymorphisms affect RCC progression and prognosis. IL-18 strongly correlates with higher tumor size, grade and stage, lymph node involvement, distant metastasis, and nonsurvival. These data might contribute to clarifying the mechanisms underlying RCC development and progression. Further research is required to confirm these findings, studying larger patient groups and including other potential functional genetic polymorphisms involved in innate immunity and chronic inflammation. Additional studies could help to identify specific therapies against tumors based on the knowledge of patient genotype. In the case of patients with high productive IL-18 polymorphism genotypes, treatment with pharmacologic inhibitors of the HIF and vascular endothelial growth factor targets could prove effective as a cancer therapy [42].

Acknowledgments

We thank Ms. Eva García and Ms. Ana Isabel Rodríguez for technical assistance. This study was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Red Genómica del Cáncer (RETIC RD 06/0020), Plan Andaluz de Investigación (Group CTS 143), Consejería Andaluz de Salud (SAS), Proyecto de Excelencia de Consejería de Innovación (CTS 695), Proyecto de investigación I+D (SAF 2007-63262) in Spain; and from the Integrated European Cancer Immunotherapy project (OJ2004/C158, 518234).

References

- [1] Mulders P, Figlin R, deKernion JB, Wiltout R, Linehan M, Parkinson D, et al. Renal cell carcinoma: Recent progress and future directions. *Cancer Res* 1997; 57:5189–95.
- [2] Nelson D, Ganss R. Tumor growth or regression: Powered by inflammation. *J Leukoc Biol* 2006;80:685–90.
- [3] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860–7.
- [4] Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005;7:211–7.
- [5] Sáenz-López P, Carretero R, Còzar JM, Romero JM, Canton J, Vilchez JR, et al. Polymorphisms of RANTES, IL1-A, MCP-1 and TNF-A genes in patients with prostate cancer. *BMC Cancer* 2008;8:382.
- [6] Romero JM, Sáenz-López P, Còzar JM, Carretero R, Canton J, Vazquez F, et al. A polymorphism in the interleukin-10 promoter affects the course of disease in patients with clear-cell renal carcinoma. *Hum Immunol* 2009;70:60–4.

- [7] Kawai Y, Sakano S, Korenaga Y, Eguchi S, Naito K. Associations of single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene with the characteristics and prognosis of renal cell carcinomas. *Eur Urol* 2007;52:1147–55.
- [8] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 1995;378:88–91.
- [9] Barbulescu K, Becker C, Schlaak JF, Schmitt E, Meyer zum Büschel KH, Neurath MF. IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN- γ promoter in primary CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 1998;160:3642–7.
- [10] Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1 β for IFN- γ production from human T cells. *Int Immunol* 2000;12:151–60.
- [11] Tomura M, Zhou XY, Maruo S, Ahn HJ, Hamaoka T, Okamura H, et al. A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1+CD3⁺ cells. *J Immunol* 1998;160:4738–46.
- [12] Micallef MJ, Tanimoto T, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M. Interleukin 18 induces the sequential activation of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes to protect syngeneic mice from transplantation with Meth A sarcoma. *Cancer Res* 1997;57:4557–63.
- [13] Chang CY, Lee J, Kim EY, Park HJ, Kwon CH, Joh JW, et al. Intratumoral delivery of IL-18 naked DNA induces T-cell activation and Th1 response in a mouse hepatic cancer model. *BMC Cancer* 2007;7:87.
- [14] Cho D, Kim TG, Lee W, Hwang YI, Cho HI, Han H, et al. Interleukin-18 and the costimulatory molecule B7-1 have a synergistic anti-tumor effect on murine melanoma; implication of combined immunotherapy for poorly immunogenic malignancy. *J Invest Dermatol* 2000;114:928–34.
- [15] Park H, Byun D, Kim TS, Kim YI, Kang JS, Hahm ES, et al. Enhanced IL-18 expression in common skin tumors. *Immunol Lett* 2001;79:215–9.
- [16] Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, Mackay A, Owens J, Okamura H, et al. Interleukin-18 (interferon- γ inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon- γ to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med* 1997;185:1005–12.
- [17] Ye ZB, Ma T, Li H, Jin XL, Xu HM. Expression and significance of intratumoral interleukin-12 and interleukin-18 in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007;13:1747–51.
- [18] Eissa SA, Zaki SA, El-Maghraby SM, Kadry DY. Importance of serum IL-18 and RANTES as markers for breast carcinoma progression. *J Egypt Natl Canc Inst* 2005;17:51–5.
- [19] Cho D, Song H, Kim YM, Houh D, Hur DY, Park H, et al. Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates. *Cancer Res* 2000; 60:2703–9.
- [20] Bubenik J. Tumor MHC class I downregulation and immunotherapy. *Oncol Rep* 2003;10:2005–8.
- [21] Kim J, Shao Y, Kim SY, Kim S, Song HK, Jeon JH, et al. Hypoxia-induced IL-18 increases hypoxia-inducible factor-1 α expression through a Rac1-dependent NF- κ B pathway. *Mol Biol Cell* 2008;19:433–44.

- [22] Kim J, Kim C, Kim TS, Bang SI, Yang Y, Park H, et al. IL-18 enhances thrombospondin- 1 production in human gastric cancer via JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344:1284–9.
- [23] Park S, Cheon S, Cho D. The dual effects of interleukin-18 in tumor progression. *Cell Mol Immunol* 2007;4:329–35.
- [24] Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: A possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol* 2001;112:146–52.
- [25] Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Pantuck AJ, Figlin RA, Belldegrin 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.
- [26] Martin RJ, Savage DA, Carson DJ, Maxwell AP, Patterson CC. Interleukin 18 promoter polymorphisms are not strongly associated with type I diabetes in a UK population. *Genes Immun* 2005;6:171–4.
- [27] Pratesi C, Bortolin MT, Bidoli E, Tedeschi R, Vaccher E, Dolcetti R, et al. Interleukin-10 and interleukin-18 promoter polymorphisms in an Italian cohort of patients with undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:23–30.
- [28] Pratesi C, Bortolin MT, Bidoli E, Tedeschi R, Vaccher E, Dolcetti R, et al. Inflammation and chronic prostatic diseases: Evidence for a link? *Eur Urol* 2007;52: 964–72.
- [29] Cozar JM, Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F, Vilchez JR, Tallada M, et al. High incidence of CTLA-4 AA (CT60) polymorphism in renal cell cancer. *Hum Immunol* 2007;68:698–704.
- [30] Farhat K, Hassen E, Bouzgarrou N, Gabbouj S, Bouaouina N, Chouchane L. Functional IL-18 promoter gene polymorphisms in Tunisian nasopharyngeal carcinoma patients. *Cytokine* 2008;43:132–7.
- [31] Liu Y, Lin N, Huang L, Xu Q, Pang G. Genetic polymorphisms of the interleukin-18 gene and risk of prostate cancer. *DNA Cell Biol* 2007;26:613–8.
- [32] Nikiteas N, Yannopoulos A, Chatzitheofylaktou A, Tsigris C. Heterozygosity for interleukin-18 -607A/C polymorphism is associated with risk for colorectal cancer. *Anticancer Res* 2007;27:3849–53.
- [33] Campa D, Hung RJ, Mates D, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. Lack of association between -251 T – A polymorphism of IL8 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2457–8.
- [34] Vairaktaris E, Serefoglou ZC, Yapijakis C, Agapi C, Vassiliou S, Nkenke E, et al. The interleukin-18 -607A/C polymorphism is not associated with risk for oral cancer. *Anticancer Res* 2007;27:4011–4.
- [35] Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:53–72.
- [36] Vidal-Vanaclocha F, Mendoza L, Telleria N, Salado C, Valcárcel M, Gallot N, et al. Clinical and experimental approaches to the pathophysiology of interleukin-18 in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:417–34.
- [37] Cho ML, Jung YO, Moon YM, Min SY, Yoon CH, Lee SH, et al. Interleukin-18 induces the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via AP-1-dependent pathways. *Immunol Lett* 2006;103:159–66.

- [38] Jiang DF, Liu WL, Lu YL, Qiu ZY, He FC. Function of IL-18 in promoting metastasis of lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2003;25:348–52.
- [39] Jung MK, Song HK, Kim KE, Hur DY, Kim T, Bang S, et al. IL-18 enhances the migration ability of murine melanoma cells through the generation of ROI and the MAPK pathway. *Immunol Lett* 2006;107:125–30.
- [40] Langley RR, Carlisle R, Ma L, Specian RD, Gerritsen ME, Granger DN. Endothelial expression of vascular cell adhesion molecule-1 correlates with metastatic pattern in spontaneous melanoma. *Microcirculation* 2001;8:335–45.
- [41] Balkwill F. Chemokine biology in cancer. *Semin Immunol* 2003;15:49–55.
- [42] Kung AL, Zabudoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, et al. Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer Cell* 2004;6:33–43.

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

Pablo Sáenz-López a,c, Fernando Vazquez b, Jose Manuel Cozar
b, Rafael Carretero a,c , Federico Garrido a,c, Francisco Ruiz
Cabello a,c,

A Departamento de Bioquímica III e Inmunología, Universidad de Granada, Spain

B Servicio de Urología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain

C Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las
Nieves, Granada, Spain

Human Immunology 74 (2013) 98–103

Abstract

Purpose: Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a central role in promoting angiogenesis and is over-expressed in renal cell cancer (RCC). Published data on the association between polymorphisms of vascular endothelial growth factor (e.g., -2578C/A [rs699947], -460T/C [rs833061], +405C/G [rs2010 963], and +936C/T [rs3025039]) and the risk of renal cell carcinoma are ambiguous and controversial. The aim of this investigation was to investigate this relationship in a series of Caucasian Spanish patients.

Materials and methods: A case-control study was performed with 216 cases and 280 controls, genotyping subjects for VEGF polymorphisms using the predesigned TaqMan single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The combined effect of the four gene polymorphisms on overall survival was studied by haplotype analysis.

Results: The overall results suggest that polymorphisms or haplotypes in the VEGF gene do not modify the risk of RCC. We were unable to replicate the association of the -460T/C (rs833061) polymorphism with renal cancer risk. Data were also gathered on clinical-pathological results, tumor size, clinical stage, histological grade, and survival.

Conclusions: According to our analysis of their contribution to prognostic factors, VEGF polymorphisms do not appear to exert a significant influence on RCC progression or prognosis. This finding might be explained by the tumor biology and pathogenesis of clear cell RCC. Additional studies with larger sample sizes are needed in different ethnic groups to further assess this association.

1. Introduction

Angiogenesis is a relatively early event in carcinogenesis [1]. Newly formed blood vessels are formed from endothelial precursors and play a key role in cancer growth, dispose of the metabolic waste products of tumor cells, supply the tumor with nutrients and oxygen, generate paracrine stimuli, and provide potential routes for tumor progression and metastasis [2]. Angiogenesis is regulated by various growth factors, and a critical role is played by the vascular endothelial growth factor (VEGF or VEGF-A), a soluble 34–46 kDa heparin-binding glycoprotein dimer. It specifically binds to

different VEGF receptors (VEGFRs) that belong to the tyrosine-kinase family of receptors on endothelial cells and initiate intracellular signal transduction pathways mediating angiogenesis and vascular permeability [3]. Several experiments found increased VEGF expression to be associated with tumor growth and metastasis, whereas the inhibition of VEGF signaling suppressed tumor-induced angiogenesis and tumor growth [4]. The gene encoding VEGF is located on chromosome 6 and comprises a 14-kb coding region with 8 exons and 7 introns [5]. At least five different isoforms of VEGF are generated by alternative splicing of the VEGF gene [4]. VEGF production has been identified in numerous cells, including macrophages, keratinocytes, megakaryocytes, T cells, smooth muscle cells, basophiles, fibroblasts, mast cells, and neutrophils, and VEGF is expressed in brain, kidney, liver, and spleen, among other tissues [6]. VEGF gene expression is regulated by various effectors, including lipopolysaccharides (LPS), cytokines (e.g., IL-6), hormones (e.g., luteotrophic hormone), and growth factors (PDGF, EGF) as well as by hypoxia [4].

The VEGF is a highly polymorphic gene, and a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been reported [7]. Polymorphisms in its promoter region (loci -2578C/A [rs699947] and -460T/C [rs833061]), 5' -untranslated region (+405C/G [rs2010963]), and 3' -untranslated region (+936C/T [rs3025039]) have been associated with different levels of VEGF expression [8–10]. VEGF SNPs have been implicated in the risk or prognosis of several types of tumors, including cancers of the colon, breast, and prostate, among others [11–13].

VEGF expression is overexpressed in renal cell carcinoma (RCC) in comparison to normal renal tissue [14]. Therapeutic targeting of VEGF (VEGF ligand-binding antibody (bevacizumab) and VEGFR (sunitinib, sorafenib, and pazopanib) in RCC has a strong biological rationale and has shown preliminary clinical efficacy [15]. Given the possible influence of VEGF levels on the effectiveness of therapies, it is of interest to evaluate VEGF polymorphisms and clinical parameters in RCC patients in relation to their response to treatment. Several studies of VEGF polymorphisms and RCC have been carried out in different ethnic groups. One study of VEGF polymorphisms in a Japanese population concluded that some VEGF genotypes may have effects on RCC progression or prognosis, possibly through altered VEGF expression [16], while another suggested that three of the polymorphisms in the 3' -UTR VEGF gene are not associated with RCC

risk or clinical parameters [17]. However, the study of a small Caucasian population indicated that VEGF-460 polymorphism is a risk factor for renal cancer [18]. In summary, previous studies in RCC had smaller sample sizes and their findings have been contradictory, supporting the relevance of the present data, which are based on a wider series. We included VEGF polymorphisms that have proven to have biological significance and are associated with the risk of developing other cancers or diseases. The objective of this case-control study was to investigate the possible role and associations of functional polymorphisms in the VEGF gene in a cohort of 216 Spanish Caucasian patients with RCC.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The study included 216 patients diagnosed with RCC at the Department of Urology of Virgen de las Nieves Hospital between 1997 and 2010. All patients had undergone radical or partial nephrectomy. The mean age was 61.52 years (range, 14–89 years). Clinicopathological characteristics are shown in Table 1. Two consulting pathologists retrospectively and independently reviewed the hematoxylin and eosin-stained tissue slides according to the World Health Association classification. The Fuhrman scale was used to assess nuclear grade. Tumor stage was assigned according to the 2002 TNM classification. The 5-year survival rate was 95% in patients with localized cancer (T1–2 N0M0), 80% in patients with locally advanced stage (T3N0-1M1), and 40% in patients with metastatic cancer (T1–2 N2 or M1). Patients were actively followed up from diagnosis to December 2010. Cancer characteristics were gathered according to the University of California–Los Angeles (UCLA) integrating staging system (UISS), which includes TNM stage, histological grade (Fuhrman), and performance status (ECOG) as prognostic factors. Only the first two parameters were assessed, because a performance status higher than zero was found in only a very low percentage of patients and was not deemed relevant for the statistical analysis [19]. No other risk factors for an adverse prognosis were evaluated. The control group comprised 280 healthy blood donors from the Spanish Bone Marrow Donor Registry, with a mean age of 45 years (± 2.75). The discrepancy in age between patients and controls is not a relevant issue given the low frequency of this tumor in Spain (9 cases/100,000 males and 4 cases/100,000 females),

similar to that in other countries. We therefore do not believe that our results would have been influenced by this factor.

Control samples were collected between 2005 and 2006. All patients and controls were Caucasian and of Spanish origin, and all of them signed informed consent to participate in this study, which was approved by the ethics committee of our hospital.

Table 1
Clinicopathologic characteristics of renal cell carcinoma patients.

Age, yr	Median (range)	61.52 (14–89)
Gender (%)	Male	126 (58.3)
	Female	90 (41.7)
Tumour size (%)	Median (range)	6.91 (1–20)
	≤6	112 (51.85)
	>6	101 (46.75)
	Unknown	3 (1.4)
Tumour stage (%)	pT1	109 (50.7)
	pT2	46 (21.4)
	pT3	53 (24.7)
	pT4	7 (3.3)
	G1	27 (12.5)
Tumour grade (%)	G2	108 (50)
	G3–4	68 (31.5)
	Unknown	13 (6.0)
Metastasis (%)	Negative	161 (74.5)
	Positive	55 (25.5)
Stage (%)	I	108 (50)
	II	40 (18.5)
	III	36 (16.7)
	IV	32 (14.8)
	Clear-cell carcinoma	161 (74.53)
Histopathology (%)	Papillary renal cell carcinoma	36 (16.67)
	Chromophobe cell carcinoma	8 (3.7)
	Mix carcinoma	1 (0.46)
	Unknown	10 (4.64)

2.2. Blood samples and genotyping

Total genomic DNA was isolated from peripheral blood of renal cancer patients and healthy controls using the QIAamp DNA Mini kit. The genotyping of the four VEGF polymorphisms was performed by using predesigned TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). The Assays-on-Demand SNP genotyping kit was used for the PCR reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA). The genotype of each sample was automatically attributed by measuring the allelic specific fluorescence on the 7500 PCR–REAL TIME Sequence Detection System using SDS 2.2.1 software

for allelic discrimination (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). SNP amplification assays were used according to the manufacturer's instructions. Briefly, 10 ng of sample DNA (1 μ l) were placed in 4 μ l of reaction solution containing: 2.5 μ l of the 2 x TaqMan Universal PCR Mix (Applied Biosystems), 0.25 μ l of predeveloped assay reagent from the SNP genotyping product (20x) (Applied Biosystems) containing two primers and two MGB-Taqman probes, and 1.25 μ l of distilled water. Reaction conditions of the PCR were: preincubation at 50 °C for 2 min and at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min. The following SNPs were typed: VEGF -2578C > A (rs699947), -460T > C (rs833061), +405C > G (rs2010 963), and +936C > T (rs3025039). In order to ensure quality in the genotyping, each DNA used was replicated in each plate. The results in both controls and patients were obtained after applying this technique, and all were analyzed at the same time.

