

TESIS DOCTORAL

Departamento de Biología Celular e Histología
Facultad de Medicina y Enfermería

Zelulen Biologia eta Histologia Saila
Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea

La Heterogeneidad Intratumoral en el Carcinoma Renal de Células Claras

LAURA ZALDUMBIDE DUEÑAS



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea
The University of the Basque Country

Defensa de Tesis Doctoral realizada en el Salón de Grados de la Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Campus de Bizkaia, Leioa.

Abstract

Laura Zaldumbide Dueñas

INTRATUMOUR HETEROGENEITY IN CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA

Intratumor heterogeneity is an inherent event to tumor development that may be responsible of the unpredictable aggressive clinical behavior that some clear cell renal cell carcinomas display. This clinical uncertainty may be caused by insufficient sampling, leaving out of histological analysis tumor areas with aggressive signatures. Histological and immunohistochemical intratumor heterogeneities has been studied in two different series of clear cell renal cell carcinomas. Histological evaluation included the classical parameters (size, grade, cell type, staging...). Immunohistochemical analysis was performed for BAP1, carbonic anhydrase IX, COX2, Ki67, Snail, ZEB1, Twist, Vimentin, E-cadherin, β -catenin, PTEN, p-Akt, p110 α , and SETD2 antibodies. Results were analyzed using a classification and regression tree algorithm. Tumor size was a significantly discriminative factor to predict heterogeneity, with a cut-off of 3.8 cm ($p < 0.001$). Cell type, Fuhrman's grade and Ki67 and COX2 expression were also related with intratumor heterogeneity. On the other hand, Snail immunostaining and intratumor heterogeneity were correlated (if Snail was heterogeneous the tumor was histologically heterogeneous in 75% of the cases and if Snail was homogeneous the tumor was homogeneous in 100% of the cases). Combined ZEB1 and Twist negativities were associated in 100% of the cases to low grade tumors. Tumors larger than 3.7 cm were heterogeneous for vimentin immunostaining in 72.5% of the cases. These works conclude that intratumor heterogeneity is a common event in clear cell renal cell carcinoma that may be overlooked in cases insufficiently sampled. The suitability of current protocols for sampling in renal tumors is discussed.

A mi familia. Lo sois todo.

“Somos como enanos a los hombros de gigantes.

Podemos ver más, y más lejos que ellos, no por alguna distinción física nuestra, sino porque somos levantados por su gran altura.”

Bernardo de Chartres

Contribuciones científicas

Este trabajo de Tesis Doctoral pertenece a la línea principal de investigación en Patología Urológica y Cáncer Renal de mi Director, el Dr. José Ignacio López, Profesor Titular de Anatomía Patológica del Departamento de Especialidades Médico-Quirúrgicas, docente del Máster Universitario en Investigación Biomédica de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), y está basada en las siguientes contribuciones científicas como primera autora,

L Zaldumbide, A Erramuzpe, R Guarch, JM Cortés, JI López.

Large (>3.8 cm) clear cell renal cell carcinomas are morphologically and immunohistochemically heterogeneous

Virchow's Archives 466: 61-66, 2015.

Q2 (23/76, Pathology)

Factor de Impacto (2014): 2,651

L Zaldumbide, A Erramuzpe, R Guarch, R Pulido, JM Cortés, JI López.

Snail heterogeneity in clear cell renal cell carcinoma

BMC Cancer 16: 194, 2016

Q2 (81/211, Oncology)

Factor de Impacto (2014): 3,362

Agradecimientos

A José Ignacio López, patólogo y jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Cruces, por el constante estímulo y apoyo, su guía y colaboración han sido fundamentales.

A Rosa Guarch, patóloga del Complejo Hospitalario B de Navarra, en Pamplona, por su participación en el proyecto aportando muestras y conocimiento anatomopatológico.

A Jesús Cortés, Profesor Ikerbasque y a Asier Erramuzpe, de la Unidad de Biomedicina Cuantitativa del Instituto de Investigación BioCruces, en Barakaldo, por la excelente explotación de los datos.

A mis colegas patólogos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Cruces.

A Mar González, Alicia Esteve, Aida Larrañaga y Maria Cruz Andreu, técnicos del laboratorio del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Cruces, por su excelente trabajo con las técnicas de inmunohistoquímica.

A mi familia, por su dedicación y amor incondicionales. Sin ellos, nada es posible.

Índice

	Pag.
Abreviaturas.....	13
Resumen.....	15
Introducción.....	17
Objetivos.....	25
Hipótesis.....	27
Metodología	
Primera contribución.....	29
Segunda contribución.....	30
Resultados	
Primera contribución.....	33
Segunda contribución.....	35
Discusión	
Primera contribución.....	37
Segunda contribución.....	39
Conclusiones.....	47
Bibliografía.....	49
Tablas.....	57
Figuras.....	63
Datos biográficos.....	77
Contribuciones científicas.....	79

Abreviaturas

CCRCC.....	Carcinoma de células claras
HIT.....	Heterogeneidad intratumoral
TEM.....	Transición epitelio-mesénquima
TME.....	Transición mesénquima-epitelio
VEGF.....	Factor de crecimiento del endotelio vascular
TKI.....	Inhibidores de la tirosin-kinasa
AJCC.....	American Joint Committee of Cancer
CAIX.....	Anhidrasa carbónica 9
BAP1.....	Proteína del gen <i>BRCA1</i>
COX2.....	Ciclo-oxigenasa-2
WEKA.....	Waikato environment for knowledge analysis
CART.....	Algoritmo de clasificación-regresión
TMA.....	Microarray de tejido

Resumen

La heterogeneidad intratumoral es un evento inherente al desarrollo neoplásico y puede ser responsable del impredecible comportamiento clínico agresivo que presentan algunos carcinomas renales de células claras. Esta inseguridad clínica puede estar provocada por un muestreo insuficiente del tumor, dejando fuera de análisis áreas con características agresivas. Se han estudiado en dos series de carcinomas renales de células claras diferentes la heterogeneidad intratumoral desde el punto de vista histológico e inmunohistoquímico. La evaluación histológica incluye los clásicos parámetros anatomopatológicos (tamaño del tumor, grado histológico, tipo celular, estadificación...). El análisis inmunohistoquímico se realiza con anticuerpos frente a BAP1, carbonic anhydrase IX, COX2, Ki67, Snail, ZEB1, Twist, Vimentin, E-cadherin, β -catenin, PTEN, p-Akt, p110 α , and SETD2. Los resultados obtenidos se analizan utilizando algoritmos de clasificación y regresión. El tamaño del tumor es un parámetro significativo a la hora de predecir heterogeneidad, con un cut-off de 3,8 cm ($p < 0.001$). El tipo celular, el grado de Fuhrman, y la expresión de Ki67 y COX2 también se relacionan con heterogeneidad intratumoral. Por otra parte, la inmunotinción con Snail y la heterogeneidad intratumoral están claramente relacionadas (si Snail es heterogéneo el tumor es histológicamente heterogéneo en el 75% de los casos, y si Snail es homogéneo el tumor es homogéneo en el 100% de los casos). La negatividad combinada en la inmunotinción con ZEB1 y Twist se asocia en el 100% de los casos con carcinomas de células claras de bajo grado. Los tumores de más de 3,7 cm presentan inmunotinción heterogénea con Vimentina en el 72,5% de los casos. Estos trabajos concluyen que la heterogeneidad intratumoral es un evento frecuente en el carcinoma renal de células claras que puede ser pasado por alto en los casos muestreados de manera insuficiente. Se discute la validez de los protocolos de muestreo actualmente vigentes.

Introducción

El cáncer renal es un tumor frecuente en nuestro país y en nuestro entorno geográfico. Su incidencia global está aumentando en los últimos años, tanto en los Estados Unidos de Norteamérica como en Europa (*Siegel et al., 2015; Ferlay et al., 2010*). Por lo que respecta a España, su frecuencia también va hacia arriba, esperándose una tasa de 15,7/100.000 habitantes en 2022 (*Souza et al., 2012*). El carcinoma de células claras (CCRCC) es, con mucho, el tumor renal más frecuente, y también el más agresivo. Aproximadamente un 80% de los tumores renales son CCRCC (*Delahunt et al., 2007*). Tradicionalmente resistente a la quimioterapia y a la radioterapia, solo el diagnóstico precoz y la cirugía han demostrado ser tratamientos eficaces con impacto significativo en la supervivencia (*Kim et al., 2004*).