2.3. Statistical analysis

SNP allele frequencies were tested against departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) before the analysis. Genotype frequencies were compared by using the Pearson chi-square test for 2 x 2 tables or Fisher's exact test when the expected frequency value was <5. Patients were classified in a dichotomous manner for each of the following clinical parameters: tumor diameter, nuclear grade, tumor stage, stage grouping, and survival. The distribution of polymorphisms was studied as a function of each parameter by analyzing genotype group and allele frequency. Odds ratios (ORs) and p values were also calculated. P < 0.05 was considered significant. The SPSS version 15.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for analyses.

Haploview software (available at <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>) was used for the haplotype analysis and to determine the deviation from HWE of the VEGF polymorphisms, the pairwise linkage disequilibrium (LD), and the haplotype frequencies and blocks. The power of the study to detect the effect of a polymorphism on disease susceptibility was estimated by means of Granmo 5.0 software (IMIM, Barcelona, Spain) as z-alfa = 1.96 and OR = 2, based on frequencies and homozygous genotypes for the germinal alleles in the general population of southern Spain. The power of allele G in the SNP + 405, allele T in the SNP - 460, allele C in the SNP - 2578, and allele T in the SNP + 936 was 0.99 in all cases. The predictive power of the genotypes (GG vs. CG + CC) for SNP + 405, (TT vs. CT + CC) for SNP - 460, (CC vs. CA + AA) for SNP -

2578, and (CC vs. CT + TT) for SNP + 936 were 0.98, 0.98, 0.97, and 0.98, respectively.

3. Results

3.1. VEGF genotypes and cancer risk

The study included 216 patients recently diagnosed with RCC and 280 blood donors (controls). Table 2 shows the genotype and allelic distributions of the polymorphisms in cases and controls with the estimated ORs. On occasions, polymorphisms could not be genotyped because of PCR amplification problems, explaining discrepancies in the numbers of cases and controls for some polymorphisms. As shown in Table 2, similar frequencies in the distribution of VEGF +405C > G (rs2010963), -460T > C (rs833061), -2578C > A (rs699947), and +936C > T (rs3025039) polymorphisms were found between healthy controls and RCC patients ($p=0.748$, $p=0.835$, $p=0.627$, and $p=0.432$, respectively, for genotyping frequencies and $p=0.612$, $p=0.55$, $p=0.342$, and $p=0.634$, respectively, for allelic frequencies). VEGF genotypes were grouped (-2578 AA vs. [AC + CC] or CC vs. [AC + AA], -460 TT vs. [TC + CC] or CC vs. [TC + TT], +405 CC vs. [CG + GG] or GG vs. [CG + CC] and +936 CC vs. [CT + TT] or TT vs. [CT + CC]) for comparison between RCC and control patients, and no significant association with cancer risk was detected (data not shown). SNP genotypes were tested for departures from HWE in controls and all SNPs were in HWE (data not shown). We found no association between RCC and any of the four individual SNPs.

LD values of VEGF polymorphisms at loci -2578, -460, +405, +936 are depicted in Fig 1. Strong LDs were found between loci -2578 and -460 ($D' = 0.99$ $r^2 = 0.97$), between loci -2578 and +405 ($D' = 0.82$ $r^2 = 0.27$), and between loci +405 and -460 ($D' = 0.82$ $r^2=0.28$). However, linkages of VEGF +936 SNP with the other SNPs were weak ($D' < 0.5$). Four haplotypes were found for the three SNPs in higher pairwise linkage

Table 2
Associations of VEGF genotypes with tumour risk.

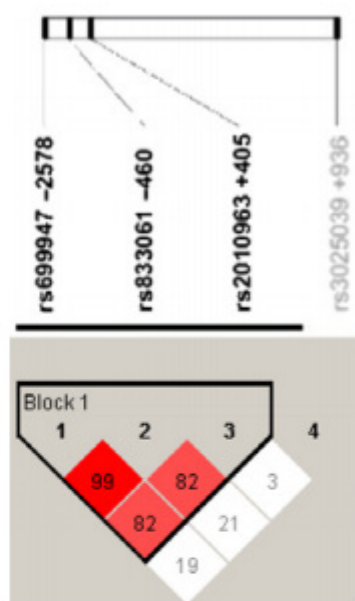
VEGF polymorphisms		RCC patients (216) (%)	Healthy controls (280) (%)	<i>p</i> ^a	Odds ratio (95% CI)	<i>p</i> ^a
+405 (C/G)	<i>Genotype</i>			0.748	1.288 (0.63–2.396)	0.26
	CC	20 (9.3)	32 (11.5)			
	CG	93 (43.5)	118 (42.3)			
	GG	101 (47.2)	129 (46.2)			
	<i>Allele</i>					
	C	133 (31.1)	182 (32.6)	1.072 (0.819–1.404)	0.612	
	G	295 (68.9)	376 (67.4)			
-460 (C/T)	<i>Genotype</i>			0.835	0.941 (0.599–1.481)	0.442
	CC	49 (22.7)	58 (22.8)			
	CT	111 (51.4)	138 (50.5)			
	TT	56 (25.9)	77 (28.2)			
	<i>Allele</i>					
	C	209 (48.4)	254 (46.6)	1.078 (0.838–1.387)	0.55	
	T	223 (51.6)	292 (53.4)			
-2578 (A/C)	<i>Genotype</i>			0.627	0.876 (0.553–1.387)	0.327
	AA	48 (22.2)	53 (19.5)			
	AC	114 (52.8)	142 (52.2)			
	CC	54 (25)	77 (28.3)			
	<i>Allele</i>					
	A	210 (48.6)	248 (45.6)	1.130 (0.878–1.454)	0.342	
	C	222 (51.4)	296 (54.4)			
+936 (C/T)	<i>Genotype</i>			0.432	1.030 (0.689–1.539)	0.483
	CC	156 (72.6)	200 (71.4)			
	CT	57 (26.5)	73 (26.1)			
	TT	2 (0.9)	7 (2.5)			
	<i>Allele</i>					
	C	369 (85.8)	473 (84.5)	1.089 (0.766–1.548)	0.634	
	T	61 (14.2)	87 (15.5)			

CI = confidence interval.
^a χ^2 test or Fisher's exact test.

disequilibrium (VEGF -2578/-460/+405). The frequencies of haplotypes at loci -2578/ -460/+405 were 44% (ACC), 29.2% (CTC), 23.6% (CTG), and 3.2% (ACC). Given that a haplotype frequency <5% was not considered relevant, the haplotype analyses for the -2578/-460/+405 did not provide evidence of an association with RCC risk (Fig. 1) or any clinical parameter studied (tumor size, stage, grade, metastasis, or stage grouping) (data not shown).

3.2. VEGF polymorphisms and tumor characteristics

We found no association of VEGF +405, -460, -2578, or +936 polymorphisms with age (*p*=0.741, *p*=0.855, *p*=0.709, or *p*=0.329, respectively) or gender (*p*=0.402, *p*=0.422, *p*=0.620, *p*=0.222). The association of VEGF genotypes with tumor characteristics is shown in Table 3. The genotyping frequency of VEGF +405, -460, -2578, or +936 polymorphisms was not associated with tumor size (*p*=0.639, *p*=0.635, *p*=0.146, *p*=0.396), tumor stage (*p*=0.735, *p*=0.211, *p*=0.257, *p*=0.367), nuclear grade (*p*=0.318, *p*=0.451, *p*=0.762, *p*=0.471), metastasis (*p*=0.21, *p*=0.221, *p*=0.287, *p*=0.703), or stage grouping (*p*=0.603, *p*=0.118, *p*=0.236, *p*=0.361).



Haplotype (-2578/-460/+405)	Frequency (%)	Chi Square	P Value
ACG	44	2.87	0.0902
CTC	29.2	0.178	0.6727
CTG	23.6	2.308	0.1287
ACC	3.2	6.602	0.0102

Fig. 1. Haplotype analyses for the VEGF polymorphisms ($-2578/-460/+405$). The top figure shows LD patterns of VEGF 4 SNPs estimated as \hat{D} . There was strong LD between SNPs $-2578C > A$ (rs699947) and $-460 T/C$ (rs833061). Haplotype frequencies and haplotype association analyses were estimated by the Haploview program as shown in the table.

Table 3
Associations of VEGF polymorphisms with tumor size, tumor stage, tumor grade, metastasis and stage grouping.

VEGF polymorphisms	TUMOR SIZE ($\leq 6 \rightarrow > 6$) p^a	TUMOR STAGE (PT1/PT2-PT4) p^a	TUMOR GRADE (G1/G2-G4) p^a	METASTASIS (NEGATIVE/POSITIVE) p^a	STAGE GROUPING (I/II-IV) p^a
+405 (C/G)	0.639	0.735	0.318	0.210	0.603
+405C (CC/CG + GG)	0.252	0.493	0.882	0.221	0.206
+405G (CC + CG/GG)	0.505	0.566	0.107	0.192	0.593
-460 (C/T)	0.635	0.211	0.451	0.221	0.188
-460C (CC/CT + TT)	0.142	0.184	0.622	0.67	0.219
-460T (CC + CT/TT)	0.41	0.65	0.364	0.233	0.52
-2578 (A/C)	0.146	0.257	0.762	0.287	0.236
-2578A (AA/AC + CC)	0.11	0.183	0.710	0.90	0.216
-2578C (AA + AC/CC)	0.56	0.86	0.604	0.262	0.7
+936 (C/T)	0.396	0.367	0.471	0.703	0.361
+936 (CC/CT + TT)	0.273	0.254	0.270	0.553	0.247
+936 (CC + CT/TT)	0.426	0.534	0.594	0.562	0.483

CI = confidence interval.

^a χ^2 test or Fisher's exact test.

3.3. VEGF polymorphisms and cancer survival

We studied the influence of each variable on survival. A total of 38 patients died of cancer-related causes during the study period, and 35 patients died of cancer-related causes during the follow-up period (median follow-up of 50.09 months; range, 0–158 months). As shown in Table 4, no association was found between the genotyping

frequency of VEGF +405, -460, -2578, or + 936 polymorphisms and overall survival (p=0.902, p =0.964, p=0.872, p=0.32, respectively) (Table 4).

4. Discussion

VEGF, a growth factor that regulates angiogenesis, is known to play a central role and serve as an important prognostic factor in cancers of the colorectum and breast [11,12]. In clear cell RCC, VEGF and its related pathway elements drive tumor angiogenesis, and inhibition of VEGF has been pursued as a therapeutic target [15]. There is strong evidence of von Hippel–Lindau (VHL) tumor suppressor gene inactivation leading to VEGF overexpression in the majority of clear cell RCC tumors [4], and the vast majority of fresh frozen tumor samples have demonstrated VEGF overexpression [20]. Furthermore, several studies in RCC have reported that VEGF expression is significantly and positively correlated with tumor size, tumor stage, and nuclear grade [21,22]. Jacobsen et al. showed that serum VEGF was significantly associated with tumor stage, grade, and adverse survival in patients with RCC [21].

Table 4
Survive analysis.

VEGF polymorphisms	Log rank (Mantel–Cox)
+405 (C/G)	0.902
+405C (CC/CG + GG)	0.869
+405G (CC + CG/GG)	0.651
–460 (C/T)	0.964
–460C (CC/CT + TT)	0.800
–460T (CC + CT/TT)	0.989
–2578 (A/C)	0.872
–2578A (AA/AC + CC)	0.662
–2578C (AA + AC/CC)	0.885
+936 (C/T)	0.320
+936 (CC/CT + TT)	0.489
+936 (CC + CT/TT)	0.149

The VEGF gene is highly polymorphic [7]. Numerous studies on cancer have focused on the polymorphisms examined in the present investigation because of their role in the production of this cytokine. Results of the few studies on the association of VEGF SNPs with the characteristics or survival of RCC patients have been controversial, and there has been no previous Spanish case-control study exploring this relationship. We found no significant differences in allele or genotype frequencies or in haplotype distributions

between RCC patients and controls, suggesting that the genotypes examined do not contribute to renal cancer. In the present study, the -460 polymorphism did not modify the risk of RCC development, in disagreement with the report by Bruyere et al. in another series of Caucasians with RCC [18]. However, in our larger sample of patients, the genotype distribution in cases and controls did not significantly deviate from the HWE, whereas Bruyere et al., who reported a strong association between polymorphism -460 T/ C (rs833061) and RCC risk, found a significant Hardy–Weinberg disequilibrium. The deviation might indicate a genotyping assay problem because they used polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis for genotyping, which is reported to have poor accuracy and reproducibility [23]. The comparative strengths of the present study include the ethnic homogeneity of the study population and the large number of cases. Our genotyping results are in agreement with findings in other series of controls in Spanish populations [24,25], and the identified haplotypes and their frequency are similar to findings in another Caucasian population [26].

Polymorphisms in the VEGF gene have been associated with a number of different characteristics of cancer. In general, the impact of these polymorphisms varies according to the ethnicity and type of cancer [27,11]. None of the single polymorphisms (VEGF -2578, -460, +405, or +936) or haplotypes were significantly associated with the risk of prostate cancer, breast cancer, or gastric cancer [13,28,29]. Different results between ethnic groups have also been reported for RCC, finding CA and CA + AA genotypes of -2578C/A to be weakly associated with less frequent lymph node metastasis and significantly associated with favorable cancer-specific survival in a Japanese population [16] but not in a Caucasian population, although the latter comprised only 51 cases [18]. In our Caucasian population, no correlation was found with any VEGF genotype or haplotype.

Therefore, we conclude that the VEGF polymorphisms studied here are not associated with the risk of RCC or the behavior of this cancer. Given the importance that VEGF proteins appear to have in the generation and preservation of tumor vasculature and their special relevance in RCC, with the overexpression of VEGF in most tumor samples, it may seem surprising that none of the studied polymorphisms modified the risk or clinical course of RCC. However, the influence that the polymorphisms can have on

VEGF expression in tumor tissue may be changed by the biology of RCC itself. In this cancer, an abnormal pVHL function would constitutively induce a permanent dysregulation of HIF- α , a positive regulator of the transcription of hypoxia-inducible genes, including VEGF [4]. This biallelic VHL gene inactivation, observed in clear cell RCC, would explain the overexpression of this cytokine (at least in the tumor tissue) in the majority of clear cell RCCs (which represented 74.53% of our series), regardless of genetic variations. Therefore, we favor the hypothesis that the VEGF gene is not regulated normally in clear cell RCC and that the overproduction of this cytokine results from upregulation produced by the permanent expression of HIF- α in clear cell RCC, overriding the possible effect of genetic polymorphisms on VEGF gene expression.

In conclusion, according to our analysis of their contribution to prognostic factors, VEGF polymorphisms do not appear to exert a significant influence on RCC progression or prognosis, at least in the Spanish population. However, because VEGF is highly polymorphic, we cannot rule out the possibility that other VEGF polymorphisms might contribute to disease susceptibility. The statistical power of our study is sufficient to conclude that the VEGF polymorphisms analyzed are not likely to be associated with RCC risk in this the Spanish population. However, because of the small sample size of the stratified patient groups, the association of these polymorphisms with some clinicopathological RCC features cannot be ruled out. For this reason, further genotyping studies are warranted in a larger number of patients and controls, stratified by ethnicity, gender, etiology, and tumor location, in order to fully elucidate the relationship of VEGF polymorphisms with RCC risk and clinicopathological characteristics of the disease.

Acknowledgments

The authors thank Eva García, Antonia Moreno and Ana Isabel Rodríguez for technical assistance. They are also grateful to the Tumor-Tissue Biobank of Virgen de las Nieves University Hospital for providing study samples. This investigation was partially supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (08/0528 and PI11/01386), Red Genómica del Cáncer (RETICRD 06/020), Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI-0080- 2010), Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (P08-TIC-4299), Dirección General de Investigación y Gestión del

Plan Nacional I+D+i (TIN2009-13489), Proyecto de Investigación de Excelencia (CTS-3952, CVI-4740 and P06/-CTS- 02200), Plan Andaluz de Investigación (PAI, Group CTS), the European Searchable Tumor Cell Line Database (ESTDAB) project, contract No. QLRI-CT-2001-01325 (<http://www.ebi.ac.uk/estdab>), the European Network for the identification and validation of antigens and biomarkers in cancer and their application in clinical tumor immunology (ENACT) project (European community LSHC-CT-2004-503306), and the Cancer Immunotherapy project (European community OJ 2004/c158,18234).

References

- [1] Galligioni E, Ferro A. Angiogenesis and antiangiogenic agents in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;34:3.
- [2] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249.
- [3] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669.
- [4] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9.
- [5] 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.
- [6] Berse B, Brown LF, Van De Water L, et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992;3:211.
- [7] Jakubowska A, Gronwald J, Menklszak J, et al. The VEGF_936_C > T 30 UTR polymorphism reduces BRCA1-associated breast cancer risk in Polish women. *Cancer Lett* 2008;262:71.
- [8] Brogan IJ, Khan N, Isaac K, et al. Novel polymorphisms in the promoter and 50 UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol* 1999;60:1245.
- [9] 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 plasma levels. *J Vasc Res* 2000;37:443.
- [10] 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 production. *Cytokine* 2000;12:1232.
- [11] 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.
- [12] 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.

- [13] Langsenlehner T, Langsenlehner U, Renner W, et al. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the gene for vascular endothelial growth factor and risk of prostate cancer. *Eur J Cancer* 2008;44:1572.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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* 2001;77:55.
- [21] Jacobsen J, Rasmuson T, Grankvist K, et al. Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol* 2000;163:343.
- [22] Paradis V, Lagha NB, Zeimoura L, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 2000;436:351.
- [23] Ding C, Cantor CR. Direct molecular haplotyping of long-range genomic DNA with M1-PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7449.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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. 102 P. Sáenz-López et al. / *Human Immunology* 74 (2013) 98–103
- [27] Heist RS, Zhai R, Liu G, et al. VEGF polymorphisms and survival in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:856.
- [28] Wang K, Liu L, Zhu ZM, et al. Five polymorphisms of vascular endothelial growth factor (VEGF) and risk of breast cancer: a meta-analysis involving 16,703 individuals. *Cytokine* 2011;56:167.
- [29] Zhou Y, Li N, Zhuang W, Wu X. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms and gastric cancer risk in a Chinese Han population. *Mol Carcinog* 2011;50:184.

Otros polimorfismos analizados en cáncer renal

En este apartado se incluyen otros polimorfismos analizados para su posible asociación con riesgo y progresión en el cáncer renal. Corresponden a resultados no publicados o recogidos en la revisión (Sáenz López et al. 2009) que no hemos considerado en esta tesis. Los polimorfismos están relacionados con genes y moléculas claves en el desarrollo y regulación de las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. En la tabla se recogen los resultados negativos que se obtuvieron en cáncer renal, y que en algunos casos los diferencian de los obtenidos por nuestro grupo en otros tumores urológicos que se han estudiado (Sáenz López et al. 2008; Guirado et al. 2012). Las diferencias en el número de casos/controles incluidos en cada polimorfismo corresponden en realidad a las diferentes etapas en las que estos estudios fueron llevados a cabo. Los polimorfismos analizados fueron los siguientes: **IL4-590 C/T** (rs2243250), **TNF-A -308 A/G** (rs1800629), **RANTES-403 G/A** (rs2107538), **IL1A -889 C/T** (rs1800587), **MCP-1 2518 G/A** (rs1024611), **NOD2 A/G** (rs9302752), **RIPK2 A/T** (rs42490), **TOLR2 A/G** (rs5743708), **TOLR3 C/T** (rs3775291), **TOLR3 A/T** (rs5743305), **TOLR7 A/T** (rs179008), **TOLR7 G/T** (rs2302267), **TOLR8 A/G** (rs5744082), **TOLR8 A/G** (rs3764880), **TOLR-9 C/T** (rs352140), **TOLR10 T/C** (rs412009), **TOLR10 T/G** (rs 11096955), **CD16A (FcγRIIIa*559 A /C)**, (rs396991), **CD32A (FcγRIIa*519 A / G)** (rs1801274), **IL23R A/G** (rs11209026), **FAS-13377 A/G** (rs2234767), **FASL-844 C/T** (rs 763110), **IL-28B** (rs12979860).

Resultados

El estudio de todos los polimorfismos no reveló asociación con riesgo de padecer cáncer de riñón. En la **tabla 1-4** se muestra un resumen del estudio para el riesgo de padecer cáncer renal de los polimorfismos estudiados. Los resultados de los polimorfismos de las moléculas implicadas en respuesta de la inmunidad innata (TNF, IL-1) y adaptativa (CTLA4), quimiocinas quimioatrayentes (RANTES, MCP-1) y respuesta Th2 (IL-4) están publicados en el trabajo anteriormente citado (Sáenz López P et al. 2009). Hemos realizado agrupaciones de los diferentes genotipos de cada polimorfismo y tampoco hemos encontrado ninguna asociación con riesgo ni con ninguno de las características clinicopatológicas (sexo, edad, estadio, el tamaño del tumor y el grado nuclear). No se

vio ninguna asociación entre la progresión tumoral y supervivencia con los polimorfismos estudiados.

Citoquinas	GENOTIPO	Control	Casos	P*
Respuesta inmunidad innata				
RIPK-2	AA	52 (28%)	44 (28.8%)	0.957
	AT	99 (53.2%)	79 (51.6%)	
	TT	35 (18.8%)	30 (19.6%)	
NOD-2	GG	132 (47.1%)	122 (56.7%)	0.71
	AG	126 (45%)	83 (38.6%)	
	AA	22 (7.9%)	10 (4.7%)	
IL-28B	CC	98 (51.3%)	78 (51%)	0.640
	CT	70 (36.6%)	61 (39.9%)	
	TT	23 (12%)	14 (9.2%)	

Tabla 1: los polimorfismos estudiados de quimiocinas de la respuesta de la inmunidad innata.

Citoquinas	GENOTIPO	CONTROL	CASOS	P*
Receptores Fc				
CD16A	CC	19 (9.9%)	22 (14.5%)	0.417
	CA	105 (55%)	77 (50.7%)	
	AA	67 (35.1%)	53 (34.9%)	
CD32A	AA	54 (28.2%)	44 (29.2%)	0.478
	AG	88 (45.8%)	76 (50.3%)	
	GG	50 (26%)	31 (20.5%)	

Tabla 2: los polimorfismos estudiados de receptores de patógen Fc

Citoquinas		CONTROL	CASOS	P*
Receptores de patógenos/stress celular				
TOLR2	AG	4 (2.1%)	6 (3.9%)	0.350
	GG	187 (97.9%)	147 (96.1%)	
TOLR3	TT	19 (9.9%)	13 (8.7%)	0.833
	TC	75 (39.1%)	63 (42%)	
	CC	98 (51%)	74 (49.3%)	
TOLR3	AA	29 (15.2%)	21 (14.1%)	0.937
	AT	92 (48.2%)	71 (47.7%)	
	TT	70 (36.6%)	57 (38.3%)	
TOLR7	AA	138 (71.9)	102 (68.5%)	0.494
	AT	27 (14.1%)	19 (12.8%)	
	TT	27 (14.1%)	28 (18.8%)	
* TOLR7	GG+GT	11 (5.9%)	9 (6%)	1
	TT	175 (94.1%)	141 (94%)	
TOLR8	TT	110 (57.9%)	94 (63.1%)	0.254
	TC	40 (21.1%)	21 (14.1%)	
	CC	40 (21.1%)	34 (22.8%)	
TOLR9	CT	145 (75.5%)	111 (75.5%)	1
	TT	47 (24.5%)	36 (24.5%)	
TOLR10	AA	96 (50%)	77 (52%)	0.492
	AG	81 (42.2%)	55 (37.2%)	
	GG	15 (7.8%)	16 (10.8%)	
TOLR10	TT	54 (28.1%)	43 (29.1%)	0.501
	TG	99 (51.6%)	68 (45.9%)	
	GG	39 (20.3%)	37 (25%)	

Tabla 3: los polimorfismos estudiados de receptores de patógenos y stress celular.*El test estadístico utilizado fue la chi-cuadrado de Pearson o Fisher, según criterio de aplicabilidad. Para poder utilizar Fisher se tuvo que agrupar las categorías de algunas variables.

Citoquinas	GENOTIPO	CONTROL	CASOS	P*
Respuesta TH17				
* IL23R	AA+AG	23 (10.8%)	13 (8.5%)	0.430
	GG	189 (89.2%)	140 (91.5%)	
Regulación negativa de la activación de linfocitos T y apoptosis				
* FAS-1377	AA+AG	29 (16.9%)	27 (23.5%)	0.174
	GG	143 (83.1%)	88 (76.5%)	
FASL-844	CC	58 (33%)	48 (41.4%)	0.302
	CT	78 (44.8%)	49 (42.2%)	
	TT	38 (21.8%)	19 (16.4%)	
PTPN22	AG	19 (9.9%)	11 (7.2%)	0.478
	GG	172 (90.1%)	142 (92.8%)	

Tabla 4: los polimorfismos estudiados de la respuesta TH17 y reguladores negativos de la activación de linfocitos T y apoptosis.. *El test estadístico utilizado fue la chi-cuadrado de Pearson o Fisher, según criterio de aplicabilidad. Para poder utilizar Fisher se tuvo que agrupar las categorías de algunas variables.

VI. DISCUSIÓN

desarrollo neoplásico es un proceso muy complejo que implica la aparición de múltiples mutaciones en el genoma de las células. Entre los factores que influyen en la alta tasa de mutagenicidad están los defectos en la maquinaria de reparación de errores en la replicación del ADN. Estos defectos constituyen el motor de la progresión tumoral y son los responsables de la enorme heterogeneidad genética que se puede observar intratumoralmente en las distintas fases o etapas del tumor, que influye en la resistencia al tratamiento farmacológico y dificulta el diseño de estrategias terapéuticas contra el cáncer. Particularmente, en el cáncer renal se ha podido demostrar la enorme complejidad de variantes celulares que pueden observarse intratumoralmente (Gerlinger et al. 2012). Es evidente que muchas de las alteraciones genéticas conducen a la activación de los oncogenes y a la eliminación de las defensas intratumorales mediadas por las proteínas codificadas por los genes supresores del tumor. Sin embargo, como se ha admitido recientemente, la progresión del cáncer en un huésped inmunocompetente requiere, además, de la inactivación de las respuestas inmunitarias protectoras. Se ha observado en varios experimentos con ratones deficientes en genes clave de la inmunidad que los tumores que se desarrollan 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” (Schreiber et al. 2011). Nuestro grupo ya había descrito cómo determinadas mutaciones (marcas genéticas) observadas en células de distintos tipos de tumores sólo pueden interpretarse por su representatividad en el tejido tumoral, en un contexto de inmunoselección. En este modelo, la progresión tumoral transcurriría siguiendo un modelo darwiniano mediante el cual, se seleccionarían clones débilmente inmunogénicas. El reconocimiento de este papel protector que puede ejercer la respuesta inmunológica ha recibido hoy en día un enorme respaldo al constatar que el patrón de respuesta inflamatoria y el tipo de células involucradas tienen un enorme impacto en el pronóstico del paciente.

Paralelamente, el sistema inmunitario puede jugar un papel en fases del desarrollo neoplásico como elemento favorecedor del cáncer. De hecho, es conocido que con frecuencia los cánceres se desarrollan a partir de una fase de inflamación crónica persistente, que ha sido relacionada con el inicio y el desarrollo de varios tipos de neoplasia. Células de la inmunidad innata, macrófagos y células dendríticas están especialmente dotadas de receptores de daño celular. Estos receptores, tanto de

membrana como citosólicos, disparan el proceso de inflamación mediado por el complejo multimérico denominado inflamasoma. La conexión entre la inflamación y el inicio del proceso carcinogénico estaría relacionada por la activación prolongada de estas células de la inmunidad innata que, entre otros factores, producen liberación de radicales libres, especies reactivas de nitrógeno y oxígeno altamente tóxicas y con potencial mutagénico (Coussens y Werb 2002, Shacter y Weitzman 2002; Karin 2002; de Visser et al 2006; Ballkwill et al 2005; Fox et al 2007). Así mismo, terapias anti-IL1, anti TNF- α o anti-NF κ β , se han mostrado útiles en modelos experimentales para frenar el desarrollo neoplásico (Luo et al. 2004). 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), la 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).

Finalmente, junto a los datos anteriormente expuestos y a los datos epidemiológicos que sostienen una estrecha relación entre inflamación crónica y cáncer, 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 citocinas de la inmunidad natural, se hayan encontrado asociados a riesgo de desarrollar cáncer. Por ejemplo, se ha demostrado que polimorfismos de la citocina proinflamatoria IL1-b se encuentran asociados a riesgo de padecer cáncer gástrico (Troost et al. 2003). TNF- α se ha identificado como el principal factor que contribuye al crecimiento metastásico en un modelo murino. También en humanos, estos polimorfismos genéticos se han asociado a riesgo de mieloma múltiple, cáncer de vejiga, cáncer hepático (Mocellin et al. 2005) y próstata (Sáenz-López et al. 2008).

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, factores inhibidores, también producidos por células de la inmunidad innata o específica y por último células estromales que tendrían efectos opuestos. Este balance está, a su vez, influenciado por factores genéticos (por ejemplo, los polimorfismos genéticos) que predisponen al desarrollo de respuestas inflamatorias.

En el presente estudio hemos pretendido abordar estos tres aspectos clave en el desarrollo tumoral. Nos hemos centrado en el cáncer renal, un tumor que, por otra parte, presenta ciertas características genéticas específicas que lo hacen algo distinto a otro tipo de cáncer. Hemos querido analizar cuál es el papel que puede ejercer el sistema inmunitario desde la perspectiva de lo que hemos venido considerando en esta introducción y que está relacionado con los objetivos de esta tesis:

1. *¿Se puede evidenciar, tras el estudio del tejido en el carcinoma renal, la presencia de un proceso de inmunoselección? ¿Cuál sería, en este sentido, el papel las moléculas HLA en el desarrollo del cáncer renal?*

Para responder a esta pregunta, hemos analizado la expresión de moléculas HLA en tejido normal y tumoral. También hemos analizado el impacto del tratamiento inmunoterapéutico en relación a la expresión de antígenos HLA.

2. *¿Cuál es el papel del infiltrado inflamatorio en el cáncer renal?*

Se ha caracterizado la composición del infiltrado inflamatorio (linfocitos y macrófagos) en una selección de pacientes con una distinta evolución

3. *¿Existen factores genéticos asociados a inflamación que predispongan al cáncer renal?*

Para este tercer objetivo, hemos llevado a cabo un estudio de polimorfismos genéticos implicados en la regulación de la respuesta inmunitaria y en la inflamación en relación a factores de riesgo y progresión en el cáncer renal.

Expresión de HLA en tejido normal, tumoral y metastásico en cáncer renal

La transformación maligna conlleva frecuentemente cambios en la expresión de antígenos de histocompatibilidad de HLA de clase I y también HLA de clase II. Se cree que estos cambios juegan un papel relevante en el curso de la enfermedad. Numerosos estudios han revelado alteraciones que consisten en pérdidas parciales y totales en la expresión de las moléculas HLA-ABC y que se interpretan en un contexto de inmunoselección mediado por linfocitos T CD8 (Garrido et al. 1993; Garrido et al. 1997; Seliger 2008; Bernal et al. 2012). Las alteraciones en el fenotipo HLA en la superficie son complejas y pueden ir desde la pérdida o baja regulación total de estas moléculas a la pérdida selectiva de un alelo o haplotipo HLA (D'Urso et al. 1991; Benitez et al. 1998; Pérez et al. 1999; Brady et al. 2000). La perspectiva de la pérdida o baja regulación de la molécula de HLA de clase I en células malignas se basa en la suposición de que las moléculas clásicas de HLA de clase I se expresan en todas las células nucleadas, a excepción de los tejidos inmunoprivilegiados como, por ejemplo, cerebro, cornea, hígado, testículos, la matriz del pelo, la matriz proximal de las uñas, la cámara anterior del ojo, citotrofoblastos (Campoli y Ferrone 2011).

Contra la creencia prácticamente general de que las moléculas HLA de clase I se expresan en la mayoría de los tejidos normales, algunos estudios revelan diferencias cuantitativas y cualitativas (locus-específicas) en función del tejido analizado (García-Ruano et al. 2010). Además de los tejidos inmunoprivilegiados (Campoli y Ferrone 2011), la molécula de HLA de clase I no siempre se detecta en: adipocitos, condrocitos, hepatocitos, células del músculo esquelético liso, células epiteliales de las paratiroides, células pancreáticas, conducto biliar, endotelio urotelial, ganglios simpáticos, melanocitos situados en el nevus benigno y la lamina basal de los melanocitos (Campoli y Ferrone 2011).

Respecto al carcinoma renal existen una serie de trabajos donde estudiaron la expresión de HLA en tejido renal normal y tumoral con resultados dispares (Daar et al. 1984; Singer et al. 1990; Atkins et al. 2004; Ibrahim et al. 2003). Nuestros resultados muestran de forma consistente que la expresión HLA de clase I es prácticamente negativa en el

tejido normal, al menos con las técnica inmunohistoquímica usada. Resulta llamativo, que dos órganos involucrados en la eliminación de productos tóxicos (xenobióticos) presentan niveles indetectables de expresión de moléculas HLA. Una posible explicación de estos hallazgos, es que la reducción de expresión de HLA de clase I evitaría la continua presentación al sistema inmunitario de antígenos propios potencialmente modificados por interacción con los xenobióticos.

Por el contrario, de nuestro estudio se desprende que gran parte de los tejidos tumorales presentan una alta expresión de moléculas HLA de clase I. El estudio inmunohistoquímico que hemos realizado sobre la expresión de HLA en tejido normal y tumoral proporciona, bajo nuestro punto de vista, datos más completos que los publicados hasta el momento. Así por ejemplo, Daar et al. utilizaron el anticuerpo monoclonal PA2.6 que detecta la cadena pesada HLA-ABC de la molécula de HLA de clase I en tejidos normales criopreservados obteniendo una expresión positiva de HLA de clase I a nivel de los túbulos. Nosotros, por el contrario, sólo encontramos una escasa positividad en tejidos normales habiendo utilizado un panel de anticuerpos más amplio para la detección de la molécula de HLA de clase I. Ibrahim et al. observaron que la expresión de HLA clase I fue más evidente en todos los subtipos de cáncer renal que en las células tubulares del tejido normal adyacente, mientras que Atkin et al. encontraron la misma expresión de HLA de clase I entre el cáncer renal y tejido normal. En estos dos estudios los autores utilizaron sólo los anticuerpo anti- β 2m y el HC-10, que reconoce el HLA-BC intracitoplasmático, pero no detecta las moléculas de HLA de clase I en la superficie de la célula (Atkins et al. 2004; Ibrahim et al 2003). Dos trabajos más recientes (Kitamura et al. 2007 y Yuan et al. 2012) realizaron un estudio de expresión de HLA en pacientes con cáncer renal utilizando sólo el anticuerpo monoclonal EMR8-5, observando una baja regulación (38.3%) en la expresión de HLA de clase I en pacientes con cáncer renal de células claras. Sin embargo este anticuerpo, aunque ha sido validado en inmunohistoquímica y ampliamente utilizado para investigar la expresión de HLA de clase I en muchos tipos de cánceres humanos (Tsukahara et al, 2006.; Kikuchi et al, 2007), no reconoce la expresión en superficie de las moléculas HLA.