Las modernas terapias dirigidas tienen un valor hasta ahora limitado en el CCRCC, puesto que chocan contra la gran heterogeneidad intratumoral (HIT) que le caracteriza. A pesar de los esfuerzos y del dinero invertido para mejorar el pronóstico de la enfermedad, aproximadamente el 20% de los casos recurrirá tras la cirugía y el 30% presentarán metástasis a distancia (*Kim et al., 2004*). Series largas de autopsia muestran que los carcinomas en general tienden a presentar patrones cuasi específicos de diseminación metastásica, que se siguen manteniendo a pesar de la mejora significativa obtenida en las terapias (*Budczies et al., 2015*). Así, el CCRCC desarrolla un cierto patrón metastatizante de preferencia, siendo el pulmón un sitio frecuente y el hígado, por el contrario, infrecuente.

El desarrollo del cáncer es un proceso altamente complejo derivado de múltiples cambios genéticos y epigenéticos acumulados a lo largo del tiempo (*Arai et al., 2010; de la Fuente, 2014, de la Fuente, 2015*) los cuales, entre otras cosas, favorecen la HIT. En el trabajo de rutina, los patólogos están acostumbrados a la diversidad tumoral a nivel macroscópico y microscópico y, en base a esta diversidad, reconocen e identifican tipos diferentes de tumores, y grados distintos, lo cual determina el diagnóstico anatomopatológico.

Los patólogos reconocen la heterogeneidad intertumoral, es decir, el hecho de que tumores del mismo tipo tengan algunas características diferentes unos de otros. Esta variabilidad morfológica es más evidente en unos tipos de tumor que en otros. Por ejemplo, se reconocen muchos tipos de neoplasia renal en la clasificación de la OMS vigentes desde 2004 (*Lopez-Beltrán et al., 2006*). Esta clasificación, que tiene la fortaleza de aunar datos morfológicos y moleculares, se actualiza periódicamente debido al reconocimiento de nuevas entidades o subtipos de cáncer renal (*Srigley et al., 2013*). El cáncer renal compuesto por células claras es un ejemplo extremo de esta variabilidad (*López, 2013*), ya que no todos los carcinomas compuestos por células claras son CCRCC.

Por otra parte, la HIT, esto es, el hecho de que un tumor concreto tenga áreas de histología diferente también es reconocido por los patólogos (Figura 1). Por ejemplo, la transformación sarcomatoide de alto grado puede ser reconocida en muchas ocasiones en el estudio macroscópico por la presencia de áreas blanquecinas de consistencia aumentada dentro de un carcinoma renal de tonos amarillentos y consistencia blanda, incluso friable (Figuras 2 y 3). Este dato se menciona en todos los textos clásicos de Anatomía Patológica. Sin embargo, diversos estudios recientes demuestran que la HIT es un proceso mucho más complejo de lo que pensaban los patólogos clásicos.

Los patólogos juegan un papel crucial en la identificación y cuantificación de la HIT, ya que son los especialistas que manipulan las piezas quirúrgicas y deciden qué áreas de un tumor deben ser estudiadas y qué áreas no. Un estudio macroscópico incompleto puede llevar a una pérdida irreversible de información vital para el paciente. Resulta paradójico que en un mundo crecientemente dominado por la tecnología sea aún tan importante algo tan simple como un estudio macroscópico detallado y un muestreo apropiado del tumor.

Debe mencionarse que un análisis macroscópico correctamente realizado siguiendo normas internacionales (*Higgins et al., 2009; Algaba et al., 2012; Trpkov et al., 2013*) debe seleccionar para el estudio histológico, inmunohistoquímico y molecular una porción comparativamente muy pequeña del tumor en su conjunto. El material restante, es decir, la inmensa mayoría, se almacena en los archivos de los Servicios de Anatomía Patológica hasta que se desechan definitivamente entre 12 y 16 semanas tras la emisión del informe del patólogo. Aunque los criterios para el correcto muestreo de las piezas

de nefrectomía por cáncer renal se definieron hace relativamente poco tiempo, ése era un tiempo en el que la HIT se limitaba a la identificación, a simple vista, de múltiples nódulos tumorales, y áreas con diferente textura o color, con necrosis macroscópica y/o hemorragias evidentes durante el examen de la pieza en el Laboratorio (Figura 4).

Sin embargo, la evidencia científica reciente demuestra que una parte substancial de la HIT que determina el pronóstico del paciente se esconde debajo de áreas tumorales que, aparentemente a simple vista, parecen idénticas, o casi idénticas, sin que sea posible por este medio distinguir los tumores heterogéneos (Figura 5) de los homogéneos (Figura 6). Por esta razón, resulta cuestionable el mantenimiento de protocolos de muestreo que aconsejen incluir un bloque de tejido por cada centímetro de tumor y, adicionalmente, de cualquier área que macroscópicamente parezca diferente. La triste paradoja es que los patólogos pueden estar perdiendo información relevante siguiendo al pie de la letra las guías internacionalmente aceptadas.

En un intento de cuantificar la cantidad de información que se podría estar perdiendo se ha diseñado recientemente un estudio en paralelo sobre 47 CCRCC (*López et al., 2012*). Los autores de este estudio muestrearon totalmente los 47 carcinomas y los resultados obtenidos los compararon con los del muestreo convencional previo en los mismos casos.

El hallazgo más preocupante fue que mientras el muestreo convencional detectó 7 carcinomas de alto grado (grados 3 y 4 de Fuhrman), el análisis total de las piezas quirúrgicas encontró 17, siendo esta diferencia significativa desde el punto de vista estadístico. No existen en la literatura analizada muchos estudios de este tipo, lo cual justifica la validez de esta tesis. Solo dos trabajos previos tocan este tema de manera tangencial. Por un lado, Serrano y cols. en 2008 (*Serrano et al., 2008*) resaltan la importancia de la cantidad de tumor de alto grado como factor pronóstico en el carcinoma renal. En segundo lugar, Golshayan y cols. en 2009 (*Golshayan et al., 2009*) demuestran que más del 20% de componente sarcomatoide en un carcinoma renal influye negativamente en el pronóstico.

Siguiendo el mismo procedimiento, los autores del estudio mencionado anteriormente analizaron la variabilidad celular, su frecuencia y significado, en una serie de 51 CCRCC, y demostraron que la presencia de células rabdoideas y de células sincitiales se asocia

estadísticamente a grados de Fuhrman y a estadios (pT) altos (*Lopez et al., 2013*). La presencia de células sincitiales en el CCRCC también ha sido asociado a mal pronóstico en otro trabajo posterior (*Williamson et al., 2014*) mientras que, con anterioridad, el fenotipo rabdoide se comparó en términos pronósticos con la transformación sarcomatoide (*Chapman-Fredriks et al., 2011*). Estudios muy recientes confirman el efecto adverso de la diferenciación rabdoide en el pronóstico de este tumor (*Prybycin et al., 2014; Yang et al., 2015; Perrino et al., 2015; Zhang et al., 2015*).

El CCRCC es un excelente ejemplo de neoplasia intrínsecamente heterogénea. El análisis en profundidad de la HIT solo ha sido posible en los últimos años gracias al desarrollo tecnológico y a la universalización de sofisticadas máquinas de secuenciación masiva (*Gerlinger et al., 2012; Gerlinger et al., 2014*). Herramientas como la secuenciación de próxima generación han permitido la detección de mucha más variabilidad intratumoral de la imaginada en todo tipo de tumores, hasta el punto de que hay muy pocas mutaciones que estén presentes en más del 10% de cualquier tumor (*Vogelstein et al., 2013*). Parece que la inestabilidad genómica es la responsable de gran parte de la heterogeneidad intratumoral (*Burrell et al., 2013*).

La HIT puede seguir dos patrones de desarrollo diferentes: lineal (linear) o ramificado (branched) (*Hiley et al., 2014*). El patrón lineal implica que la producción de un determinado clon celular no comienza hasta que el proceso inmediatamente anterior haya finalizado. En el patrón ramificado, sin embargo, varios subclones celulares coexisten y evolucionan de manera autónoma. Lo interesante del patrón ramificado, según Hiley y cols (*Hiley et al., 2014*), es que dos tumores diferentes puedan ser idénticos en un momento concreto de su evolución y sin embargo ser totalmente diferentes con anterioridad y posterioridad a ese momento concreto.

De forma específica, el CCRCC es un ejemplo paradigmático de neoplasia con patrón de evolución ramificado, coexistiendo distintas mutaciones en distintas áreas del tumor. Esto, una vez más, pone de manifiesto el déficit de información que podemos estar obteniendo con un muestreo insuficiente y coloca a los patólogos en una posición difícil frente al urólogo y al oncólogo. Con objeto de minimizar riesgos asociados a este problema, se han diseñado varias estrategias para el muestreo múltiple de este tumor que puedan definir lo más fiablemente posible la extensión de la HIT a nivel genómico,

así como detectar eventuales mutaciones clínicamente relevantes que puedan predecir la posible resistencia del tumor a determinados tratamientos (*Gerlinger et al., 2012; Gerlinger et al., 2014, Renovanz et al., 2014*).