Nuestro estudio incluye tejidos tanto en parafina como muestras criopreservadas. Hemos analizado tejidos de tumores renales de células claras, cromófobos y papilar, y utilizado un amplio panel de anticuerpos monoclonales (frente a HLA-ABC, β 2m, HLA-A, HLA-

B, HLA-BC intracitoplasmático y HLA de clase II). Observamos diferencias importantes en el nivel de expresión de moléculas HLA de clase I en los tejidos tumorales, en comparación con el tejido renal normal.

La expresión de estas moléculas en el tejido neoplásico, podría interpretarse o en el contexto de la transformación celular, o que fuera secundaria a la presencia y liberación de citocinas en el microambiente tumoral. Nuestros resultados han puesto de manifiesto diferencias de transcripción notables al comparar los niveles de ARNm específicos en muestras microdisectadas mediante PCR cuantitativa. Éstos resultados confirmaron que la ausencia de expresión de HLA de clase I en las células tubulares se asociaba a una reducción significativa en los niveles de ARNm. Un estudio confirmatorio más reciente (Stickel et al. 2011) ha desarrollado un método cuantitativo de análisis molecular para la comparación de las cantidades de HLA de 47 muestras de tejido normal, tumor primario y metástasis en pacientes con cáncer renal, usando la degradación de Edman. Sus resultados revelaron también un incremento de la producción de la molécula de HLA de clase I del tumor primario y metastático en comparación con el tejido renal normal. También observaron una mayor cantidad de moléculas HLA de clase I en las metástasis distantes en comparación con las metástasis en ganglios locales.

A la luz de nuestros resultados, tanto en tejido normal autólogo como en cáncer, concluimos que la transformación maligna del tejido renal comporta, en contra de lo que ocurre en otras neoplasias, un notable incremento en la expresión de moléculas HLA clase I.

En un estudio anterior demostramos que la expresión de HLA de cadena pesada y $\beta 2m$ se asoció, a su vez, con la expresión de quimiocinas y citocinas proinflamatorias (Romero et al. 2006). Describimos una mayor expresión de varias quimiocinas (MIP-1- α , RANTES) y citocinas (TGF- β , VEGF-c, IL-10 y de IFN- γ) en el tumor comparativamente con el tejido normal renal. Particularmente relevante fueron los resultados referidos a IFN- γ , un potente inductor de HLA de clase I en el tejido tumoral. Sin embargo, aunque el mecanismo exacto del aumento de la expresión de HLA de clase I en cáncer renal no está aclarado en estos estudios, nosotros favorecemos la hipótesis de que existe una expresión constitutiva de HLA de cadena pesada y $\beta 2m$ tras la transformación neoplásica, y que el incremento de expresión no sería producto de la

secreción local de citoquinas. Para apoyar esta hipótesis nos basamos en el hecho de que los patrones de expresión observados son, en general, homogéneos y no focales, además de no encontrarse asociados a una mayor o menor infiltración inflamatoria (datos no mostrados). En este sentido, el cáncer renal en cuanto a expresión de moléculas HLA tendría esta particularidad con respecto a la mayoría de tipos de cáncer. Llama también la atención que, en relación a alteraciones por pérdida de expresión, el cáncer renal presenta además la más baja incidencia. Cabe destacar que la genética del cRCC es distinta comparada con otros tipos de tumores. Casi todos los cRCC tienen mutaciones de inactivación de origen germinal o somático en el gen VHL. Estas mutaciones no se dan en otros tipos de tumores. Se conocen una gran cantidad de protooncogenes que frecuentemente se encuentran mutados en otros tumores epiteliales adultos, y que no ocurren frecuentemente en el cRCC. Algunos ejemplos son el gen: RAS, BRAF, TP53, RB (también conocido como RB1), CDKN2A, PIK3CA, PTEN, EGFR and ERBB2. Por el contrario, se han descubierto mutaciones en cRCC en genes modificadores de histonas (Dagliesh et al. 2010). Interesantemente, entre los factores modificadores de la cromatina que son reclutados en el promotor HLA por la proteína maestra CIITA se incluyen las enzimas modificadoras de histonas (Choi NM et al. 2011; Kobayashi KS et al. 2012). En este sentido, es bien conocido que la metilación, junto a otros factores epigenéticos, juega un posible papel en la regulación de la expresión de HLA. Nuestro grupo demostró cómo alteraciones en el patrón de metilación estaban involucrados en la expresión constitutiva (Serrano et al. 2001) e inducible en melanomas (Rodriguez et al. 2007). No obstante, si la neoexpresión de moléculas HLA de clase I es secundaria a la participación de estos factores oncogénicos del cRCC es algo que necesita de comprobación experimental adicional.

La neoexpresión de antígenos HLA de clase I se ha visto también en células pre-malignas y malignas. Así, ha sido observada en el nevus displásico (Zeff et al. 1997) además de algunas formas de carcinoma hepatocelular y testicular (Chang et al. 2005; Campoli et al. 2008). Igualmente, la aparición de estas moléculas HLA de clase I y II en el nevus displásico se ha correlacionado también con el grado de atipia celular y comporta un riesgo de transformación a melanoma.

Por otra parte la mayoría de los estudios de expresión HLA en el cáncer reportan alteraciones en la expresión. La pérdida total o selectiva de HLA clase I se ha observado

en prácticamente todos los tipos de cáncer. En el primer caso, se ha encontrado en el 90% de los carcinomas de cuello uterino (Keating et al. 1995), el 73% de los carcinomas de colon (Cabrera et al. 1998), el 88% de los carcinomas de mama (Cabrera et al. 1996), el 51% de los melanomas (Kageshita et al. 2005), y el 66% de los carcinomas de laringe (Cabrera et al. 2000). Por otro lado, la pérdida de haplotipo HLA se informó en el 48% de tumores de células escamosas de cabeza y cuello (Feenstra et al. 2000), el 50% de los carcinomas de cuello uterino (Koopman et al. 2000), el 49% de los carcinomas de laringe (Maleno et al. 2002), y el 40% de los carcinomas de colon (Maleno et al. 2004). A diferencia de lo observado en la mayoría de los tumores, el carcinoma renal mostró una baja frecuencia de pérdida completa en la expresión de HLA de clase I. Del mismo modo, un estudio previo que se realizó en nuestro laboratorio, confirmó que había también una baja frecuencia de pérdida haplotípica en cRCC (6.6%) en comparación con otros tipos tumoral anteriormente mencionados (Maleno et al. 2004).

Diversos estudios han demostrado la relación que existe entre la expresión de HLA de clase I y el pronóstico en pacientes con varios tipos de cánceres humanos. La mayoría de estos estudios sugieren que los pacientes con cáncer con expresión de HLA de clase I tienen un mejor pronóstico que aquellos con pérdida o reducción de la expresión de HLA de clase I, y que la baja regulación de HLA de clase I podría reflejar el escape de las células malignas del sistema inmunológico humano. Sin embargo, éstos datos no son definitivos dado que otros estudios muestran que la baja regulación de HLA de clase I se correlaciona con fases tempranas del tumor y un mejor pronóstico en varios tipos de tumores malignos humanos, tales como cáncer de mama (Gudmundsdottir et al; 2000), melanoma (Krishnakumar et al.; 2004), cáncer de pulmón (Ramnath et al.; 2006), y cáncer de colon (Menon et al.; 2002).

Existen dos estudios en cáncer renal que relacionan la expresión del HLA de clase I y la progresión del tumor (Kitamura et al. 2007; Yuan et al. 2012). En los dos trabajos, y como se ha comentado anteriormente, se observó una baja regulación (38.3%) en la expresión de HLA de clase I en pacientes con cáncer renal de células claras. Mientras que Yuan J et al. observaron una correlación significativa entre la baja regulación de HLA de clase I y el estadio TNM, la metástasis de ganglios linfáticos, y el grado nuclear, Kitamura et al. no observaron ninguna asociación entre la expresión de HLA de clase I y los parámetros clínico-patológicos de los pacientes. Esta discrepancia podría

explicarse por el pequeño número de pacientes que comprendía el segundo estudio. Sin embargo, los dos estudios sugieren que la baja expresión de HLA de clase I se asocia con una menor supervivencia de los pacientes con cáncer renal de células claras y que el HLA de clase I es un factor potencial de pronóstico de la supervivencia global. En nuestro estudio realizado teniendo en cuenta que la casuística de tumores que pierden expresión de HLA es inferior al 5%, no encontramos ninguna asociación entre la expresión de HLA de clase I y los parámetros clínico-patológicos de los pacientes (datos no mostrados).

Finalmente, para profundizar en el significado de la expresión HLA de clase I en cáncer renal quisimos investigar si, como se ha observado en otros tipos de cáncer, el estímulo inmunitario tras vacunación puede llevar aparejado cambios en la expresión HLA. El cáncer renal es precisamente de los pocos tipos de neoplasias en donde la inmunoterapia ha tenido cierto éxito y hasta hace poco constituía la única estrategia terapéutica. Se podría especular que el éxito relativo de la inmunoterapia en el carcinoma renal (Yagoda et al. 1995; Bleumer et al. 2003) fuera atribuible a la baja frecuencia de alteraciones en la expresión de HLA clase I.

En nuestro trabajo fueron analizados tejidos normales, tumorales y metastáticos en pacientes tratados con inmunoterapia. Observamos que la inmunoterapia inespecífica (IL2/IFN- α) o específica (péptidos) no parece provocar escape inmunológico del tumor por descenso en el nivel de expresión de antígenos HLA de clase I. Nuestros resultados podrían explicarse porque los péptidos específicos usados en la vacunación no inducen ningún tipo de respuesta, probablemente, por no ser componentes del verdadero antígeno tumoral de rechazo. Otra interpretación es que la progresión del tumor ocurre por inactivación de mecanismos de respuesta inmunitarios que no involucran la destrucción de la maquinaria de procesamiento antigénico. En este sentido, entre los factores que podrían contribuir al fracaso de la inmunoterapia en los pacientes de carcinoma renal han sido postulados la falta de expresión de moléculas coestimuladoras (ligandos para la activación de las células T) que puede inducir la tolerancia a las células neoplásicas (Zou et al. 2005). También las células tumorales producen factores de supresión inmunitaria (VEGF (Carmeliet et al. 2000), factor de crecimiento transformante-b [TGF-b], interleuquina 10 [IL-10] y prostaglandina E2 [PGE2] (Sombroek et al. 2002), que tienen efectos sistémicos en las funciones de las células inmunes. Por último, las alteraciones

en la diferenciación, maduración, migración y función de las células dendríticas son de especial importancia en el fracaso del control inmunitario, porque son las más potentes células presentadoras de antígenos (APC) del sistema inmunitario, induce la interacción con las células T y modula la respuesta inmunológica (Zou et al. 2005).

En conclusión, y analizando nuestros resultados, podemos decir que la neoexpresión de antígenos HLA de clase I en el cáncer renal lo diferencia de la mayoría de los tipos de cáncer. Su significado biológico está todavía por esclarecer. En segundo lugar, las alteraciones de HLA de clase I son raras en el carcinoma renal y probablemente no son un factor clave en el escape inmunológico del tumor.

Papel del sistema inmunológico en el microambiente tumoral del cáncer renal

La predicción clínica en cáncer se consigue normalmente por la evaluación histopatológica (clasificación de la AJCC / UICCTNM) de muestras de tejido obtenidas durante la resección quirúrgica del tumor primario. El estadio tumoral (AJCC / UICCTNM) resume los datos sobre el tamaño y ubicación del tumor (T), la presencia de células cancerosas en el drenaje y los ganglios linfáticos regionales (N) y evidencia de metástasis (M). Esta clasificación, basándose únicamente en parámetros de invasión tumoral, ha demostrado ser valiosa en la estimación de la evolución de los pacientes en varios tipos de tumores (Locker et al. 2006; Sobin y Wittekind 2002; Weitz et al. 2005). En la actualidad se piensa que ésta proporciona una información limitada para el pronóstico, y que no predice la respuesta al tratamiento. Es bien sabido que el resultado clínico puede variar significativamente entre pacientes dentro del mismo estadio tumoral (Nagtegaal et al. 20011). En los últimos años se ha publicado una cantidad importante de trabajos que apoya la hipótesis de que el desarrollo del cáncer se ve afectado por el sistema inmunológico del huésped. Se observó que la infiltración por células T CD8+ es un factor predictivo de buen pronóstico en el cáncer colon-rectal, y en alguno de los trabajos se concluyó que una combinación de una alta población de células T CD8+ y baja población de células T CD4+ tenía un mejor pronóstico (Jochems y Schlom 2011). En el carcinoma hepatocelular se vio que un alto número de células T CD8+ y células dendríticas en el microambiente tumoral era un factor predictivo de buen pronóstico, mientras que la presencia de las células T reguladoras y células TH17 fue un factor de mal pronóstico (Gao et al. 2007; Kobayashi et al. 2007; Cai et al. 2006; Zhang et al. 2009). Fukunaga et al. encontraron que un alto grado de infiltración de células T CD4+ y CD8+ era un factor de buen pronóstico en pacientes con carcinoma de páncreas (n = 80, P, 0.01) (Fukunaga et al. 2004). Hiraoka et al. investigaron la prevalencia de las células Treg en el carcinoma pancreático descubriendo que una alta prevalencia de estas células era un factor negativo de la supervivencia (n = 198, P, 0.001) (Hiraoka et al. 2006). El estudio realizado por Schumacher et al. explicaba que la presencia intratumoral de células T CD8 + era un factor de buen pronóstico tanto en células escamosas y adenocarcinomas del esófago (n = 70, P, 0,001) (Schumacher et al. 2001). Cho et al. también encontraron que los pacientes con carcinoma de esófago con un alto

porcentaje de linfocitos T CD4 + y CD8 + en el tumor tenían una tasa de supervivencia significativamente mayor que los pacientes con bajos niveles de uno o los dos subconjuntos de células T (n = 122, P, 0,0001) (Cho et al. 2003). En el cáncer de vejiga se vio que una densa infiltración por linfocitos en el tumor era un factor de buen pronóstico (n = 514, P, 0.01) (Lipponen et al. 1992). De acuerdo con estos resultados, en un estudio reciente realizado por Sharma et al. se demostró que los pacientes con carcinoma urotelial avanzado con un mayor número de células T CD8 + en el tumor tenían un mejor pronóstico (n = 69, P= 0,001) y supervivencia (P= 0.05) (Sharma et al. 2007).

Existen trabajos que han analizado la infiltración en el carcinoma renal. Jensen et al. informaron que la presencia de neutrófilos intratumorales en el carcinoma de células renales fue un factor de pronóstico asociado con la supervivencia libre de recidiva a corto plazo (n = 121, P= 0.0001) (Jensen et al. 2009). Ésta, a cinco años, fue del 53% en pacientes con neutrófilos intratumorales en comparación con el 87% en pacientes sin neutrófilos en el microambiente tumoral. Donskov et al. también encontraron que la presencia de neutrófilos intratumorales era un factor de mal pronóstico (n = 85, P= 0,001). Además, se encontró que una baja población de células NK intratumorales era también un factor de mal pronóstico (P= 0,01) (Donskov F et al. 2006). En un estudio realizado en 24 pacientes con carcinoma renal (no se especificaba el subtipo), se observó que en los tumores de cáncer renal con un incremento en el microambiente tumoral de células T se asociaban a aumento en la recurrencia del tumor (Kolbeck et al. 1992). Igualmente, Nakano et al (Nakano et al. 2001), estudiaron 221 muestras de pacientes con cáncer renal (incluían los subtipos: células claras, células granulares, mezcla de células granulares y claras, cromóforo, papilar) y demostraron que los tumores renales con niveles altos de linfocitos T CD8+ se asociaron con una disminución de la supervivencia. En este estudio, sin embargo, no identificaron una correlación entre los niveles intratumorales de los linfocitos T CD8+ y el estadio TNM. Por el contrario, Bromwich et al. (Bromwich et al. 2003) estudiaron 73 pacientes con carcinoma renal (no especificaron el subtipo) y demostraron que no existía una correlación entre los niveles intratumorales de los linfocitos T CD8+ y la supervivencia del paciente. Sin embargo, sugirieron que un aumento en los niveles de los linfocitos T CD4+ estaba asociado con una peor supervivencia con independencia del grado tumoral. Estos resultados contradicen el estudio realizado por Igarashi et al. donde se demuestra en los pacientes

con enfermedad en estadio III-IV, un aumento de la infiltración de células T CD4 + y una disminución de la infiltración de células T CD8 + constituía un factor de buen pronóstico (n = 79, P, 0,01) (Igarashi et al. 2002). Un estudio reciente de W. Scott Webster señala que la presencia de la infiltración por células mononucleares, independientemente del fenotipo celular (linfocitos CD8+, CD4+, NK, macrófagos, linfocitos B), representa un factor de mal pronóstico en el tumor renal de células claras. Se demostró que la infiltración por las células mononucleares en los tumores renales de células claras se correlacionaba con una disminución de la supervivencia del paciente. Mediante la citometría de flujo en 25 pacientes, observaron que en los tumores existía una mezcla de poblaciones linfocitaria CD8+ y CD4+, células NK y macrófagos. La población de linfocitos B se encontró en muy pocos tumores y en niveles muy bajos (Webster et al. 2006). Es evidente que hay una necesidad de más estudios de la infiltración tumoral en el carcinoma de células renales ya que los estudios anteriores no han sido concluyentes.