Aunque las herramientas de secuenciación masiva son esenciales para el reconocimiento y comprensión de la HIT, los biólogos y otros expertos en el área de la genómica siempre volverán a plantearse la vieja pregunta al afrontar el análisis de las muestras suministradas por el patólogo: ¿será esta muestra representativa del tumor?, ¿habrá el patólogo muestreado suficientemente el tumor?, ¿lo habrá hecho de manera topográficamente fiable? A pesar de que los patólogos estudian minuciosamente las piezas quirúrgicas en la sala de macros, no toda heterogeneidad es visible a simple vista, por lo que hoy en día no existe una respuesta inequívoca a estas preguntas.

Un reflejo de todo esto aparece en la práctica clínica diaria con relativa frecuencia -el caso de un paciente diagnosticado de un CCRCC de bajo grado que desarrolla una inesperada resistencia al tratamiento correcto y que evoluciona mal puede estar debido, entre múltiples razones, a la información defectuosa proporcionada por un muestreo insuficiente-. Sin embargo, existen también otras razones más científicas, y no meramente procedimentales, que pueden justificar estas sorpresas clínicas. Todo lo esbozado anteriormente complica sobremanera el contexto en el que médicos y científicos se mueven y dificulta el avance.

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso fisiológico por el cual las células epiteliales se transforman en mesenquimales en determinadas condiciones (*Kalluri et al., 2009*). Este proceso se desarrolla en tres contextos totalmente diferentes: el desarrollo embrionario, la reparación de tejidos, y las neoplasias (*Kalluri et al., 2009; Thiery et al., 2009*). El cambio sarcomatoide, hecho bien conocido por los patólogos en el cáncer renal que se produce hasta en un 10% de los casos (*Boström et al., 2012*), es un ejemplo claro de TEM. Una parte sustancial de la agresividad biológica y de la capacidad metastatizante de los carcinomas se puede explicar por la TEM y por su mecanismo inverso, la transición mesénquima-epitelio (TME). Aunque la TEM es necesaria para la invasión y diseminación neoplásica (Figura 7), la TME es crucial para el éxito de la colonización y asentamiento de las metástasis (*Christiansen et al., 2006; Lee et al., 2006; Iwatsuki et al., 2010; Jolly et al., 2015*). Ambos procesos son reversibles y pueden desarrollarse

de manera completa o parcial (*Christiansen et al., 2006*). La TEM parcial da lugar a una célula híbrida epitelial/mesenquimal que mantiene propiedades epiteliales (adhesión) y mesenquimales (migración) (*Christiansen et al., 2006; Jolly et al., 2015*). Estas células híbridas circulantes resultantes de una transición parcial mantienen la capacidad de adhesión para formar acúmulos que están mejor preparados para sobrevivir en el torrente sanguíneo que las células aisladas mesenquimales resultantes de una transición completa (*Jolly et al., 2015*). Son varios los estudios que han atribuido a la TME, un papel clave en el mantenimiento de las metástasis en varios tipos de neoplasias (*Hugo et al., 2007; Ocaña et al., 2012; Brabletz et al., 2012*). Este proceso implica la rediferenciación de las células que previamente se habían desdiferenciado y la adquisición, consecuentemente, de un fenotipo epitelial nuevamente reconocible al microscopio (*Lee et al., 2006; Brabletz et al., 2012*).

Desde la perspectiva del patólogo, el resultado práctico de este fenómeno es la identificación al microscopio de células metastásicas inesperadamente bien diferenciadas incluso en casos de tumores primarios de alto grado y pobremente diferenciados.

El impacto clínico de la HIT en el CCRCC es de gran importancia, ya que ésta está detrás de la inmensa mayoría de los fracasos terapéuticos obtenidos hasta ahora con las llamadas terapias dirigidas o personalizadas. Son tres los puntos de ataque desarrollados en la actualidad en este tumor: el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), la vía de mTOR, y los inhibidores de las tirosin-kinasas (TKI).

Varios agentes anti-VEGF han demostrado eficacia en el CCRCC metastásico a través de la destrucción masiva de la neovascularización tumoral, lo cual lleva aparejado la necrosis del tumor metastásico. Sin embargo, el CCRCC sobrevive al citado tratamiento debido a que las dosis farmacológicas convencionales de anti-VEGF no destruyen directamente las células neoplásicas, y éstas salen adelante en torno a vasos sanguíneos preexistentes, que tampoco son atacados por el fármaco (*Audenet et al., 2011*).

Los fármacos anti-mTOR, que se usan como agentes inmunosupresores en el trasplante de órganos, también tienen actividad antineoplásica, aunque los resultados con estas drogas son discutibles. La vasculopatía inducida por los inhibidores de la tirosin-

kinasa se ha empezado a utilizar como antineoplásico y desarrolla necrosis tumoral y hialinización (*Tsuzuki et al., 2014*).

Por lo tanto, la HIT genética y epigenética es un hecho consustancial al CCRCC (*Gerlinger et al., 2015*) (Figura 8) y es hoy en día el principal obstáculo para el avance en el tratamiento de estos pacientes. Una aproximación prometedora se dio en 2010 por Brannon y cols (*Brannon et al., 2010*). Estos autores identificaron dos grupos de pacientes con firma molecular y supervivencia diferentes, y los definieron como ccA y ccB (*Brannon et al., 2010*). Sin embargo, trabajos posteriores en CCRCC demostraron muy pronto que se podían detectar áreas con ambas firmas moleculares si el muestreo del tumor era exhaustivo (*Gulati et al., 2014*).

Objetivos

1. Definir y cuantificar la heterogeneidad intratumoral en el carcinoma renal de células claras utilizando métodos rutinarios histológicos e inmunohistoquímicos
2. Evaluar el impacto clínico de la heterogeneidad intratumoral en el carcinoma de células claras

Hipótesis

El carcinoma renal de células claras es una neoplasia intrínsecamente heterogénea y esta cualidad, que puede ser muy evidente o permanecer oculta a los ojos del patólogo, pone en entredicho la metodología de muestreo internacionalmente consensuada. El patólogo práctico tiene a mano herramientas rutinarias para analizar esta característica y para aportar más información crítica que redunde en beneficio para los pacientes, todo ello sin necesidad de recurrir a sofisticados estudios que están aún en el terreno de la validación experimental y que, a día de hoy, no pueden ser implementados en la práctica clínica de nuestros hospitales.

Metodología

Primera contribución

Virchow's Archiv 466: 61-66, 2015.

Se obtuvieron de manera retrospectiva muestras representativas de 48 CCRCC procedentes del Hospital Universitario Cruces, en Barakaldo, Bizkaia, y del Complejo Hospitalario B de Navarra, en Pamplona, Navarra. Las muestras estaban previamente fijadas en formol tamponado e incluidas en parafina. Se seleccionaron específicamente casos confinados al riñón (pT1/2) para evaluar la HIT en las fases tempranas del desarrollo tumoral. En cada caso, se registraron los siguientes parámetros clínicos e histológicos: Edad, sexo, diámetro tumoral, estadio AJCC 2010 (*Edge, 2010*), y grado de Fuhrman (*Fuhrman et al., 1982*).

El estudio histológico se realizó sobre cortes de 4 micras de grosor teñidos con hematoxilina-eosina. El estudio inmunohistoquímico se realizó en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Cruces siguiendo la metodología rutinaria utilizando los siguientes anticuerpos (Tabla 1): Anhidrasa carbónica IX (CAIX, NCL-L-CAIX, dilución 1:100, Novocastra), proteína 1 asociada a BRCA-1 (BAP1, sc-28383, dilución 1:30, Santa Cruz), Ki67 (MIB1, ready-to-use, Dako) y ciclo-oxigenasa-2 (COX2, CX-294, dilución 1:100, Dako). Las inmunotinciones se realizaron en teñidores automatizados (EnVision Flex, Dako Autostainer Plus, Dako). Para la recuperación antigénica se utilizó tris-EDTA. Como controles negativos se utilizaron cortes histológicos no expuestos previamente al anticuerpo primario, incubándose en PBS y procesándose con posterioridad siguiendo las mismas condiciones que los cortes histológicos sometidos a estudio. El estudio histológico e inmunohistoquímico, así como las fotografías microscópicas, se realizaron en un microscopio Nikon Eclipse 80i (Tokyo, Japan).