Nuestro grupo también ha contribuido al análisis de la infiltración leucocitaria en el cáncer renal y su significado biológico. En un estudio previo a éste, demostramos una progresiva disminución de los niveles de infiltración de células Th1 de fenotipo CD4+CXCR3+CCR5+. Estas células son productoras de IFN- γ , una citocina inductora de HLA de clase I y que paralelamente potencia las respuestas citotóxicas por linfocitos T CD8+. La presencia de los linfocitos TH1 disminuye en tumores más avanzados en los que la proporción de células de fenotipo TH2 (CD4+CCR4+) se incrementa. Estos cambios en la composición de los TILs, con una alteración del balance TH1/TH2 puede suponer una ventaja selectiva para el crecimiento tumoral al desfavorecer respuestas citotóxicas protectoras potenciadas por linfocitos TH1 (Cozar et al 2005). En este sentido cabe destacar también que en otro trabajo de nuestro grupo (Romero et al 2006) pudimos confirmar, en consonancia con estos datos de subpoblaciones, una disminución de citocinas, particularmente IFN- γ , asociadas a la presencia de linfocitos TH1 en tumores más avanzados.

En nuestro estudio hemos profundizado en la composición del infiltrado inflamatorio, mediante análisis inmunohistoquímico en 19 muestras de tumor primario y 8 muestras de tejido normal renal autólogo. Estas muestras fueron seleccionadas a partir de pacientes que habían tenido una evolución favorable o desfavorable por fallecimiento

atribuible al cáncer. Además en este estudio incluimos la investigación simultánea de subpoblaciones T y de macrófagos. Se han definido por tanto, linfocitos T CD8 y CD4, células NK, macrófagos M1 y M2 y cadena CD3- ξ . Analizando el grado de infiltración, observamos que de las 19 muestras tumorales estudiadas el 32% (6 casos) tenían una alta infiltración (+++), el 21% (4 casos) tenían una infiltración moderada (++) , el 26% (5 casos) una infiltración moderada baja (+/++) y el 21% (4 casos) tenía una baja infiltración (+). De los 8 casos de tejido normal autólogo estudiados, 4 casos (50%), tenían una infiltración moderada (++) , 2 casos (25%) una infiltración alta (+++) y 2 casos poca infiltración (+).

Además del fenotipo, hemos analizados la ubicación o patrón de la infiltración de las células inmunológicas, el cual, ha sido demostrado ser un factor muy importante. Por ejemplo, se ha observado que el microambiente del tumor, en diferentes regiones del tumor, influye en el sistema inmunológico para promover ya sea la inmunidad antitumoral o la progresión del tumor. Se vio, por ejemplo, que cuando las células T CD8⁺ se encontraban dentro de los nidos tumorales, los pacientes de cáncer colon-rectal y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) tenían un mejor pronóstico que cuando estas células se encontraban en otras áreas del tumor (Jochems y Schlom 2011). Observamos que en el 79% de los casos tumorales (15 casos) su patrón de infiltración era intratumoral mientras que en el 21% (4 casos) era intersticiales. Destacamos que todos los tumores de células claras tenían un patrón intratumoral mientras que todos los tumores de cromóforos y el tumor papilar tenían un patrón de infiltración intersticial.

Quisimos relacionar el estudio de infiltración leucocitaria con las características clínico-patológicas y pronóstico de los pacientes. Como hemos comentado antes, tanto el tipo de infiltración como la ubicación de ella debería influir en las características del tumor de nuestros pacientes; sin embargo, no encontramos ninguna significación entre grado de infiltración, el patrón de infiltración y el predominio de un tipo de infiltrado con las características clínico-patológicas de los pacientes (tamaño tumoral, estadio, grado nuclear y supervivencia). Aunque observamos una tendencia entre el aumento de la población leucocitaria y una menor supervivencia del paciente, no hemos encontrado significación. Nuestros resultados coincidirían con lo observado por W. Scott Webster.

En la actualidad se ha establecido un “inmunoscore” como marcador clínico de pronóstico basado en la contabilización de dos poblaciones linfocitarias (CD3/CD45RO, CD3/CD8 o CD8/CD45RO), tanto en el centro como en el margen invasivo del tumor (Pages F et al. 2009). La diversidad en el tipo de malignidad y el estadio de la enfermedad sugieren que el “inmunoscore” puede ser de ayuda adicional para la evaluación de muchos tipos de tumores. Aunque no se ha podido llegar a un consenso universal en lo referente al “inmunoscore”, existen unas características comunes en la respuesta inmunológica del huésped en muchos tipos de cánceres. Considerando el más que probable carácter universal del control inmunológico del cáncer, es esencial el no ignorarlo como un factor de pronóstico (Bindea et al. 2010) e introducirlo como un marcador para la clasificación de los tumores (Mlecnik et al. 2011, Pages et al. 2009). Este marcador tiene una ventaja doble: la primera, parece que es el factor de pronóstico más importante para determinar si el paciente está libre de la enfermedad y para la supervivencia total, particularmente en los estadios tempranos del tumor. En segundo, sirve como herramienta objetiva para la implementación nuevas terapias.

En nuestro estudio, el “inmunoscore” fue realizado al estudiar el patrón de linfocitos CD3 y linfocitos T citotóxicos CD8+ en nuestras muestras y relacionarlo con los parámetros clínico-patológicos. De este segundo análisis destacamos que únicamente existía un grado de infiltración alta (+++) de linfocitos T CD8+ en un 27% de los casos, y dentro de este grupo, el 80% de los pacientes habían fallecido. En lo referente al patrón de infiltración, el 85% de los casos tenían un patrón de infiltración intratumoral de linfocitos T CD8+. Hemos observado una tendencia entre el aumento de la población de linfocitos T CD8 y una menor supervivencia del paciente. Aunque no hemos encontrado significación, probablemente por el tamaño de la muestra analizada, nuestros datos coinciden con los reportados por Nakano et al. 2001.

En nuestro estudio, también quisimos investigar la expresión de CD3- ξ . La cadena CD3- ξ es necesaria para el inicio de la cascada de señalización intracelular después de que el TCR se una al HLA y su péptido ligando, provocando una secreción de citocinas y gránulos citotóxicos. Niveles bajos de expresión de la cadena CD3- ξ fueron frecuentemente observados en linfocitos con patrón intratumoral o peritumoral en diferentes tipos de cáncer, como el de cabeza y cuello, melanoma y páncreas (Whiteside 2004), y han sido considerados como un elemento más a tener en cuenta que puede explicar el fenómeno de inmunoevasión. Las observaciones encontradas en los tumores

renales son contradictorias: algunos trabajos demostraron expresión sin perturbaciones mientras que otros observaron una baja regulación de CD3- ξ en linfocitos (Finke et al. 1993; Tartour et al. 1995; Cardi et al. 1997; Bukowski et al. 1998; Ochoa et al. 2007). En nuestro estudio hemos observado que no existía aparentemente una baja regulación de la cadena CD3- ξ en los pacientes con cáncer renal analizados.

Finalmente, en relación a los macrófagos, estas células fueron identificadas como un componente importante de la infiltración tumoral en el carcinoma renal. Además se ha observado que un aumento en el número de macrófagos se encuentra también asociado a un alto riesgo de fallo en la inmunoterapia en pacientes con cáncer renal (van Bezooijen et al. 1996; Donskov et al. 2006, 2004). Se ha demostrado que los macrófagos asociados a tumores favorecen la angiogénesis y, por lo tanto, al aumento del crecimiento tumoral. Sin embargo, hasta ahora no se ha hecho ninguna aproximación al análisis funcional de los macrófagos, entre los que se consideran protectores (M1), y aquellos que favorecerían la progresión tumoral (M2). En nuestros pacientes, en un 79% de de los casos el predominio era de macrófagos y dentro de ellos, el 27% tenía una infiltración por macrófagos M2 (CD163, CD206). Sólo en un 11% encontramos un predominio de linfocitos CD8. En un caso (5%) se vio un patrón de infiltración por células NK y otro caso tenía una infiltración similar de macrófagos y linfocitos T CD8.

En conclusión de este estudio, limitado por la casuística, podemos decir que nuestros resultados sugieren que en el carcinoma renal, el grado, tipo y patrón de infiltración del sistema inmunológico en el microambiente tumoral no influye sobre las características clinicopatológicas del cRCC.

Polimorfismos genéticos de citocinas implicadas en la progresión tumoral

Un amplio número de estudios en los últimos años han demostrado la correlación entre un aumento en el riesgo de padecer cáncer y la inflamación. En estos estudios se han visto evidencias de una asociación de la progresión del tumor con el aumento de moléculas proinflamatorias, especialmente durante las últimas etapas de la enfermedad (Nelson D et al. 2006, Coussens et al. 2002). La inflamación crónica, junto con las propiedades intrínsecas de las células premalignas y otros determinantes, puede ser una de las fuerzas motrices de la iniciación y promoción del tumor. Se ha observado que la expresión anormal de numerosos mediadores liberados en la inflamación crónica promueven el crecimiento e invasión celular, induciendo mutaciones genéticas e incrementando la angiogénesis (Balkwill et al. 2005). Diferentes trabajos han asociado los polimorfismos genéticos de diferentes citocinas inflamatorias (los cuales pueden influir en la expresión o función de estas citocinas) con el riesgo de padecer cáncer, con el crecimiento tumoral y la metástasis tanto en el carcinoma renal como en otros tipos de tumores (Sáenz-López et al. 2008; Romero et al. 2009; Kawai et al. 2007). De todos los polimorfismos que hemos analizado, hemos centrado nuestra discusión en los polimorfismos genéticos de la IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T y -592 C/A), de la IL-18 (-137 G/C y -607 A/C) y del VEGF (-2578 C/A, -460 T/C, +405 C/G, Y +936 C/T), los cuales están incluidos en los artículos publicados que forman parte de esta Tesis doctoral.

IL-10

La IL-10, mediante sus efectos pleiotrópicos, está involucrada como mediador en muchos aspectos diferentes de la respuesta inmunológica, tanto de la respuesta innata como en la adaptativa (Pestka et al. 2004). Los polimorfismos genéticos de la IL-10 se han asociado con el riesgo y el pronóstico de padecer una enfermedad maligna. Dependiendo del tipo de tumor, tanto una alta como una baja expresión de la citocina se ha asociado con la susceptibilidad o un peor pronóstico del tumor (Howell et al. 2006). Por lo tanto, el genotipado alto productor IL-10 (-1082 GG) fue significativamente más

frecuente en los pacientes con cáncer de pulmón y carcinoma oral de células escamosas (Seifart et al. 2005), mientras que el genotipo bajo productor IL-10 (-1082 AA) se asoció con el riesgo de cáncer de próstata y melanoma (Turner et al. 1997; Vairaktaris et al. 2008; Howell et al. 2001; McCarron et al. 2002). El polimorfismo IL-10-1082 A/G fue asociado con alto riesgo de padecer cáncer renal en una población inglesa, encontrando una frecuencia mayor del homocigoto AA en pacientes en comparación a los controles (Havranek et al. 2005). Estas diferencias no se han observado en la población española. En nuestro trabajo no hemos encontrado una asociación de los polimorfismos genéticos de la IL-10 (-1082 A/G, -819 C/T y -592 C/A) con el riesgo de padecer cáncer renal. Esta discrepancia en los resultados puede explicarse por los efectos de la heterogeneidad genética y diferentes interacciones gen-ambiente. En dos estudios de polimorfismos genéticos de la IL-10 en pacientes con melanoma se encontraron discrepancias similares en la distribución alélica, entre población inglesa (Giordani et al. 2003) y española (Alonso et al. 2005). Estas diferencias se atribuyeron a una sobrerepresentación del genotipo AA en el polimorfismo IL-10 (-1082 A/G) en la población española. La distribución de las frecuencias alélicas en nuestro estudio fue similar a los hallazgos de otros estudios españoles (Rueda et al. 2007).

La IL-10 puede afectar a diferentes aspectos de la inmunidad contra el cáncer, pudiendo facilitar el crecimiento del tumor mediante la supresión de la respuesta citotóxica por parte de los linfocitos Th-1 y también actuando como una potente citocina inmunosupresora Th-2 (Pestka et al. 2004). Por el contrario, la IL-10 puede actuar también como una citocina inmunoestimuladora, por ejemplo, mediante un aumento en la actividad de las células NK. Este fenómeno se observó en la regresión del melanoma y la metástasis del cáncer de mama en varios modelos preclínicos *in vivo* (Zheng et al. 1996; Kundu et al. 1996; Kaufman et al. 1999; Huang et al. 1999).

La IL-10 puede influir en el crecimiento y progresión del tumor mediante su actuación en otros fenómenos tales como la angiogénesis y proliferación/apoptosis (Mocellin et al. 2005). IL-10 actúa mediante la inhibición, tanto de la formación del estroma tumoral a través de diferentes células diana interfiriendo con el desarrollo de un suministro de sangre por parte del tumor (Linet et al. 2005), como de la acción de los macrófagos, que son importantes en la progresión del tumor y la neovascularización y que se encuentran presente en casi todos los tumores sólidos (Polverini et al. 1985; Lin et al. 2001).

Además, se ha observado una reducción de la síntesis del VEGF en los tumores o en el microambiente tumoral, donde existe una alta producción de IL-10, inhibiéndose la angiogénesis (Di Carlo et al. 1998; Huang et al. 1996).

En nuestra opinión, la composición y la intensidad de la reacción del estroma y el nivel de la producción local de la IL-10 puede ser crucial para una u otra respuesta, explicando los resultados aparentemente contradictorios en diferentes tipos de tumores.

En el estudio que nos ocupa, el estado heterocigoto (A/G) del polimorfismo IL-10 (-1082 A/G) fue el principal factor de riesgo para un alto tamaño tumoral ($p=0.001$), estadio tumoral ($p=0.002$) y presencia de adenopatía ($p=0.006$), pero no se encontró ninguna asociación con la supervivencia. Debido a que aún no se ha alcanzado la mediana de supervivencia (50% de mortalidad), la influencia estadística de esta variable como un factor de pronóstico no se puede descartar. Sin embargo, hemos sido capaces de detectar una ligera tendencia a una mayor mortalidad en los pacientes heterocigotos.

IL-18

La molécula IL-18, citocina proinflamatoria con función dual en el desarrollo del tumor, activa la progresión tumoral y, a su vez, contribuye a la eliminación del cáncer por medio del sistema inmunológico (Park et al. 2007). En nuestro estudio se analizaron algunos polimorfismos genéticos de la región promotora del gen IL-18, los cuales han demostrado ser un factor significativo común en varios tipos de cáncer, incluyendo los de estómago, mama, pulmón, próstata, colon-rectal y en el melanoma (Ye et al. 2007; Eissa et al. 2005; Cho et al. 2000; Farhat et al. 2008; Liu et al. 2007; Nikiteas et al. 2007). No hemos encontrado ninguna asociación entre los polimorfismos de IL-18 estudiados y el riesgo de padecer cáncer renal. Sin embargo, como en otros estudios (Eissa et al. 2005; Farhat et al. 2008), estos polimorfismos se correlacionaban con estadios avanzados del tumor. Nuestros resultados apoyan la reciente idea de que la función dual de la citocina IL-18 hace que tenga actividad pro y anti tumoral (Park et al. 2007). De hecho, la actividad de la IL-18 está influenciada por el microambiente tumoral. La IL-18 puede ejercer una función anti-tumoral aumentando la producción de IFN- γ en presencia de IL-12 (Nakanishi et al. 2001). Sin embargo, datos recientes también sugieren una actividad pro-tumoral para esta citocina multifuncional bajo ciertas

condiciones, tales como la respuesta inmunológica del tumor en diferentes sitios del tumor y del componente genético (Okamura et al. 1995; Cho et al. 2006). De acuerdo con nuestro grupo de pacientes de cáncer renal, los polimorfismos de IL-18 estudiados no se asocian con la susceptibilidad de padecer cáncer renal; sin embargo, una vez que el tumor aparece, una producción alta de la molécula de IL-18 promueve el grado tumoral avanzado, T, M y el estadio. Estos resultados pueden explicarse ya que la molécula de IL-18 induce la producción de factores angiogénicos y de crecimiento (Kim et al. 2008, Cho et al. 2006).

Ha sido demostrado que la IL-18 activa al HIF (Kim et al. 2008) y el VEGF (Cho et al. 2006), y puede activar la angiogénesis en los nidos tumorales (Park et al. 2007). Una alta producción de la IL-18 está asociada con una desdiferenciación de las células tumorales que conlleva un aumento en el grado tumoral y estadio agrupado. La expresión elevada de IL-18 se descubrió que se relacionaba con el riesgo de padecer melanoma (Park et al. 2001) y con la progresión en el cáncer de mama (Eissa et al 2005). Por lo tanto, la IL-18 puede promover directamente la proliferación mediante la regulación de los estimuladores proliferativos.

La IL-18 se ha visto que está implicada en la migración del cáncer de pulmón (Jiang et al. 2003) y líneas celulares humanas de melanoma mediante la activación mitogénica de las vías de las proteínas kinasas (Jung et al. 2006). Las citocinas proinflamatorias también inducen la formación de receptores de células endoteliales para la fijación de las células tumorales en el proceso de metástasis (Langley et al 2001). En nuestro estudio, los polimorfismos relacionados con la producción de IL-18 se asociaron con el desarrollo de metástasis y la afectación ganglionar. Sin embargo, la metástasis es un proceso altamente complejo que puede implicar numerosos genes. Esto añade mayor complejidad al análisis de un polimorfismo específico, ya que cada gen individual es probable que contribuya sólo moderadamente al riesgo (Balkwill 2003). Esto puede explicar la baja correlación encontrada en nuestro estudio, en el que la producción de IL-18 sólo desempeñaría un papel secundario.

La asociación entre la supervivencia y los polimorfismos de IL-18 también fue analizada. Debido a que la media de supervivencia no llegaba al 50% no podemos confirmar o descartar la influencia estadística de esta variable como factor pronóstico.