La evaluación de la HIT se realizó considerando 7 parámetros: diámetro tumoral, tipo celular (claras/eosinófilas), grado de Fuhrman, así como el patrón de inmunotinción con los cuatro anticuerpos

anteriormente mencionados (CAIX, BAP-1, Ki67 y COX2). El estudio inmunohistoquímico se realizó en tres áreas diferentes del tumor, alejadas unas de otras, seleccionadas al azar y aparentemente similares, durante el estudio macroscópico de la pieza quirúrgica en el laboratorio de origen. Las áreas con hemorragia y/o necrosis fueron descartadas para este estudio. Los resultados inmunohistoquímicos fueron evaluados de manera ciega e independiente y, posteriormente, fueron correlacionados con la edad y el sexo de los pacientes, y con el diámetro tumoral. Cada caso fue considerado homogéneo cuando todas las muestras pertenecientes al mismo mostraron el mismo resultado, bien fuera positivo o negativo, y heterogéneo cuando se detectaron diferencias en la inmunotinción entre las distintas zonas del cada tumor.

Se realizó un análisis estadístico preliminar mediante un test t de 2 grupos independientes para valorar si la edad, el sexo, y el tamaño tumoral eran diferentes en las 2 condiciones, heterogéneo versus homogéneo (test t en R, r.project.org). Posteriormente, se realizó un análisis de minería de datos utilizando el Waikato Environment for Knowledge Analysis (WEKA) (*Hall et al., 2009*). Se seleccionaron múltiples parámetros para obtener las reglas de clasificación para la respuesta *heterogeneidad*. Tras ello, se realizó un algoritmo de clasificación y regresión (CART) (*Breiman et al., 1984*) utilizando el 66% de los datos para calibración y el 44% para el test.

El uso de WEKA permitió asimismo la selección de atributos, en relación a los parámetros relevantes e irrelevantes. Para ello se usaron diferentes métodos de búsqueda tales como los algoritmos best-first, Rank-search y random-search (*Breiman et al., 1984*).

Segunda contribución
BMC Cancer 16: 194, 2016

Se obtuvieron de manera prospectiva desde septiembre de 2011 a junio de 2012 procedentes del Hospital Universitario Cruces, en Barakaldo, Bizkaia, y del Complejo Hospitalario B de Navarra, en Pamplona, Navarra muestras correspondientes a 40 CCRCC confinados al riñón (pT1/2). Todos los casos fueron diagnosticados y clasificados por el mismo patólogo en cada hospital siguiendo criterios similares. Los datos clínicos se recuperaron de las historias

médicas. En cada caso, se recogieron 4 áreas del tumor distantes entre sí, y aparentemente similares en el estudio macroscópico, y se procesaron de manera rutinaria fijándose en formol tamponado e incluyéndose en parafina. Cuando fue posible, se obtuvieron las muestras en puntos cardinales de la loncha de mayor tamaño. Se descartaron para el estudio todas las áreas con hemorragia y/o necrosis macroscópica, y todas aquellas otras de coloración blanquecina y consistencia aumentada sugestivas de transformación sarcomatoide. De cada uno de los bloques de parafina obtenidos, se seleccionó un área de 2,5 mm y con el conjunto se construyeron 8 microarrays de tejido (TMA) (4 áreas de cada uno de los 40 tumores, en total 160 muestras), y en ellos se realizaron tinciones para análisis histológico e inmunohistoquímico. Cada una de las muestras seleccionadas de cada tumor se colocó de manera aleatoria en los TMAs para asegurar una evaluación ciega. En cada TMA se introdujo una muestra de ganglio linfático que actuó como control interno.

El estudio histológico se realizó sobre cortes de 4 micras de grosor teñidos con hematoxilina-eosina. Los datos histopatológicos evaluados incluyeron el tipo celular (claro vs. granular), el grado de Fuhrman [clásico (G1, G2, G3 y G4) y agrupado en bajo (G1/2) y alto (G3/G4) grado], diámetro tumoral y estadio pT de la UICC (pT1a, pT1b y pT2). Los tumores fueron considerados histológicamente heterogéneos cuando al menos una de las cuatro muestras de cada tumor en el TMA tenía diferente tipo celular y/o grado.

El estudio inmunohistoquímico se realizó en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Cruces siguiendo la metodología rutinaria utilizando un panel de anticuerpos contra marcadores de TEM, vía PTEN y SETD2 (Tabla 1): Snail (ab180714, policlonal, dilución 1:75, Abcam), Twist (sc15393, policlonal, dilución 1:250, Santa Cruz), ZEB1 (sc25388, policlonal, dilución 1:100, Santa Cruz), β -catenina (760-4242, monoclonal, prediluido, Cell Marque), E-cadherina (790-4497, monoclonal, prediluido, Roche Ventana), vimentina (790-2917, monoclonal, prediluido, Roche Ventana), PTEN (6H2, M3627, monoclonal, dilución 1:50, Dako), p110 α (PA5-27192, policlonal, dilución 1:500, Pierce), Akt (700392, monoclonal, dilución 1:500, Life Technologies), y SETD2 (PA5-34934, policlonal, dilución 1:500, Pierce). Las inmunotinciones se realizaron en teñidores automatizados (EnVision Flex, Dako Autostainer Plus, Dako, y BenchMark Ultra, Ventana Medical Systems). Para la recuperación antigénica se utilizó tris-EDTA. Como controles negativos se utilizaron cortes histológicos no expuestos

previamente al anticuerpo primario, incubándose en PBS y procesándose con posterioridad siguiendo las mismas condiciones que los cortes histológicos sometidos a estudio. El estudio histológico e inmunohistoquímico, así como las fotografías microscópicas, se realizaron en un microscopio Nikon Eclipse 80i (Tokyo, Japan).

Cada caso fue considerado homogéneo cuando todas las muestras pertenecientes al mismo mostraron el mismo resultado, bien fuera positivo o negativo, y heterogéneo cuando se detectaron áreas positivas y negativas en alguna de las muestras de cada tumor.

Se realizó un análisis estadístico preliminar mediante un test t de 2 grupos independientes para valorar si la edad, el sexo, y el tamaño tumoral eran diferentes en las 2 condiciones, heterogéneo versus homogéneo (test t en R, r.project.org). Tras ello, se realizó la clasificación y selección de atributos para heterogeneidad. Primero, se eligió *heterogeneidad* como la variable de respuesta para la clasificación, codificándola de forma binaria con dos posibles valores, ser heterogénea o no serlo. Tras ello, se realizó un algoritmo CART (*Breiman et al., 1984*) utilizando una valoración cruzada x10 para el testeo. Para el algoritmo CART se usó WEKA (*Hall et al., 2009*).

Se seleccionaron los descriptores clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos para obtener las reglas de clasificación para la respuesta *heterogeneidad*; en particular se usaron edad, sexo, grado simple de Fuhrman (grados 1 a 4), grado agrupado de Fuhrman [bajo grado (G1/2) y alto grado (G3/4)], diámetro tumoral, estadio (pT) tipo celular (clara/eosinófila) y los resultados de todos los anticuerpos testados.

El uso de WEKA permitió discriminar entre descriptores relevantes (aquellos que realmente afectaban a la clasificación) y no relevantes (aquellos que no afectaban a la clasificación). Para ello se usaron diferentes métodos de búsqueda tales como los algoritmos best-first, rank-search y random-search (*Breiman et al., 1984*), no encontrándose diferencias significativas entre los tres métodos.

Resultados

Primera contribución (48 casos) Virchow's Archiv 466: 61-66, 2015.

Un total de 26 tumores (54%) fueron heterogéneos en al menos uno de los siete parámetros analizados (Tabla 2), y la mayor parte de ellos, 22 de 26 (85%), fueron heterogéneos en más de un parámetro. Por el contrario, 22 tumores (46%) fueron homogéneos, tanto desde el punto de vista histológico como inmunohistoquímico. El tipo celular, el grado y el índice Ki67 fueron los parámetros más frecuentemente heterogéneos, con porcentajes de 44, 42 y 36% de los casos respectivamente.

La heterogeneidad en el tipo celular incluyó 2 tipos principales, células claras convencionales y células eosinófilas/granulares (Figura 9a), y se detectó en 21 casos (44%). Se detectó transformación sarcomatoide focal en 1 caso. No se identificaron células rabdoideas ni sincitiales.

Se detectó heterogeneidad en el grado de Fuhrman en 20 casos (42%) y en ellos siempre estuvieron representados los grados altos (G3/4) (Figura 9b). La variabilidad en esos casos fue alta, y 5 tumores (25%) presentaron todo el espectro de grados, desde G1 hasta G4, en algún área de las tres que se seleccionaron aleatoriamente en cada tumor. El grado resultó homogéneo en 28 CCRCCs (58%), todos los cuales correspondieron a grados bajos (G1/2).

La mayor parte de los CCRCCs estudiados en esta serie fueron homogéneamente positivos para CAIX (36 casos, 75%). Un solo caso fue homogéneamente negativo (2%). Se detectó heterogeneidad con CAIX en 11 casos (Figura 10a).

BAP-1 fue consistentemente positivo en 40 casos (83%) y uniformemente negativo en 3 (6%). Cinco casos (10%) mostraron inmunotinción heterogénea con este anticuerpo (Figura 10b).

La mayor parte de los casos fueron uniformemente negativos con para COX2 (41 casos, 85%), y solo en 7 casos (15%) se observó inmunotinción focalmente positiva (Figura 10c).

El índice de Ki67 varió entre <5 y el 20% (Figura 10d). Se observó un índice de Ki67 por debajo del 5% de manera homogénea en 31 casos (65%). Solo 2 casos (4%) presentaron un índice por encima del 10% en todas las áreas analizadas. Finalmente, se detectaron variaciones entre <5% y el 15% según las áreas en 14 casos (29%).

El tamaño del tumor fue un parámetro estadísticamente significativo ($p < 0.001$) (Figura 11) cuando se compararon los tumores homogéneos con los heterogéneos, siendo estos últimos, mayores. Sin embargo, el sexo y la edad no fueron significativos.

Cuando se seleccionó la heterogeneidad como respuesta, se hizo una primera clasificación CART para la edad, el sexo, y el tamaño tumoral. Los dos primeros fueron parámetros irrelevantes. Sin embargo, el tamaño del tumor resultó ser un clasificador relevante; en efecto, solo los tumores mayores de 3,8 cm de diámetro fueron heterogéneos, con un 88% de casos correctamente clasificados.

Se realizó una segunda clasificación CART considerando todos los parámetros analizados. El árbol de decisión para el clasificador de *heterogeneidad* fue que si el grado de Fuhrman no era el mismo en las tres áreas seleccionadas para el estudio, entonces el tumor se clasificaba como heterogéneo. Además, si el grado fue el mismo en las tres áreas, entonces la variable determinante resultó ser COX2. Si la variable COX2 no fue igual en las tres áreas, entonces el tumor fue heterogéneo. Si COX2 fue homogéneo en todas, entonces el tumor fue homogéneo. Usando este esquema, el 94% de los casos se clasificaron correctamente.

En lo que respecta a la selección de atributos, el método demostró que los parámetros más relevantes para la variable *heterogeneidad* fueron el tamaño del tumor (cut-off, 3,8 cm), el tipo celular (claras/eosinófilas), el grado de Fuhrman, y el patrón de expresión de Ki67 y COX2. Sorprendentemente, ni CAIX ni BAP-1 fueron parámetros relevantes a la hora de predecir heterogeneidad en esta serie.

Segunda contribución (40 casos)

BMC Cancer 16: 194, 2016.

Había predominancia masculina en la serie (30 M / 10 F) con una edad media de 62,3 años (rango, 33-88). El diámetro tumoral osciló entre 1 y 10 cm (media, 4,3 cm). Siguiendo la metodología antes mencionada, todos los casos estaban confinados al órgano y tenían la siguiente distribución pT: pT1a, 21 casos (52,5%); pT1b, 17 casos (42,5%); pT2, 2 casos (5%). El estudio microscópico convencional (Figura 12) demostró que, con respecto al tipo celular (clara/eosinófila), 35 casos (87,5%) fueron homogéneos en todas las áreas estudiadas, siendo solo 5 (12,5%) heterogéneos. Todos los casos que fueron homogéneos estuvieron compuestos por células claras convencionales. No se identificó ningún caso homogéneo constituido por células eosinófilas. El grado de Fuhrman resultó homogéneo en 16 casos (40%), siendo 11 de ellos G1 y 5 G2, y heterogéneo en 24 casos (60%). Todos los casos homogéneos en grado de la serie fueron grados bajos (G1/2).

El estudio inmunohistoquímico para HIT aparece resumido en la Tabla 3 y en la Figura 13. Snail fue heterogéneo en el 80% de los casos (32/40), Twist en 40% (16/40), ZEB1 en 62,5% (25/40), β -catenina en 37,5% (15/40), E-cadherina en 37,5% (15/40), vimentina en 50% (20/40), PTEN en 35% (14/40), p110 α en 15% (6/40), pAkt en 30% (12/40) y SETD2 en 42,5% (17/40). No hubo diferencia en la inmunotinción en los grados altos (G3/4).

La inmunotinción con Snail mostró una relación directa con el grado de Fuhrman. Así, todos los CCRCC de alto grado (G3/4) (8 casos) mostraron una tinción heterogénea con este anticuerpo y todos los CCRCC homogéneos con Snail (7 casos) fueron tumores de bajo grado (G1/2). Además, ZEB1 y Twist también se relacionaban con el grado de Fuhrman: si ambos ZEB1 y Twist eran negativos de forma combinada, el CCRCC era de bajo grado (G1/2) en el 100% de los casos.

Obtuvimos tres resultados de clasificación diferentes aplicando el algoritmo CART a diferentes variables de respuesta (tabla 4). Aunque en general el resultado de un algoritmo CART podría ser un árbol de decisión con múltiples ramas, para la situación particular de nuestro conjunto de datos, los árboles solo tenían 2 ramas, resultando en una sola variable determinante para las tres situaciones particulares. El árbol de decisión del algoritmo de clasificación CART

considerando todas las variables posibles y heterogeneidad como la respuesta mostró que la única variable determinante fue Snail. Así, si la tinción con este anticuerpo era homogénea, el tumor era homogéneo en todos los casos, mientras que si era heterogénea el tumor era heterogéneo en el 75% de los casos. Usando este esquema, el 80% de los CCRCC se clasificaban correctamente. Es de resaltar que ninguna otra variable, sola o en combinación, resultó relevante para la respuesta heterogeneidad.

Se realizó un segundo análisis CART considerando grado como la variable respuesta. En este caso, la variable del tipo celular (clara/eosinófila) fue la que mejor respuesta ofreció. Cuando el tipo celular era “claro” (grupo 1 en la Tabla 4), entonces el grado era clasificado como G1-G2 con un 88.57% de clasificaciones correctas. Si el tipo celular era una mezcla de “clara y granular” (grupo 2 en la Tabla 4), entonces el grado era G3-G4 con un 80% de precisión. Utilizando este esquema, el 87,5% de los casos se clasificaron correctamente. Cualquier otra variable, sola o en combinación, fue irrelevante para heterogeneidad en la clasificación del grado.

Un tercer análisis CART con diámetro tumoral, grado, grado agrupado y tipo celular, y combinaciones de ambas, mostró que vimentina fue la única variable que clasificaba con más del 66% de certidumbre. El resto de posibilidades ofreció peores resultados. El análisis desveló que aquellos CCRCC de más de 3,7 cm de diámetro mostraron heterogeneidad en la tinción con vimentina con un 72,5% de certidumbre.

Discusión

Primera contribución (48 casos) Virchow's Archiv 466: 61-66, 2015.

La HIT es un proceso inherente al desarrollo de las neoplasias, y es actualmente una materia de debate permanente. Inicialmente, la HIT estaba limitada a la morfología y esta aproximación todavía es usada por los patólogos en todo el mundo en términos de variaciones del patrón de crecimiento, de la morfología celular y del grado histológico. La HIT se ha ligado tradicionalmente a comportamiento clínico agresivo ya que, con pocas excepciones, cuanto más heterogénea en una neoplasia más agresivo es su curso clínico. La probabilidad de encontrar más o menos HIT en un tumor está ligada a la cantidad de tejido que se examine. El tamaño tumoral también es un factor determinante en el desarrollo de HIT en el CCRCC, ya que, como se apunta en esta primera contribución, solo los tumores de más de 3,8 cm son heterogéneos. Este punto de corte entre homogéneo y heterogéneo cuadra bastante bien con la separación entre pT1a y pT1b de la clasificación TNM de la AJCC (*Edge, 2010*), lo cual implicaría que todos CCRCC en estadio pT1a son homogéneos. Este dato es útil en términos de muestreo del tumor, problema aún no bien resuelto, ya que, al menos en teoría, una sola muestra de cualquier tumor por debajo de los 3,8 cm de diámetro sería suficiente en un CCRCC para obtener la información necesaria. Por el contrario, se necesitarían más de un bloque por cada centímetro de tumor en el caso de que el tumor fuese mayor de 3,8 cm.

Nowell propuso en 1976 un equivalente del modelo darwiniano de la selección como responsable de la HIT, el modelo de evolución clonal (*Nowell, 1976*). Más recientemente, algunos autores han demostrado áreas genéticamente heterogéneas en un número significativo de CCRCC (*Gerlinger et al., 2012*). Se han evaluado de forma minuciosa en cáncer las implicaciones terapéuticas de la HIT en términos de mutaciones y amplificaciones génicas en combinación con el microambiente tumoral y su influencia, en carcinomas de mama, glioblastomas, y otras neoplasias (*Crockford et al., 2014*). Sin

embargo, aunque prometedora, la aproximación molecular a este asunto todavía no puede ser trasladada a la clínica práctica ya que los diversos perfiles moleculares deben ser primeramente clarificados y optimizados.