Los polimorfismos relacionados con la producción de IL-18 estudiados están fuertemente correlacionados con estadios más avanzados del carcinoma de células renales, lo que explica la tendencia a una asociación con el riesgo de muerte [$p = 0,083$]. El análisis de Cox reveló que los polimorfismos IL-18 no son factores de supervivencia independientes. El polimorfismo IL-18-137 no influyó en el riesgo de muerte en los pacientes analizados. Proponemos que la influencia del polimorfismo IL-18-607 ($p = 0.083$) es más significativa que la de IL-18-137 ($p = 0.918$), fomentando fenotipos de mayor riesgo, como también se ha observado en el carcinoma nasofaríngeo (Nikiteas et al 2007).

VEGF

La molécula VEGF, un factor del crecimiento que regula la angiogénesis, juega un papel fundamental y sirve como factor de pronóstico en cánceres de mama y colon-rectal (Dassoulas et al. 2009; Jin et al. 2005). En el carcinoma renal de células claras, la molécula VEGF es un elemento clave en la vía de desarrollo de la angiogénesis tumoral, y la inhibición de él se ha utilizado como diana terapéutica (Albiges et al. 2011). Se ha demostrado que la inactivación del gen supresor tumoral von- Hippel–Lindau (VHL), conlleva una sobreexpresión de VEGF en la mayoría de los casos de cáncer renal de células claras (Neufeld et al. 1999). Por otra parte, varios estudios en cáncer renal han puesto de manifiesto que la expresión de VEGF se correlaciona significativa y positivamente con el tamaño del tumor, su estadio y grado nuclear (Jacobsen et al. 2000; Paradis et al. 2000). Jacobsen J et al. demostraron que los sueros que contenían VEGF se asociaban significativamente con el estadio tumoral, grado, y una baja supervivencia en pacientes con carcinoma renal.

El gen VEGF es altamente polimórfico (Jakubowska et al. 2008). Numerosos estudios sobre el cáncer se han centrado en los polimorfismos que hemos estudiado sobre VEGF debido a su papel en la producción de esta citocina. Los resultados de los pocos estudios sobre la asociación de los polimorfismos de VEGF con las características o la supervivencia de los pacientes con cáncer renal han sido motivo de controversia, y no ha habido ningún trabajo previo sobre casos y controles españoles que hayan estudiado esta relación. Nosotros no encontramos diferencias significativas en las frecuencias alélicas, en el genotipo o en la distribución de haplotipos entre los casos y controles, lo que

sugiere que los genotipos examinados no contribuyen al cáncer renal. En el estudio que hemos realizado, el polimorfismo VEGF (-460 T/C) no modificó el riesgo de padecer cáncer renal. Estos resultados se encuentran en desacuerdo con el trabajo en una población caucásica de Bruyère et al. en el que se demostraba que el polimorfismo VEGF -460 se relacionaba con riesgo de padecer cáncer renal (Bruyère et al. 2010). En nuestro estudio, con un tamaño muestral mayor que en el trabajo de Bruyère, la distribución genotípica en los casos y controles no se desvió significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que en el trabajo de Bruyère et al. se encontraban en desequilibrio de Hardy-Weinberg. La desviación puede indicar un problema en los ensayos de genotipado ya que utilizaron para el análisis de los polimorfismos un determinado método, el cual, se ha visto que tiene poca precisión y reproducibilidad (Ding et al. 2003). Las ventajas comparativas de nuestro estudio incluyen, la homogeneidad étnica de la población de estudio y el gran número de casos. Nuestros resultados de genotipado están de acuerdo con las conclusiones de otras series de controles en las poblaciones españolas (García-Closas et al. 2007; Rodríguez-Rodríguez et al. 2011), y los haplotipos identificados y su frecuencia son similares a los hallados en otra población caucásica (Zhao et al. 2008).

Los polimorfismos en el gen del VEGF han sido asociados con una serie de características diferentes de cáncer. En general, el impacto de estos polimorfismos varía en función de la etnia y el tipo de cáncer (Heist et al. 2008; Dassoulas et al. 2009). Ninguno de los polimorfismos solos (VEGF -2578, -460, +405 o +936) o haplotipos tuvieron una asociación significativa con el riesgo de padecer cáncer de próstata, mama y de estomago ([Langsenlehner et al 2008 ; Wang et al. 2011; Zhou et al. 2011). En el carcinoma renal se han visto diferentes resultados dependiendo de los grupos étnicos estudiados. Por ejemplo, el genotipado CA+AA del polimorfismo VEGF (-2578 C/A) se asocio débilmente con una menor frecuencia de metástasis en nódulos linfáticos y tenía una asociación significativa con una supervivencia favorable al tumor en un población japonesa (Kawai et al. 2007) pero no en una población caucásica, aunque este último trabajo solo contaban con una casuística de 51 pacientes (Bruyère et al. 2010). En nuestra población caucásica, no encontramos ninguna correlación de la supervivencia con el genotipado de los polimorfismos de VEGF, ni con sus haplotipos.

Dada la importancia que parece tener esta proteína en la generación y conservación de la vascularización tumoral especialmente en el cáncer renal, con una sobreexpresión en la mayoría de las muestras del tumor, puede parecer sorprendente que ninguno de los polimorfismos estudiados estuviese relacionado con el riesgo o los parámetros clínicos del cáncer renal. La sobreexpresión de la molécula VEGF en el cáncer renal puede ser debida a las características biológicas mismas del cáncer, y no por los polimorfismos en la molécula de VEGF. En este cáncer, la función anómala de la proteína VHL induce constitutivamente una desregulación permanente de la proteína HIF- α , que como ya se hablo antes es un factor regulador positivo de los genes de la hipoxia inducidos en los cuales se incluye el VEGF (Neufeld et al. 1999). La inactivación bialelica del gen VHL, observado en el carcinoma renal de células claras, podría explicar la sobreexpresión de esta citocina (al menos en el tejido tumoral) en la mayoría de los cáncer renales de células claras (que representan el 74.52% de nuestros casos), independientemente de las variaciones genéticas del VEGF. Por lo tanto, apoyamos la hipótesis de que el gen VEGF no está regulado normalmente en el cáncer renal de células claras y que el exceso de producción de esta citocina es debido a la expresión permanente del HIF- α , anulando el posible efecto de los polimorfismos genéticos en la expresión del gen VEGF.

De acuerdo con nuestros tres estudios sobre polimorfismos genéticos realizados en IL-10, IL-18 y VEGF concluimos que:

- El estado heterocigoto (A/G) del polimorfismo para el gen de la IL-10 (-1082 G/A) está asociado con una mayor agresividad clínica en el carcinoma renal. Nuestra hipótesis es que el genotipo IL-10-G / A, asociada con una producción intermedia de esta citocina, puede ejercer un efecto inmunosupresor eficaz mediante la inhibición de las respuestas citotóxica y proinflamatoria Th-1, sin inducir un efecto antiangiogénico potente, lo que favorece la progresión del tumor en el cáncer renal.
- Los polimorfismos genéticos de la región promotora estudiados en IL-18 afectan a la progresión y el pronóstico del cáncer renal. La IL-18 se correlaciona fuertemente con mayor tamaño del tumor, grado y estadio, la afectación ganglionar y metástasis.
- Los polimorfismos genéticos del VEGF no parecen ejercer una influencia significativa en el riesgo, progresión y el pronóstico del cáncer renal, al menos en la

población española. Sin embargo, como el VEGF es altamente polimórfica, no podemos descartar la posibilidad de que otros polimorfismos VEGF podrían contribuir en el riesgo de padecer cáncer renal.

Se deben realizar estudios de genotipado en un grupo mayor de pacientes y controles, estratificada por etnia, género, etiología y localización del tumor, para confirmar estos hallazgos, e incluir otros posibles polimorfismos genéticos funcionales que intervienen en la inmunidad innata y la inflamación crónica. Estudios adicionales podrían ayudar a identificar terapias específicas contra tumores basadas en el conocimiento del genotipo del paciente. Por ejemplo, en el caso de pacientes con un genotipado de alto productor de IL-18, el tratamiento con inhibidores farmacológicos diana frente a HIF y VEGF podría resultar eficaz como terapia del cáncer (Kung et al. 2004).

En resumen, se han descrito en este trabajo algunas características del cáncer renal, las cuales lo hacen distinto a gran parte de las neoplasias. Por una parte, esta neoplasia se caracteriza por presentar una muy baja frecuencia de alteraciones de la maquinaria de presentación antigénica. No se han descrito mutaciones en el gen de B2m y la incidencia de pérdida de heterocigosidad es también comparativamente muy baja. La transformación neoplásica en el cáncer renal provoca en más del 90% de los casos la neoexpresión de antígenos de histocompatibilidad HLA de clase I. Los tumores además de expresar altos niveles de moléculas HLA de clase I, se encuentran también densamente infiltrados, características que en principio los haría muy inmunogénicos. Estas características son compatibles con el hecho de que el cáncer renal haya sido considerado diana para múltiples ensayos de inmunoterapia. Sin embargo, a pesar de la enorme heterogeneidad celular puesta de manifiesto recientemente, ni la progresión tumoral ni la inmunointervención parecen modificar la expresión de antígenos HLA de clase I y no hay constatación por tanto de inmunoselección de variantes débilmente inmunogénicas, como se han descrito en melanomas, colon, vejiga etc. En este contexto una posible explicación sería que la proliferación tumoral mantenida quizás por los altos niveles de producción de VEGF, superaría la cinética de una potencial respuesta antitumoral. Es probable, que la producción de factores inmunosupresores impidan una respuesta antitumoral eficaz y hacen innecesario el deterioro de la maquinaria de presentación antigénica. En este sentido, por ejemplo, tenemos datos (no mostrados en esta tesis) que intratumoralmente se están expresando niveles más altos de factores

inmunosupresores tales como IDO y Arginasa. La presencia de macrófagos como un elemento celular relevante en el infiltrado de estos cánceres puede estar relacionada con este hallazgo y con la inmunosupresión. También, datos previos de nuestro grupo, revelaron un cambio progresivo en el balance de infiltración TH1/TH2 durante la progresión tumoral y una disminución significativa en los niveles de producción de citocinas proinflamatorias y aumento de citocinas del tipo TGF-beta. En muchos tumores estas citocinas modifican de forma determinante el curso del tumor. No obstante del estudio de los polimorfismos genéticos que hemos realizado, se podría deducir que el componente inflamatorio contribuiría antes que al inicio, a la progresión e incluso desarrollo metastático del cáncer renal. No obstante queda bastante por conocer acerca de la compleja interacción entre el tumor y el sistema inmunitario en aras de establecer nuevos protocolos más eficientes de inmunoterapia.

VII. CONCLUSIONES

1. El tejido renal normal se caracteriza por presentar niveles de expresión de antígenos HLA de clase I no detectables por las técnicas inmunohistoquímicas convencionales. La ausencia de expresión de estas moléculas se circunscribe sólo a unos pocos tejidos caracterizados por privilegio inmunológico: sistema nervioso, cornea, hígado, testículos, cámara anterior del ojo, citotrofoblastos etc.
2. La transformación neoplásica conlleva un incremento notable en la expresión de moléculas HLA de clase I que es debida a un incremento en el nivel de transcripción de estos genes.
3. El escape inmunológico en el cáncer renal, no parece transcurrir por alteraciones en la expresión de antígenos HLA de clase I. De hecho, las alteraciones en la expresión de estas moléculas (pérdida total o parcial) son excepcionales en esta neoplasia. Además tampoco la inmunointervención (inmunoterapia inespecífica (IL2/IFN- α) o específica (péptidos) induce cambios importantes en el nivel de expresión de estas moléculas. Estas características contrastan con lo observado en otras neoplasias
4. El grado, tipo y patrón de infiltración del sistema inmunológico en el microambiente tumoral no influye en el tamaño, estadio del tumor y en la supervivencia del paciente. Aunque nuestros resultados sólo muestran una tendencia a la significación, hemos observado un aumento de linfocitos T-CD8 intratumorales en pacientes con menor supervivencia. Estos resultados necesitan confirmarse en una serie mayor, pero también serían opuestos a lo descrito en otros cánceres.
5. Ninguno de los polimorfismos de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias estudiados están involucrados en el riesgo de padecer cáncer renal, lo cual podría sugerir que la inflamación no es un factor importante en las etapas iniciales del desarrollo de esta neoplasia. Esta característica también es diferente a lo observado en otras tumores en los que la de inflamación crónica persistente constituye un elemento importante de riesgo de transformación neoplásica .

6. Polimorfismos de IL10 y IL18 se han encontrado asociados a progresión y desarrollo metastásico del cáncer renal. Si bien en IL10, su efecto sobre el crecimiento tumoral es complejo y va a depender de un delicado balance entre los efectos antiangiogénicos (antitumoral) e inmunosupresores (protumoral), la asociación encontrada en IL18 puede explicarse más en el contexto del papel que esta citoquina tienen en angiogénesis antes que en su participación como regulador de la respuesta inmunológica.

7. Polimorfismos genéticos de VEGF que modifican la expresión de esta citoquina, no se asocian a riesgo de cáncer renal probablemente porque el nivel de producción de esta citoquina ya se encuentra desregulado en el cáncer renal.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Cellular and molecular immunology. Ed. Saunders Elsevier, 2007.
- Adams, J.M., and Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007 26, 1324–1337.
- 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.
- Algaba F, Arce Y, Trias I, Santaularia JM, Rosales A. Aplicaciones clínicas de las actuales clasificaciones del cáncer renal. *Act Urol Esp* 2006; 30: 372-385
- Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev.* 2008 Apr;222:155-61.#
- Alonso R, Suarez A, Castro P, Lacave AJ, Gutierrez C. Influence of interleukin-10 genetic polymorphism on survival rates in melanoma patients with advanced disease. *Melanoma Res* 2005;15:53–60.
- Aptsiauri N, Garcia-Lora AM, Cabrera T. MHC Class I Antigens In Malignant Cells: Immune Escape and Response to Immunotherapy. SpringerBriefs in Cancer Research. 2013 Springer. ISBN 978-1-4614-6543-0.
- Ascierto ML, De Giorgi V, Liu Q, Bedognetti D, Spivey TL, Murtas D, Uccellini L, Ayotte BD, Stroncek DF, Chouchane L, et al. An immunologic portrait of cancer. *J Transl Med.* 2011; 9: 146.
- Aspord, C., Pedroza-Gonzalez, A., Gallegos, M., Tindle, S., Burton, E.C., Su, D., Marches, F., Banchereau, J., and Palucka, A.K. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J. Exp. Med.* 2007 204, 1037–1047.
- Atkins D, Ferrone S, Schmahl GE, Störkel S, Seliger B. Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma?. *J Urol* 2004; 171:885-9.
- Baeriswyl, V., and Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 2009 19, 329–337.
- Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005,7(3):211-7.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001 357: 539–545.
- Balkwill F. Chemokine biology in cancer. *Semin Immunol* 2003;15:49–55.
- Baştürk B, Yavaşçaoğlu I, Vuruşkan H, Göral G, Oktay B, Oral HB. Cytokine gene polymorphisms as potential risk and protective factors in renal cell carcinoma. *Cytokine.* 2005 Apr 7;30(1):41-5.
- Becker, C., Fantini, M.C., Schramm, C., Lehr, H.A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004 21, 491–501.
- Benitez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA, Bresseur F, Jiménez P, Marchand M, Oliva MR, van Baren N, Cabrera T, Andry G, Landry C, Ruiz-Cabello F, Boon T, Garrido F. 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.
- Berg, D.J., Davidson, N., Kuhn, R., Müller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Bui JD & Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol.* 2007; 19: 203–8.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 2003 3, 401–410.
- Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, Paschen A, Garrido F. Implication of the β 2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Sep;61(9):1359-71.
- Berx, G., and van Roy, F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009 1, a003129.
- Bhardwaj N. Harnessing the immune system to treat cancer. *J Clin Invest.* 2007 May;117(5):11306
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004 432, 332–337.
- Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Pages F, Galon J. Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol* 2010 22:215–222.
- Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 2002,196(3):254-65

- Blasco, M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 2005 6, 611–622.
- Bleumer I, Oosterwijk E, de Mulder P, Mulders PF. Immunotherapy for renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2003; 44:65–75.
- Boles, K. S., Barchet, W., Diacovo, T., Cella, M. & Colonna, M. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood* 2005 106, 779–786.
- Brady CS, Bartholomew JS, Burt DJ, Duggan-Keen MF, Glenville S, Telford N, Little AM, Davidson JA, Jimenez P, Ruiz-Cabello F, Garrido F, Stern PL. Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens* 2000; 55:401-11.
- Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, et al. Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx (APPROVe) Trial Investigators. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med.* 2005,17;352(11):1092-102.
- Bromwich EJ, McArdle PA, Canna K, et al. The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. *Br J Cancer.* 2003;89:1906–1908.
- 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.
- Bukowski RM, Rayman P, Uzzo R, Bloom T, Sandstrom K, Peereboom D, et al. Signal transduction abnormalities in T lymphocytes from patients with advanced renal carcinoma: clinical relevance and effects of cytokine therapy. *Clin Cancer Res* 1998;4(10):2337–47.
- Burkhart, D.L., and Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* 2008 8, 671–682.
- Cabrera T, Collado A, Fernandez MA, Ferron A, Sancho J, Ruiz-Cabello F, Garrido F. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* 1998; 52:114-23.
- Cabrera T, Fernandez MA, Sierra A, Garrido A, Herruzo A, Escobedo A, Fabra A, Garrido F. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol* 1996; 50:127-34.
- Cabrera T, Salinero J, Fernandez MA, Garrido A, Esquivias J, Garrido F. High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas. *Hum Immunol* 2000; 61:499-506.
- Cai XY, Gao Q, Qiu SJ, Ye SL, Wu ZQ, Fan J, Tang ZY. Dendritic cell infiltration and prognosis of human hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006;132:293–301.
- Campoli M, Ferrone S. HLA antigen and NK cell activating ligand expression in malignant cells: a story of loss or acquisition. *Semin Immunopathol.* 2011 Jul;33(4):321-34.
- Campoli M, Ferrone S. HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene.* 2008; 27:5869–5885.
- Cardi G, Heaney JA, Schned AR, Phillips DM, Branda MT, Ernstoff MS. T-cell receptor zeta-chain expression on tumor-infiltrating lymphocytes from renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1997;57(16):3517-9 [Erratum in: *Cancer Res* 1997;57(21):4973].
- Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249–57.
- Carretero R, Cabrera T, Gil H, Saenz-Lopez P, Maleno I, Aptsiauri N, Cozar JM, Garrido F. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer induces selection of human leukocyte antigen class I-deficient tumor cells. *Int J Cancer.* 2011 Aug 15;129(4):839-46.
- Cavallaro, U., and Christofori, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2004 4, 118–132.
- Chang CC, Campoli M, Ferrone S. Classical and nonclassical HLA class I antigen and NK cell activating ligand changes in malignant cells: current challenges and future directions. *Adv Cancer Res.* 2005; 93:189–234.
- Cheng, N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, and Moses, H.L. Transforming growth factor-beta signalling deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* 2008 6, 1521–1533.