Para los tumores renales, las guías prácticas europeas consideran que una muestra de tejido por cada centímetro de tumor es lo apropiado para estudiar un tumor (*Algaba et al., 2012*), pero este criterio no se aplica de forma generalizada. Estudios recientes, sin embargo, han demostrado que un muestreo ampliado de los CCRCC proporciona datos significativamente diferentes en términos de grado y celularidad neoplásica comparada con el muestreo convencional (*López et al., 2012, López et al., 2013*). La importancia clínica de estos datos histológicos y su variabilidad en función del tipo de muestreo utilizado, indican que los protocolos actuales de muestreo de CCRCC pueden no ser los más adecuados (*López, 2016*).

La inmunohistoquímica puede ayudar a descubrir HIT en CCRCC que se muestran como tumores monótonos e iguales en todas las áreas estudiadas al microscopio, como ya se ha descubierto en el cáncer de mama (*Nassar et al., 2010*). En este trabajo, diseñamos un estudio para mirar más allá de la monotonía histológica seleccionando áreas distantes entre sí para análisis inmunohistoquímico. Para explorar la HIT oculta, elegimos marcadores que habían demostrado previamente relación con agresividad tumoral y no respuesta al tratamiento. En este sentido, la CAIX es uno de los más prometedores (*Tunuguntla et al., 2008*). CAIX está implicada en el cambio metabólico que se asocia a la acidificación del microambiente tumoral, y está regulada por la proteína del gen Von Hippel Lindau (pVHL). Es una proteína que está sobre-expresada en muchos tumores y está implicada en la regulación de la diseminación metastásica de los tumores a través de la activación de los fibroblastos asociados al cáncer en el estroma adyacente (*Fiaschi et al., 2013*). Sin embargo, los resultados obtenidos con esta proteína son controvertidos ya que algunos autores han demostrado que la expresión inmunohistoquímica de CAIX en los CCRCC está relacionada con un pronóstico favorable (*Bui et al., 2003*), mientras que otros no encuentran diferencias estadísticamente significativas en el análisis multivariante (*Zhang et al., 2013*). Además, la expresión de CAIX parece predecir buena respuesta a las terapias sistémicas en el CCRCC metastásico (*Stillebroer et al., 2010*). En nuestro estudio, la expresión inmunohistoquímica de CAIX no predice HIT.

BAP-1 es un gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 3. Su producto es una proteína nuclear desubiquitinizante implicada en la reparación del DNA de doble hélice, en la remodelización cromatínica y en puntos clave del ciclo celular, transcripción y apoptosis (*Murali et al., 2013*). El papel exacto de BAP-1 en la vía del BRCA-1 está todavía en discusión. Algunos autores (*Jensen et al., 1999*), sostienen que BAP-1 liga BRCA-1, rompe la ubiquitina, y potencia los efectos supresores de la proteína BRCA-1. Las mutaciones de *BAP-1* aumentan la susceptibilidad de desarrollar varios tumores como el nevus de Spitz, el melanoma uveal, el mesotelioma y el CCRCC (*Murali et al., 2013*). La proteína BAP-1 está inactivada en aproximadamente el 15% de los CCRCC, y su pérdida en estos tumores parece estar asociada con alto grado y con fenotipo celular rabdoide (*Duns et al., 2012; Pena-Llopis et al., 2012*). En nuestro estudio, la expresión inmunohistoquímica de BAP-1 no predice HIT.

COX2 (ciclooxigenasa-2) es una enzima implicada en la producción de prostaglandinas y ácido araquidónico (*Ghosh et al., 2010*), y juega un papel importante en la inflamación, crecimiento tumoral, capacidad de invasión y metástasis. La expresión de COX2 se ha correlacionado con mal pronóstico en el CCRCC, y su inhibición mediante fármacos antiangiogénicos ha mostrado propiedades antitumorales (*Wang et al., 2013*). En nuestro estudio, la expresión de COX2 está asociada con HIT.

Ki67 es una proteína implicada en la proliferación celular que se usa ampliamente en patología como marcador para determinar la fracción de crecimiento de los tumores. Un índice alto de Ki67 se relaciona con mal pronóstico (*Bui et al., 2004*), y en nuestro estudio con HIT.

Segunda contribución (40 casos)
BMC Cancer 16: 194, 2016.

La HIT es un fenómeno inherente a la carcinogénesis que está siendo intensamente analizado en nuestros días por medio de herramientas de secuenciación masiva en muchas neoplasias, las del riñón incluidas (*Gerlinger et al., 2012; Gerlinger et al., 2014; Kanu et al., 2015; Gerlinger et al., 2015; Audenet et al., 2011; Sankin et al.,*

2014; Gulati et al., 2014). Sin embargo, son muy escasos los estudios sobre HIT enfocados desde la rutina diaria del patólogo. Nassar y cols (Nassar et al., 2010) documentaron HIT en cáncer de mama por métodos inmunohistoquímicos y resaltaron el impacto clínico adverso de potenciales resultados inmunohistoquímicos falsos negativos obtenidos en estudios realizados sobre pequeñas biopsias probablemente no representativas. En el caso del cáncer renal, éste es un gran problema puesto que se trata frecuentemente de grandes masas tumorales y los protocolos internacionalmente aceptados recomiendan muestrear solo un bloque por cada centímetro de diámetro del tumor más una muestra adicional por cada área que aparezca sospechosa a simple vista en el estudio macroscópico (Higgins et al., 2009; Algaba et al., 2012; Trpkov et al 2013). Siguiendo estas recomendaciones, más del 90% del tumor se queda sin analizar en la práctica rutinaria de los laboratorios de Anatomía Patológica, haciendo muy difícil el cuantificar y evaluar realmente la naturaleza y la extensión de la HIT, si es que la hubiera, en la mayor parte de los CCRCC. A pesar de que los patólogos reconocen a simple vista en los CCRCC la transformación sarcomatoide como áreas blanquecinas de mayor consistencia, así como las áreas hemorrágicas y/o necróticas indicativas de posible alto grado, una parte significativa de la HIT se esconde detrás de áreas aparentemente homogéneas con lo que su estudio histopatológico puede no llegar a realizarse (López et al., 2012; López et al., 2013). Más aún, un muestreo incompleto puede justificar un comportamiento inesperadamente agresivo de algunos CCRCC supuestamente de bajo grado (López et al., 2012), en los que, verosíblemente, la parte más agresiva del tumor no se ha muestreado y, por lo tanto, no se ha evaluado, ni sus características se han incluido en el diagnóstico. Este estudio demuestra que existe una relación entre el grado y el tipo células en el CCRCC, ya que la mezcla de células claras y eosinófilas determina un grado alto (G3/4) en el 83% de los casos.

Este trabajo se diseñó para investigar la utilidad de la inmunohistoquímica en la identificación de HIT en CCRCC. El panel de proteínas utilizado se seleccionó tomando en consideración sus papeles potenciales en el desarrollo de la agresividad tumoral, la diversificación, y los procesos metastásicos.

Dos estudios recientes en CCRCC han contribuido en el mayor conocimiento de la HIT desde una perspectiva práctica. El primero intentó identificar cuánta información se pierde en la práctica rutinaria tras el seguimiento de los protocolos de muestreo oficiales. Para este

propósito, se realizó un muestreo tumoral total, estrategia inadecuada en la práctica diaria, en 47 casos prospectivos de CCRCC, y el análisis histológico reveló un número significativamente mayor de tumores de alto grado que con el muestreo convencional (*López et al., 2012*). Estos hallazgos plantean serias dudas sobre la idoneidad de los protocolos de muestreo de CCRCC aceptados actualmente, sugiriendo que en algunos estudios histopatológicos los datos potencialmente cruciales para el paciente podrían ser ignorados. El segundo estudio usaba herramientas de minería de datos y mostró que solo los tumores CCRCC con menos de 3,8 cm de diámetro eran siempre histológicamente homogéneos (*Zaldumbide et al., 2015*). Además, el presente trabajo muestra que los tumores CCRCC con más de 3.7 cm muestran HIT para la inmunotinción de Vimentina. Curiosamente, estas cifras de tamaño están muy cerca de la frontera de estadificación patológica entre el pT1a y el pT1b, sugiriendo que 4 cm de diámetro es el tamaño en el que aparece visible la HIT tanto a nivel histológico como inmunohistoquímico. Este hallazgo, sin embargo, no infiere que la HIT a nivel de estatus mutacional genético sigue la misma tendencia.

El presente trabajo fue diseñado para investigar la utilidad de la inmunohistoquímica en la identificación de la HIT en el CCRCC. El panel de marcadores proteicos usado fue seleccionado considerando sus roles potenciales en el desarrollo de la agresividad tumoral, diversidad tumoral y procesos metastásicos.