- Cho D, Song H, Kim YM, Houh D, Hur DY, Park H, et al. Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates. *Cancer Res* 2000; 60:2703–9.
- Cho ML, Jung YO, Moon YM, Min SY, Yoon CH, Lee SH, et al. Interleukin-18 induces the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via AP-1-dependent pathways. *Immunol Lett* 2006;103:159–66.
- Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, Hida Y, Oshikiri T, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Murakami S, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. CD4⁺ and CD8⁺ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:1555–9.
- Choi NM, Majumder P, Boss JM. Regulation of major histocompatibility complex class II genes. *Curr Opin Immunol*. 2011 Feb;23(1):81–7.
- Choueiri TK, Plantade A, Elson P, Negrier S, Ravaud A, Oudard S, et al: Efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic papillary and chromophobe renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 127–131.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009 30, 1073–1081.
- Condeelis, J., and Pollard, J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006 124, 263–266.
- Coppin C, Porzolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005 Jan;(1):CD001425.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860–7.
- Cozar JM, Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F, Vilchez JR, Tallada M, et al. High incidence of CTLA-4 AA (CT60) polymorphism in renal cell cancer. *Hum Immunol* 2007;68:698–704.
- Cozar JM, Tallada M, Espejo E, Vicente J. Estado actual de la inmunoterapia en el cáncer renal diseminado. *Rev. Urol.* 2002: 3:62-72.
- Cresswell P, Turner MJ, Ji S. Papain-solubilized HL-A antigens from cultured human lymphocytes contain 2 peptide fragments—(histocompatibility-glycoproteins membrane-molecular weight). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973 70:1603–1607.
- Cresswell P, Bangia N, Dick T & Diedrich G. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev.* 1999; 172: 21-28.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004,10(9):942-9.
- Daar, A. S., Fuggle, S. V., Fabre, J. W., Ting, A., and Morris, P. J. The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation* 1984: 38: 287–92.
- Dalglish GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A, Davies H, Edkins S, Hardy C, Latimer C, Teague J, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Forbes S, Jia M, Jones D, Knott H, Kok CY, Lau KW, Leroy C, Lin ML, McBride DJ, Maddison M, Maguire S, McLay K, Menzies A, Mironenko T, Mulderigg L, Mudie L, O'Meara S, Pleasance E, Rajasingham A, Shepherd R, Smith R, Stebbings L, Stephens P, Tang G, Tarpey PS, Turrell K, Dykema KJ, Khoo SK, Petillo D, Wondergem B, Anema J, Kahnoski RJ, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature.* 2010 Jan 21;463(7279):360-3.
- 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.
- Davies, M.A., and Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 2010 29, 5545–5555.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:256–269.
- De Palma, M., Murdoch, C., Venneri, M.A., Naldini, L., and Lewis, C.E. Tie2 expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol.* 2007 28, 519–524.
- De Visser, K.E., Eichten, A., and Coussens, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 2006 6, 24–37.

- Della Porta M, Danova M, Rigolin GM, Brugnatelli S, Rovati B, Tronconi C, Fraulini C, Russo Rossi A, Riccardi A, Castoldi G. Dendritic cells and vascular endothelial growth factor in colorectal cancer: correlations with clinicobiological findings. *Oncology* 2005 68, 276–284.
- Demeter J, Porzolt F, Ramisch S et al. Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and Lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 97: 107-12.
- DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens, L.M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 29, 309–316.
- DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., and Coussens, L.M. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 2009 16, 91–102.
- Deshpande, A., Sicinski, P., and Hinds, P.W. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 2005 24, 2909–2915.
- Di Carlo E, Coletti A, Modesti A, Giovarelli M, Forni G, Musiani P. Local release of interleukin-10 by transfected mouse adenocarcinoma cells exhibits pro- and anti-inflammatory activity and results in a delayed tumor rejection. *Eur Cytokine Netw* 1998;9:61–8.
- Ding C, Cantor CR. Direct molecular haplotyping of long-range genomic DNA with M1-PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7449.
- Donskov F, Bennedsgaard KM, Hokland M, Marcussen N, Fisker R, Madsen HH, et al. Leukocyte orchestration in blood and tumour tissue following interleukin-2 based immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53(8):729–39.
- Donskov F, Hokland M, Marcussen N, Torp Madsen HH, von der Maase H. Monocytes and neutrophils as ‘bad guys’ for the outcome of interleukin-2 with and without histamine in metastatic renal cell carcinoma—results from a randomised phase II trial. *Br J Cancer* 2006;94(2):218–26.
- Donskov F, von der Maase H. Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:1997–2005.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ & Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002; 3: 991- 98.
- Dunn GP, Koebel CM & Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 836-48.
- D’Urso CM, Wang ZG, Cao Y, Tatake R, Zeff RA, Ferrone S. Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J Clin Invest* 1991: 87:284-92
- Dutcher JP, de Souza P, McDermott D, Figlin RA, Berkenblit A, Thiele A, et al: Effect of temsirolimus versus interferon-alpha on outcome of patients with advanced renal cell carcinoma of different tumor histologies. *Med Oncol* 2009; 26: 202–209.
- Eble JN, Togashi K, Pisani P. Renal cell carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. *Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. World Health Organization Classification of Tumors.* Lyon: IARC Press; 2004. p. 12–43.
- Egeblad, M., Nakasone, E.S., and Werb, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell* 2010 18, 884–901.
- Eissa SA, Zaki SA, El-Maghraby SM, Kadry DY. Importance of serum IL-18 and RANTES as markers for breast carcinoma progression. *J Egypt Natl Canc Inst* 2005;17:51–5.
- 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.
- Erdman, S.E., Sohn, J.J., Rao, V.P., Nambiar, P.R., Ge, Z., Fox, J.G., and Schauer, D.B. CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. *Cancer Res.* 2005 65, 3998–4004.
- Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylak C, Chevreau C, Filippek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A, Moore N; AVOREN Trial investigators. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007 Dec;370(9605):2103-11
- Fanjun Kong, Jie Liu, Yongheng Liu, Bao Song, Hualing Wang, Wenchao Liu. Association of interleukin-10 gene polymorphisms with breast cancer in a Chinese population. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010; 29(1): 72.

- Farhat K, Hassen E, Bouzgarrou N, Gabbouj S, Bouaouina N, Chouchane L. Functional IL-18 promoter gene polymorphisms in Tunisian nasopharyngeal carcinoma patients. *Cytokine* 2008;43:132–7.
- Feenstra M, Verdaasdonk M, van der Zwan AW, de Weger R, Slootweg P, Tilanus M. Microsatellite analysis of microdissected tumor cells and 6p high density microsatellite analysis in head and neck squamous cell carcinomas with down-regulated human leukocyte antigen class I expression. *Lab Invest* 2000; 80:405–14.
- Feenstra M, Verdaasdonk M, van der Zwan AW, de Weger R, Slootweg P, Tilanus M. Microsatellite analysis of microdissected tumor cells and 6p high density microsatellite analysis in head and neck squamous cell carcinomas with down-regulated human leukocyte antigen class I expression. *Lab Invest* 2000;80:405–14.
- Ferrara, N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 21, 21–26.
- Finke JH, Zea AH, Stanley J, Longo DL, Mizoguchi H, Tubbs RR, et al. Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1993;53(23):5613–6.
- Fleming S, O'Donnell M.: Surgical pathology of renal epithelial neoplasms: recent advances and current status. *Histopathology* 2000; 36(3):195-202.
- Fossa SD, Kjolseth I, Lund G. Radiotherapy of metastases from renal cancer. *Eur Urol* 1982;8(6):340- 2.
- Frank I, Leibovich BC, Blute ML, Chevillie JC, Kwon ED. Mononuclear cell infiltration in clear-cell renal cell carcinoma independently predicts patient survival. *Cancer.* 2006 Jul 1;107(1):46-53.
- Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C & Galon J: The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12: 298-306
- Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, Kato K, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2004;28:e26–31.
- Gallimore, A.M., and Simon, A.K. Positive and negative influences of regulatory T cells on tumour immunity. *Oncogene* 2008 27, 5886–5893.
- Galluzzi, L., and Kroemer, G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* 2008 135, 1161–1163.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH & Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006; 313: 1960-64.
- Galon J, Fridman W-H & Pages F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: A novel perspective. *Cancer Res.* 2007; 67: 1883-86.
- Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF, Ascierto PA, Fox BA. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med.* 2012 Oct 3;10:205.
- Galon J, Pagès F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, Gajewski TF & Ascierto PA. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med.* 2012; 10:1.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce- Page` s, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006 313, 1960–1964.
- Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, Xu Y, Li YW, Tang ZY.
- Gao, S.P., Mark, K.G., Leslie, K., Pao, W., Motoi, N., Gerald, W.L., Travis, W.D., Bornmann, W., Veach, D., Clarkson, B., and Bromberg, J.F. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J. Clin. Invest.* 2007 117, 3846–3856.

- 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.
- García-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol.* 2003 Jun;195(3):346-55.
- García-Lora A, Martínez M, Algarra I, Gaforio JJ, Garrido F. MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components. *Int J Cancer.* 2003 Sep 10;106(4):521-7
- García-Ruano AB, Méndez R, Romero JM, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Analysis of HLA-ABC locus-specific transcription in normal tissues. *Immunogenetics.* 2010 Dec;62(11-12):711-9
- Garrido F, Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res.* 2001;83:117-58.
- Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today.* 1993 Oct;14(10):491-9.
- 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.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 1997 Feb;18(2):89-95.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012 Mar 8;366(10):883-92.
- Giordani, L., Bruzzi, P., Lasalandra, C., Quaranta, M., Schittulli, F., Della, A. et al: Association of breast cancer and polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha genes. *Clin Chem*, 2003 49: 1664,
- Gore ME, Griffin CL, Hancock B, Patel PM, Pyle L, Aitchison M, James N, Oliver RT, Mardiak J, Hussain T, Sylvester R, Parmar MK, Royston P, Mulders PF. Interferon alfa-2a versus combination therapy with interferon alfa-2a, interleukin-2, and fluorouracil in patients with untreated metastatic renal cell carcinoma (MRC RE04/ EORTC GU 30012): an open-label randomised trial. *Lancet* 2010 Feb 20;375(9715):641-8.
- 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.
- Grivnennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., and Karin, M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009 15, 103–113.
- Grivnennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010 140, 883–899.
- Gudmundsdottir I, Gunnlaugur Jonasson J, Sigurdsson H, Olafsdottir K, Tryggvadottir L, Ogmundsdottir HM. Altered expression of HLA class I antigens in breast cancer: association with prognosis. *Int J Cancer* 2000;89:500–5.
- Guirado M, Gil H, Saenz-Lopez P, Reinboth J, Garrido F, Cozar JM, Ruiz-Cabello F, Carretero R. Association between C13ORF31, NOD2, RIPK2 and TLR10 polymorphisms and urothelial bladder cancer. *Hum Immunol.* 2012 Jun;73(6):668-72.
- Hanada, T., Kobayashi, T., Chinen, T., Saeki, K., Takaki, H., Koga, K., Minoda, Y., Sanada, T., Yoshioka, T., Mimata, H., et al. IFN γ -dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 2006 203, 1391–1397.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- Hanahan, D., and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996 86, 353–364.

- 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;173:709–12.
- Hedvat, M., Huszar, D., Herrmann, A., Gozgit, J.M., Schroeder, A., Sheehy, A., Buettner, R., Proia, D., Kowolik, C.M., Xin, H., et al. The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors. *Cancer Cell* 2009 16, 487–497.
- Heist RS, Zhai R, Liu G, et al. VEGF polymorphisms and survival in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:856.
- Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 2006;12:5423–34.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:711–23.
- Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*. 2004, 26;306(5701):1568-71.
- Howell WM, Rose-Zerilli MJ. Interleukin-10 polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis. *Fam Cancer* 2006;5:143–9.
- Howell WM, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM. IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun* 2001;2:25–31.
- Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: The melanoma experience. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19: 697–703.
- Huang S, Xie K, Bucana CD, Ullrich SE, Bar-Eli M. Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: Potential inhibition of angiogenesis. *Clin Cancer Res* 1996;2:1969–79.
- Hudson, J.D., M.A. Shoaibi, R. Maestro, A. et al. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.* 1999; 190: 1375–1382.
- Huiping Xue, Bing Lin, Jianfu An, Yuyuan Zhu, Gang Huang. Interleukin-10-819 promoter polymorphism in association with gastric cancer risk *BMC Cancer*. 2012; 12: 102.
- Hynes, N.E., and MacDonald, G.. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009 21, 177–184.
- Ibrahim EC, Allory Y, Commo F, Gattegno B, Callard P, Paul P. Altered pattern of major histocompatibility complex expression in renal carcinoma: tumor-specific expression of the nonclassical human leukocyte antigen-G molecule is restricted to clear cell carcinoma while up-regulation of other major histocompatibility complex antigens is primarily distributed in all subtypes of renal carcinoma. *Am J Pathol* 2003; 162:501-8.
- Igarashi T, Takahashi H, Tobe T, Suzuki H, Mizoguchi K, Nakatsu HO, Ito H. Effect of tumor-infiltrating lymphocyte subsets on prognosis and susceptibility to interferon therapy in patients with renal cell carcinoma. *Urol Int* 2002;69:51–6.
- Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated Jochems and Schlom. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis 577 with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007;25:2586–93.
- J.C. Machado, C. Figueiredo, P. Canedo, P. Pharoah, R. Carvalho, S. Nabais et al. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma *Gastroenterology*, 2003.125 (2), pp. 364–371
- Jackson RJ, Loh SC, Gokaslan ZL. Metastatic renal cell carcinoma of the spine: surgical treatment and results. *J Neurosurg* 2001 Jan;94(1 Suppl):18-24.
- 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 30
- Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, von der Maase H. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2009;27:4709–17.
- Jiang DF, Liu WL, Lu YL, Qiu ZY, He FC. Function of IL-18 in promoting metastasis of lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2003;25:348–52.

- Jiang, B.H., and Liu, L.Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* 2009 102, 19–65.
- Jin Q, Hemminki K, Enquist K, et al. Vascular endothelial growth factor
- Jochems C, Schlom J. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011 May 1;236(5):567-79.
- Jones J, Libermann TA: Genomics of renal cell cancer: the biology behind and the therapy ahead. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 685s– 692s.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 2009 9, 239–252.
- Judith Palacios y Gaspar Ibarluzea cáncer renal revisión urológica clínica 2009. *Revisión Urología Clínica Bilbao* 2009.
- Jung MK, Song HK, Kim KE, Hur DY, Kim T, Bang S, et al. IL-18 enhances the migration ability of murine melanoma cells through the generation of ROI and the MAPK pathway. *Immunol Lett* 2006;107:125–30.
- Kageshita T, Ishihara T, Campoli M, Ferrone S. Selective monomorphic and polymorphic HLA class I antigenic determinant loss in surgically removed melanoma lesions. *Tissue Antigens* 2005: 65:419–428
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006 6, 392–401.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):301-10.
- Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007 449, 557–563.
- Kaufman HL, Rao JB, Irvine KR, Bronte V, Rosenberg SA, Restifo NP. Interleukin-10 enhances the therapeutic effectiveness of a recombinant poxvirus-based vaccine in an experimental murine tumor model. *J Immunother* 1999;22:489–96.
- Kawai Y, Sakano S, Korenaga Y, Eguchi S, Naito K. Associations of single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene with the characteristics and prognosis of renal cell carcinomas. *Eur Urol* 2007;52:1147–55.
- Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M, Snijders PJ, Walboomers JM, Hunter RD, Dyer PA, Stern PL. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br J Cancer* 1995: 72:405-11.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010 141, 52–67.
- Kim CM, Vocke C, Torres-Cabala C, et al. Expression of hypoxia inducible factor-1 α and 2 α in genetically distinct early renal cortical tumors. *J Urol* 2006;175(5):1908 –14.
- Kim J, Shao Y, Kim SY, Kim S, Song HK, Jeon JH, et al. Hypoxia-induced IL-18 increases hypoxia-inducible factor-1 α expression through a Rac1-dependent NF-kappaB pathway. *Mol Biol Cell* 2008;19:433–44.
- Kim WY, Kaelin WG Jr. Molecular pathways in renal cell carcinoma— rationale for targeted treatment. *Semin Oncol* 2006;33(5): 588–95.
- Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007 121, 1–14.
- Kindt, T.; Osborne, B.; Goldsby, R. *Kuby immunology*. 6. Freeman; San Francisco: 2006.
- Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH & Galon J. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 5944-51.
- Kitamura H, Honma I, Torigoe T, Asanuma H, Sato N, Tsukamoto T. Down-regulation of HLA class I antigen is an independent prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 2007: 177:1269-72.
- Kobayashi KS, van den Elsen PJ. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2012 Dec;12(12):813-20.
- Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T, Nakajima A, Hirohashi S. FOXP3 β regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2007;13:902–11.

- Kohrt, H.E., Nouri, N., Nowels, K., Johnson, D., Holmes, S., and Lee, P.P. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Med.* 2005 2, e284.
- Kolbeck PC, Kaveggia FF, Johansson SL, Grune MT, Taylor RJ. The relationships among tumor-infiltrating lymphocytes, histopathologic findings, and long-term clinical follow-up in renal cell carcinoma. *Mod Pathol.* 1992;5:420–425.
- Koopman LA, Corver WE, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 2000; 191:961-76.
- Krishnakumar S, Sundaram A, Abhyankar D, Krishnamurthy V, Shanmugam MP, Gopal L, et al. Major histocompatibility antigens and antigen-processing molecules in retinoblastoma. *Cancer* 2004;100:1059–69.
- Kundu N, Beaty TL, Jackson MJ, Fulton AM. Antimetastatic and antismog activities of interleukin 10 in a murine model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:536–41.
- Kung AL, Zabludoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, et al. Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer Cell* 2004;6:33–43.
- Laghi, L., Bianchi, P., Miranda, E., Balladore, E., Pacetti, V., Grizzi, F., Allavena, P., Torri, V., Repici, A., Santoro, A., et al. CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *Lancet Oncol.* 2009 10, 877–884.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics . *CA Cancer J Clin.* 1999: 49:8-31.
- Langley RR, Carlisle R, Ma L, Specian RD, Gerritsen ME, Granger DN. Endothelial expression of vascular cell adhesion molecule-1 correlates with metastatic pattern in spontaneous melanoma. *Microcirculation* 2001;8:335–45.
- Langowski, J.L., Kastelein, R.A., and Oft, M. Swords into plowshares: IL-23 repurposes tumor immune surveillance. *Trends Immunol.* 2007 28, 207–212.
- Langowski, J.L., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J.D., Chen, T., Smith, K., Basham, B., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Oft, M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006 442, 461–465.
- Langsenlehner T, Langsenlehner U, Renner W, et al. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the gene for vascular endothelial growth factor and risk of prostate cancer. *Eur J Cancer* 2008;44:1572.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010 141, 1117–1134.
- Li W-W and Karin M . A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *Journal of Clinical Investigation*; 2007; 117,1175-93
- LiG, Satayamoorthy K, Meier F, Berking C, et al. . Function and regulation of melanoma–stromal fibroblast interactions: when seed meets soil. *Oncogene* 2003;22:3162–71.
- Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 2001;193: 727–40.
- Lin, W.W., and Karin, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* 2007 117, 1175–1183.
- Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007;117:1175–83.
- Lipponen PK, Eskelinen MJ, Jauhiainen K, Harju E, Terho R. Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer. *Eur J Cancer* 1992;29A:69–75
- Liu Y, Lin N, Huang L, Xu Q, Pang G. Genetic polymorphisms of the interleukin-18 gene and risk of prostate cancer. *DNA Cell Biol* 2007;26:613–8.
- Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr: ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006, 24:5313–5327.
- Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004 432, 307–315.
- 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.

- Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T, Paco L, López-Nevot MA, Collado A, Ferrón A, Garrido F. Distribution of HLA class I phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 2004; 56:244-253.
- 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.
- Maleno I, Lopez-Nevot MA, Cabrera T, Salinero J, Garrido F. Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: High frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:389–396.
- Mandriota SJ, Turner KJ, Davies DR, et al. HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys. Evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell* 2002;1(5):459–68.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008 454, 436–444.
- Margaret M. Madeleine, Lisa G. Johnson, Mari Malkki, Alexa J. Resler, Effie W. Petersdorf, Barbara McKnight, Kathleen E. Malone Genetic variation in proinflammatory cytokines IL6, IL6R, TNF-region, and TNFRSF1A and risk of breast cancer *Breast Cancer Res Treat* 2012.
- Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev*. 2008;222:162-79.
- Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumours from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000; 74:181–263.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399(6733):271–5.
- McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62:3369–72.
- Menon AG, Morreau H, Tollenaar RA, Alphenaar E, Van Puijenbroek M, Putter H, et al. Down-regulation of HLA – a expression correlates with a better prognosis in colorectal cancer patients. *Lab Invest* 2002;82:1725–33.
- Mihm MC, Clemente C, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases—a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest* 1996 74: 43–47.
- Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G et al Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 2011 29:610–618.
- Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: A counterpoint. *J Leukoc Biol* 2005;78:1043–51.
- Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(1):35-53.
- Mohamed, M.M., and Sloane, B.F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006 6, 764–775.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2008 8, 618–631.
- Murphy, K.M.; Travers, P.; Walport, M. *Janeway's immunobiology—immunobiology: the immune system* Janeway. Garland Science; London: 2007.
- Nagtegaal ID, Quirke P, Schmoll HJ: Has the new TNM classification for colorectal cancer improved care? *Nat Rev Clin Oncol* 2011, 9:119–12
- Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:53–72.
- Nakano O, Sato M, Naito Y, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res*. 2001;61:5132–5136.
- Nelson D, Ganss R. Tumor growth or regression: Powered by inflammation. *J Leukoc Biol* 2006;80:685–90.

- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9.
- Nikiteas N, Yannopoulos A, Chatzitheofylaktou A, Tsigris C. Heterozygosity for interleukin-18 -607A/C polymorphism is associated with risk for colorectal cancer. *Anticancer Res* 2007;27:3849–53.
- Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(2):721s–6s.
- Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisseleva E, Parman KS, Nadaf S, Carbone DP. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 2003 101, 4878–4886.
- Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 1995;378:88–91.
- Ostrand-Rosenberg, S., and Sinha, P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J. Immunol.* 2009 182, 4499–4506.
- Pageès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C & Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene.* 2010; 29: 1093-102.
- Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009 27:5944– 5951.
- Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, et al: In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009, 27:5944–5951.
- Palermo, C., and Joyce, J.A. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* 2008 29, 22–28.
- Paradis V, Lagha NB, Zeimoura L, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 2000;436:351.
- Park H, Byun D, Kim TS, Kim YI, Kang JS, Hahm ES, et al. Enhanced IL-18 expression in common skin tumors. *Immunol Lett* 2001;79:215–9.
- Park S, Cheon S, Cho D. The dual effects of interleukin-18 in tumor progression. *Cell Mol Immunol* 2007;4:329–35.
- Parker, AS; Cheville JC, Lohse CM et al. Loss of expression of von Hippel Lindau tumor suppressor protein associated with improved survival in patients with early stage clear cell renal cell carcinoma. *Urology* 2005; 665: 1090-1095.
- Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, de la Taille A, Tostain J, Artibani W, Abbou CC, Lobel B, Guille F, Chopin DK, Mulders PF, Wood CG, Swanson DA, Figlin RA, Belldegrun AS, Patuck AJ. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinomas: a multicenter experience. *J Clin Oncol* 2005;23: 2763-2771.
- Pérez B, Benitez R, Fernández MA, Oliva MR, Soto JL, Serrano S, López Nevot MA, Garrido F. A new beta 2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens.* 1999: 53:569-72.
- Perona, R.. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin. Transl. Oncol.* 2006 8, 77 82.
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22:929–79.
- Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularization and nonlymphoid mesenchymal cell proliferation by macrophage cell lines. *J Leukoc Biol* 1985; 37:279–88.
- polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. *Clin Cancer Res* 2005;11:3647.
- Pupa, S. M., Tagliabue, E., Menard, S. & Anichini, A. HER-2: a biomarker at the crossroads of breast cancer immunotherapy and molecular medicine. *J. Cell. Physiol.* 2005 205, 10–18.
- Qian, B.Z., and Pollard, J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010 141, 39–51.
- Qian, B.Z., and Pollard, J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010 141, 39–51.
- Ramnath N, Tan D, Li Q, Hylander BL, Bogner P, Ryes L, et al. Is downregulation of MHC class I antigen expression in human non-small cell lung cancer associated with prolonged survival? *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:891–9.

- Roberts, S.J., Ng, B.Y., Filler, R.B., Lewis, J., Glusac, E.J., Hayday, A.C., Tigelaar, R.E., and Girardi, M. Characterizing tumor-promoting T cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007 104, 6770–6775.
- Rodríguez T, Méndez R, Del Campo A, Aptsiauri N, Martín J, Orozco G, Pawelec G, Schadendorf D, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Patterns of constitutive and IFN-gamma inducible expression of HLA class II molecules in human melanoma cell lines. *Immunogenetics*. 2007 Feb;59(2):123-33.
- 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.
- Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F, Cozar JM, Canton J, Cabrera T, Tallada M, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Analysis of the expression of HLA class I, proinflammatory cytokines and chemokines in primary tumors from patients with localized and metastatic renal cell carcinoma. *Tissue Antigens* 2006: 68:303-10.
- Romero JM, Sáenz-López P, Cózar JM, Carretero R, Canton J, Vazquez F, et al. A polymorphism in the interleukin-10 promoter affects the course of disease in patients with clear-cell renal carcinoma. *Hum Immunol* 2009;70:60–4.
- Rueda B, Roibas B, Martín J, Gonzalez-Gay MA. Influence of interleukin 10 promoter polymorphisms in susceptibility to giant cell arteritis in Northwestern Spain. *J Rheumatol* 2007;34:1535–9.
- S. Mestiri, N. Bouaouina, S.B. Ahmed, A. Khedhaier, B.B. Jrad, S. Remadi et al. Genetic variation in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma *Cancer*, 91 (4) 2001, pp. 672–678
- Sáenz López P, Vázquez Alonso F, Romero JM, Carretero R, Tallada Buñuel M, Ruiz Cabello F, Cózar Olmo JM. [Polymorphisms in inflammatory response genes in metastatic renal cancer]. *Actas Urol Esp*. 2009 May;33(5):474-81.
- Saenz-Lopez P, Carretero R, Cozar JM, Romero JM, Canton J, Vilchez JR, et al. Polymorphisms of RANTES, IL1-A, MCP-1 and TNF-A genes in patients with prostate cancer. *BMC Cancer* 2008;8:382.
- Sanders ME, Mick R, Tomaszewski JE, Barr FG.: Unique patterns of allelic imbalance distinguish type 1 from type 2 sporadic papillary renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 161:997-1005.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's role in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565-70.
- Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:3932–6.
- Shouli 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.
- Seifart C, Plagens A, Dempfle A, Clostermann U, Vogelmeier C, von Wichert P, et al. TNF-alpha, TNF-beta, IL-6, and IL-10 polymorphisms in patients with lung cancer. *Dis Markers* 2005;21:157–65.
- Seliger B. Different regulation of MHC class I antigen processing components in human tumors. *J Immunotoxicol*. 2008 Oct;5(4):361-7.
- Sengupta S, Lohse CM, Leibovich BC, et al. Histologic coagulative necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer* 2005; 104:511–20.
- Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer*. 2001 Oct 15;94(2):243-51.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001 410, 1107–1111.
- Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjatic S, Bajorin DF, Reuter VE, Herr H, Old LJ, Sato E. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:3967–72.
- Shay, J.W., and Wright, W.E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 72–76.
- Sherr, C.J., and McCormick, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002 2, 103–112.

- Sica, A., Allavena, P., and Mantovani, A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett.* 2008 267, 204–215.
- Singer DS, Maguire JE Regulation of the expression of class I MHC genes. *Crit Rev Immunol* 1990; 10: 235- 57.
- Smaldone MC, Maranchie JK. Clinical implications of hypoxia inducible factor in renal cell carcinoma. *Urol Oncol.* 2009 May-Jun;27(3):238-45.
- Smalley KSM, Brafford PA, Herlyn M. Selective evolutionary pressure from the tissue microenvironment drives tumor progression. *Seminars in Cancer Biology* 15 (2005) 451–459
- Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* 2006 90, 1–50.
- Snipes, L., Leach, M.W., and Rennick, D. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4 (+) TH1-like responses. *J. Clin. Invest.* 1996 98, 1010–1020.
- Sobin L, Wittekind C: TNM classification of malignant tumors. New York: Wiley-Liss; 2002.
- Sombroek, C. C. et al. Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J. Immunol* 2002; 168:4333–43.
- Stadler WM, Huo D, George C, Yang X, Ryan CW, Karrison T, Zimmerman TM, Vogelzang NJ. Prognostic factors for survival with gemcitabine plus 5-fluorouracil based regimens for metastatic renal cancer. *J Urol.* 2003 Oct;170(4 Pt 1):1141-5.
- Stassi G, Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, Di Liberto D, Patti M, Florena A, Di Gaudio F, Di Gesù G, De Maria R. Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10. *Cancer Res.* 2003 63, 6784–6790.
- Stephen B. Edge, David R. Byrd, Carolyn C. Compton, April G. Fritz, Frederick L. Greene, Andy Trotti, III, *AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition* 2010. Springer.
- Stewart TJ, Greenelch KM, Lutsiak ME & Abrams SI. Immunological responses can have both pro- and antitumour effects: implications for immunotherapy. *Exp Rev Mol Med.* 2007; 9: 1-20.
- Swann, J.B., and Smyth, M.J. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* 2007 117, 1137–1146.
- Szlosarek, P. W. & Balkwill, F. R. Tumour necrosis factor α : a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol.* 4, 565–573 (2003)
- Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 2010 70, 5649–5669.
- Tartour E, Latour S, Mathiot C, Thiounn N, Mosseri V, Joyeux I, et al. Variable expression of CD3-zeta chain in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) derived from renal-cell carcinoma: relationship with TIL phenotype and function. *Int J Cancer* 1995;63(2):205–12.
- Teng, M.W.L., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol.* 2008 84, 988–993.
- Toh B, Wang X, Keeble J, Sim WJ, Khoo K, Wong WC, Kato M, Prevost-Blondel A, Thiery JP, Abastado JP. Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol.* 2011 Sep;9(9):e1001162
- Troost E, Hold GL, Smith MG, 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.
- Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1–8.
- UTR polymorphism reduces BRCA1-associated breast cancer risk in Polish women. *Cancer Lett* 2008;262:71.
- Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefolglou Z, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, et al. The interleukin-10 (-1082A/G) polymorphism is strongly associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2008;28: 309–14.
- van Bezooijen RL, Goey H, Stoter G, Hermans J, Fleuren GJ. Prognostic markers for survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43(5):293–8.

- van der Poel HG. Molecular markers in the diagnosis of prostate cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2007;61:104–139.
- Vidal-Vanaclocha F, Mendoza L, Telleria N, Salado C, Valcárcel M, Gallot N, et al. Clinical and experimental approaches to the pathophysiology of interleukin-18 in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:417–34.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013 Mar 29;339(6127):1546–58.
- Waldner, M.J., and Neurath, M.F. Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin. Immunopathol*. 2009 31, 249–256.
- Wang K, Liu L, Zhu ZM, et al. Five polymorphisms of vascular endothelial growth factor (VEGF) and risk of breast cancer: a meta-analysis involving 16,703 individuals. *Cytokine* 2011;56:167.
- Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nature Med*. 2004 10, 48–54.
- 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.
- Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D.M., Zeng, D., and Yu, H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J. Exp. Med*. 2009 206, 1457–1464.
- Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J et al. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood* 1998; 91: 3574–81.
- Webster WS, Lohse CM, Thompson RH, Dong H, Frigola X, Dicks DL, Sengupta S, Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW: Colorectal cancer. *Lancet* 2005, 365:153–165.
- White, E., Karp, C., Strohecker, A.M., Guo, Y., and Mathew, R. Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2010 22, 212–217.
- Whiteside TL. Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol Immunother* 2004;53(10):865–78.
- Whiteside TL. *Tumor Infiltrating Lymphocytes in Human Malignancies*. Medical Intelligence Unit 1993, R.G. Landes Co.: Austin, TX.
- Witsch, E., Sela, M., and Yarden, Y.. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* 2010 25, 85–101.
- Y. Ho, Y.J. Wang, H.L. Chen, C.H. Chen, C.J. Chang, P.J. Wang et al. Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the –308 tumor necrosis factor-alpha promoter gene *Cancer Causes Control*, 2004.15 (7) , pp. 657–663
- Yagoda A, Abi-rached B, Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983–1993. *Semin Oncol* 1995: 22:42– 60.
- Yang JC, Hughes M, Kammula U, et al. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother* 2007;30:825–30.
- Ye ZB, Ma T, Li H, Jin XL, Xu HM. Expression and significance of intratumoral interleukin-12 and interleukin-18 in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007;13:1747–51.
- Yuan J, Liu S, Yu Q, Lin Y, Bi Y, Wang Y, An R. Down-regulation of human leukocyte antigen class I (HLA-I) is associated with poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Acta Histochem*. 2012 Dec 12.
- Yuan, T.L., and Cantley, L.C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008 27, 5497–5510.
- Zeff RA, Freitag A, Grin CM, Grant-Kels JM. The immune response in halo nevi. *J Am Acad Dermatol*. 1997; 37:620–624.
- Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, Wu C, Li SP, Zheng L. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2009;50:980–9.
- Zhang L, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348:203–213.

- 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. 102
- Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F, Roth C, Maxwell E, Li Z, et al. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *J Exp Med* 1996;184:579–84.
- Zhou Y, Li N, Zhuang W, Wu X. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms and gastric cancer risk in a Chinese Han population. *Mol Carcinog* 2011;50:184.
- 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.
- Zimmer M, Doucette D, Siddiqui N et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL-/- tumor. *Mol Cancer Res* 2004; 2:89-95.
- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006 Oct;6(10):715-27.
- Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:263-74.
- Zumsteg, A., and Christofori, G. Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis. *Curr. Opin. Oncol.* 2009 21, 60–70.