La TEM es un mecanismo biológico extensamente revisado en la literatura (*Kalluri et al., 2009; Thiery et al., 2009; Gerlinger et al., 2102; Sankin et al., 2014*). El proceso explica cómo, bajo determinadas condiciones, las células epiteliales se transforman en células mesenquimales. El proceso implica primero la pérdida de la polaridad ápico-basal y las uniones laterales célula a célula. En ese momento, la célula adquiere una forma fusiforme y propiedades migratorias. Este cambio ocurre en tres situaciones diferentes: desarrollo embrionario, reparación de tejidos, y neoplasia. El concepto de TEM es indispensable para entender las capacidades invasoras y metastatizantes de los carcinomas (*Cristiansen et al., 2006; Hugo et al., 2007; De Wever et al., 2008; Klymkowsky et al., 2009; Iwatsuki et al., 2010; He et al., 2014*). TEM puede ser un proceso reversible, en cuyo caso se denomina TME, lo cual explica parcialmente por qué los carcinomas de alto grado pueden aparecer con metástasis a distancia de bajo grado (*Cristiansen et al., 2006; Hugo et al., 2007; Zeisberg et al., 2009; Lopez et al., 2016*).

Se han publicado varios trabajos en relación a la expresión inmunohistoquímica de diversos marcadores de MET en el carcinoma renal. Por ejemplo, se ha encontrado relación entre la expresión de Clusterina y Twist y la agresividad tumoral (*Ohba et al., 2104*), la recurrencia (*Harada et al., 2012*), y el mal pronóstico (*Fang et al., 2013; Ohba et al., 2014*) del carcinoma de células renales.

En esta segunda contribución se han analizado siete marcadores de TEM, entre los que se encuentran proteínas de superficie celular (E-cadherina), proteínas de citoesqueleto o asociadas a citoesqueleto (Vimentina, β -catenina), factores de transcripción (Snail, ZEB1, Twist, β -catenina) en el contexto de HIT en el CCRCC. Se trata de un enfoque novedoso, ya que no existen en la literatura precedentes que conecten estos marcadores con la HIT.

Snail es un anticuerpo testado en este estudio que reconoce tanto Snail1 como Snail2. Snail es un factor de transcripción directamente implicado en la represión de la transcripción de la E-cadherina, hecho que promueve la adquisición de un fenotipo mesenquimal (*Zeisberg et al., 2009; Kaufhold et al., 2014*). Snail1 parece estar activado por la Grelina, una molécula reguladora del apetito que promueve la liberación de hormona del crecimiento (*Lin et al., 2015*). La expresión inmunohistoquímica de Snail1 en los CCRCC ha sido asociada a estadios avanzados, grados altos, invasión local y metástasis (*Mikami et al., 2011*). Un estudio reciente ha confirmado que la expresión inmunohistoquímica de Snail1 predice la recurrencia temprana y la supervivencia corta en pacientes afectados de CCRCC (*Liu et al., 2015*). En nuestra serie, todos los CCRCC de alto grado analizados fueron positivos con Snail. Por el contrario, los CCRCC negativos con Snail fueron todos ellos de bajo grado. Además, Snail determina HIT, según se ha demostrado en el análisis estadístico. El efecto de Snail1 como promotor de TEM puede ser suprimido por Klotho, como ha mostrado Zhu y cols. (*Zhu et al., 2013*) en un estudio reciente. Klotho, una proteína supresora tumoral y anti-envejecimiento, inhibe la vía de señalización PI3K/Akt/GSK3 β /Snail suprimiendo la TEM, y por tanto, la invasión tumoral y la migración. De qué manera el perfil transcripcional asociado a Snail1 puede estar relacionado con HIT en el CCRCC es algo que debe ser investigado aún.

Twist es un factor de transcripción implicado clásicamente en el desarrollo embrionario (*Thisse et al., 1987*). Además, juega un papel

importante en el crecimiento, invasión y metástasis tumorales regulando la neoangiogénesis y la degradación de la matriz extracelular (*Ohba et al., 2014*). La expresión de Twist se ha asociado a mal pronóstico en el CCRCC (*Harada et al., 2012; Ohba et al., 2014*). En nuestra serie se encontró tinción inmunohistoquímica heterogénea en 16 CCRCC (40%) y homogénea en 1 caso, aunque la tinción con Twist fue irrelevante para clasificar HIT y grado.

ZEB1 y ZEB2 son factores de transcripción de crucial importancia para la activación de la TEM (*Thiery et al., 2009*). El gen *ZEB1* parece estar regulado al alza en los tumores renales primarios comparándolos con sus propias metástasis, sugiriendo la existencia del proceso inverso, o TME, en las células de la siembra metastásica (*Chen et al., 2014*). La familia miRNA-200 está directamente implicada en los procesos de TEM y TME actuando sobre los represores de E-caderina ZEB1 y ZEB2 (*Zeisberg et al., 2009; Bullock et al., 2012*). El CCRCC presenta regulación a la baja de todos los miembros de esta familia de miRNAs (*Duns et al., 2013*), un dato que puede ser muy útil en el diagnóstico diferencial de los carcinomas renales que presentan células claras (*Lopez, 2013; Lawrie et al., 2014*). En nuestra serie, la tinción con ZEB1 fue heterogénea en 25 casos (62,5%) y homogénea positiva en 1 caso. Sin embargo, los métodos de selección de atributos mostraron que ZEB1 fue una variable irrelevante para la respuesta HIT así como para la clasificación del grado de Fuhrman. Sin embargo, la combinación de resultados inmunohistoquímicos negativos con ZEB1 y Twist se asoció en el 100% de los casos a CCRCC de bajo grado. Este resultado combinado de ambos anticuerpos puede ser útil para establecer el pronóstico en los CCRCC.

La β -catenina es una proteína citoplasmática que liga las Caderinas al citoesqueleto. Además, sirve como activador co-transcripcional en el núcleo (*Bienz, 2005*). Esta proteína se expresa en las células inmersas en la TEM, especialmente en aquellas localizadas en el frente de invasión según se ha publicado en el adenocarcinoma colo-rectal (*Brabletz et al., 1998*). La disregulación de β -catenina en el CCRCC se ha asociado a un curso clínico agresivo y a supervivencias más cortas (*Krabbe et al., 2014*). En nuestra serie se detectó expresión heterogénea de β -catenina en 15 CCRCC, aunque esta cifra no tuvo ninguna significación en los algoritmos CART. Por otra parte, se detectó positividad homogénea difusa con β -catenina, con tinción nuclear y de membrana citoplasmática, en 22 casos, y negatividad total en 3 casos.

La E-caderina se expresa en la superficie de las células epiteliales en condiciones normales y disminuye abundantemente durante los procesos de TEM, en los que se intercambia con N-caderina, la cual aumenta tanto como la E-caderina disminuye (*Lee et al., 2006*). La tinción con E-caderina se perdió totalmente en el 60% de los CCRCC de nuestra serie. Por el contrario, se mantuvo de forma focal o difusa en 15 y 1 caso, respectivamente. Siguiendo los métodos de selección de atributos, la inmunotinción E-caderina no fue una variable relevante para HIT.

La Vimentina es un filamento intermedio que ha sido implicado en todos los escenarios posibles de TEM (desarrollo embrionario, reparación, cáncer en progresión) (*Zeisberg et al., 2009*). Niveles bajos de mRNA de Vimentina han sido relacionados con un mejor comportamiento clínico en el CCRCC en un estudio reciente (*Chen et al., 2014*). Desde un punto de vista práctico, la Vimentina se co-expresa con las queratinas y con el CD10 en el CCRCC, ayudando en el diagnóstico diferencial rutinario de los tumores renales (*Truong et al., 2011*). La tinción con Vimentina fue heterogénea en la mitad de los casos de esta serie, siendo homogéneamente positiva en 18 casos y negativa en 2. A pesar de que la experiencia práctica de los patólogos revela que la inmunotinción con Vimentina es parcheada en ocasiones en los CCRCC, no existen trabajos previos que hayan dado una explicación a esta peculiar distribución de este anticuerpo. El algoritmo de clasificación revela una relación entre un diámetro tumoral mayor de 3,7 cm y heterogeneidad en la tinción para Vimentina.

p110 α , PTEN y p-Akt son componentes básicos en la vía de señalización que lleva a la activación de mTOR. Su análisis se incluyó en el estudio de la HIT en esta serie teniendo en cuenta su importancia en el perfil molecular del CCRCC y en su utilidad creciente como marcadores pronósticos y como dianas terapéuticas (*Sourbier et al., 2006; Mersenburger et al., 2008; Porta et al., 2009; Darwish et al., 2013*).

p110 α es una importante subunidad catalítica de la enzima PI3K que muestra propiedades pro-oncogénicas en virtud de la generación de fosfoinosítide PIP3, el cual favorece la fosforilación y activación del Akt efector kinasa. La fosfo-Akt (p-Akt) ejerce funciones pro-oncogénicas fosforilando múltiples sustratos protéicos, siendo un importante activador de mTOR. Este efecto es contrarrestado por la

acción de la PTEN PIP3 fosfatasa (*Carnero et al., 2008; Yuan et al., 2008, Pulido, 2015*). La mayor parte de las muestras analizadas en nuestro estudio mostraron positividad inmunohistoquímica para p110 α y negatividad para PTEN, en concordancia con sus respectivas funciones oncogénicas y supresoras tumorales, respectivamente, en el cáncer renal (*Shin Lee et al., 2003*). Sin embargo, no se encontró correlación entre la expresión inmunohistoquímica de PTEN y p-Akt, como medida de activación de esta última, en la mayor parte de los tumores, sugiriendo la existencia en el CCRCC de mecanismos de fosforilación y activación de Akt independientes de PTEN, cuya existencia, por otra parte, ya ha sido mencionada por otros autores (*He et al., 2007*). La mayoría (33/40) presentaron positividad homogénea para p110 α , mientras que la mayoría de las muestras fueron homogéneamente negativos para PTEN (26/40) y para p-Akt (28/40). El algoritmo de clasificación utilizado señaló que todos ellos fueron irrelevantes para determinar heterogeneidad en la serie analizada.

El gen *SETD2* codifica la principal metiltransferasa responsable de la trimetilación de la histona-3 en la lisina-36 y está localizado en el cromosoma 3. La pérdida de heterocigosidad en este gen parece ser un evento temprano en el desarrollo del CCRCC (*Gerlinger et al., 2014*). A pesar de que este gen está mutado en el 4 a 8% de los CCRCC (*Gerlinger et al., 2012*), no existen hoy en día evidencias de que ello tenga traducción en la clínica (*Gossage et al., 2014*). Estudios muy recientes han demostrado que la pérdida de función de *SETD2* contribuye a la HIT actuando en las ramas troncales iniciales del árbol filogenético tumoral llevando a la reparación disfuncional del DNA y promoviendo la diversificación subclonal (*Kanu et al., 2015*). En la serie estudiada se detectó inmunoeexpresión heterogénea de la proteína *SETD2* en casi la mitad de los casos (42,5%), aunque este anticuerpo fue una variable irrelevante para clasificar HIT y grado de Fuhrman.

Conclusiones

1. El tamaño tumoral, el tipo celular, el grado de Fuhrman y la tinción inmunohistoquímica para Ki67 y COX-2 parecen ser parámetros relevantes asociados a la HIT.
2. Los CCRCC de menos de 3,8 cm de diámetro son invariablemente homogéneos, dato que podría tenerse en cuenta a la hora de decidir cómo ha de muestrearse el CCRCC.
3. El estudio histológico convencional e inmunohistoquímico puede demostrar la HIT en el CCRCC, evento común incluso en los tumores confinados al órgano. La inmunotinción para Snail parece ser un marcador importante con este fin.
4. La elevada incidencia de HIT recomienda un muestreo amplio de las piezas quirúrgicas para garantizar que no se pierden datos cruciales para el paciente.

Bibliografía

(por orden alfabético)

- Algaba F, Delahunt B, Berney DM et al. Handling and reporting of nephrectomy specimens for adult renal tumours: a survey by the European Network of Uro-pathology. *J Clin Pathol* 2012; 65: 106-113.
- Arai E, Kanai Y. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 4: 58-73.
- Audenet F, Yates DR, Cancel-Tassin G, Cussenot O, Rouprêt M. Genetic pathways involved in carcinogenesis of clear cell renal cell carcinoma: genomics towards personalized medicine. *BJU Int* 2011; 109: 1864-1870.
- Bienz M. β -Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signaling. *Curr Biol* 2005; 15: R64-R67
- Boström AK, Möller C, Nilsson E, Elfving P, Axelson H, Johansson ME. Sarcomatoid conversion of clear cell renal cell carcinoma in relation to epithelial-to-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 2012; 43: 708-719.
- Brabletz T. EMT and MET in metastasis: Where are the cancer stem cells? *Cancer Cell* 2012; 22: 699-701.
- Brabletz T, Jung A, Hermann K, Günther K, Hohenberger W, Kirchner T. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract* 1998; 194: 701-4.
- Brannon AR, Reddy A, Seiler M et al. Molecular stratification of clear cell renal cell carcinoma by consensus clustering reveals distinct subtypes and survival patterns. *Genes Cancer* 2010; 1: 152-163.
- Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. Classification and regression trees. Chapman and Hall/CRC, 1984.
- Budczies J, von Winterfeld M, Klauschen F, et al. The landscape of metastatic progression patterns across major human cancers. *Oncotarget* 2014; 6: 570-583.
- Bui MHT, Seligson D, Han KR, et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal cell clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 802-811.

- Bui MHT, Visapaa H, Seligson D et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *J Urol* 2004; 171: 2461-2466
- Bullock MD, Sayan AE, Packham GK, Mirnezami AH. MicroRNAs: critical regulators of epithelial to mesenchymal (EMT) and mesenchymal to epithelial transition (MET) in cancer progression. *Biol Cell* 2012; 104: 3-12.
- Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013; 501: 338-345.
- Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8: 187-98.
- Chapman-Fredriks JR, Herrera L, Bracho J et al. Adult renal cell carcinoma with rhabdoid morphology represents a neoplastic dedifferentiation analogous to sarcomatoid carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2011; 15: 333-337.
- Chen D, Gassenmaier M, Maruschke M et al. Expression and prognostic significance of a comprehensive epithelia-mesenchymal transition gene set in renal cell carcinoma. *J Urol* 2014; 191: 479-86.
- Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66: 8319-8326.
- Crockford A, Jamal-Hanjani M, Hicks J, Swanton C. Implications of intratumour heterogeneity for treatment stratification. *J Pathol* 2014; 232: 264-273.
- Darwish OM, Kapur P, Youssef RF et al. Cumulative number of altered biomarkers in mammalian target of rapamycin pathway is an independent predictor of outcome in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Urology* 2013; 81: 581-6.
- De la Fuente IM. Metabolic dissipative structures. In: *Systems Biology of Metabolic and Signaling Networks: Energy, Mass and Information Transfer*. Aon MA, Saks V, Schlattner U, eds. Springer Series in Biophysics 16, Springer New York, pp 179-212, 2014.
- De la Fuente IM. Elements of the cellular metabolic structure. *Front Mol Biosci* 2015; 2: 16.
- Delahunt B, Bethwaite PB, Nacey JN. Outcome prediction for renal cell carcinoma: evaluation of prognostic factors for tumours divided according to histological subtype. *Pathology* 2007; 39: 459-465.
- De Wever O, Pauwels P, De Craene B et al. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 481-94.

- Duns G, Hofstra RM, Sietzema JG et al. Targeted exome sequencing in clear cell renal cell carcinoma tumors suggests aberrant chromatin regulation as a crucial step in ccRCC development. *Hum Mutat* 2012; 33: 1059–1062.
- Duns G, van den Berg A, van Dijk MC et al. The entire miR-200 seed family is strongly deregulated in clear cell renal cell cancer compared to the proximal tubular epithelial cells of the kidney. *Genes Chromosomes Cancer* 2013; 52: 165-73.
- Edge SB. *AJCC cancer staging handbook*, 7th edn. 2010, Springer, New York.
- Fang Y, Wei J, Cao J et al. Protein expression of ZEB2 in renal cell carcinoma and its prognostic significance in patient survival. *PLoS ONE* 2013; 8: e62558.
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46: 765–781.
- Fiaschi T, Giannoni E, Taddei ML et al. Carbonic anhydrase IX from cancer-associated fibroblasts drives epithelial-mesenchymal transition in prostate carcinoma cells. *Cell Cycle* 2013; 12: 1791-1801.
- Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 655–663.
- Gerlinger M, Catto JW, Orntoft TF, Real FX, Zwarthoff EC, Swanton C. Intratumour heterogeneity in urologic cancers: From molecular evidence to clinical implications. *Eur Urol* 2015; 67: 729-737.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366: 883-892.
- Gerlinger M, Horswell S, Larkin J et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet* 2014; 46: 225-233.
- Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Rep* 2010; 62: 233-244.
- Golshayan AR, George S, Heng DY et al. Metastatic sarcomatoid renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27: 235-241.
- Gossage L, Murtaza M, Slatter AF et al. Clinical and pathological impact of *VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2*, *KDM6A*, and *JARID1c* in clear cell renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2014; 53: 38-51.

- Gulati S, Martinez P, Joshi T et al. Systematic evaluation of the prognostic impact and intratumour heterogeneity of clear cell renal cell carcinoma biomarkers. *Eur Urol* 2014; 66: 936-948.
- Hall M, Frank E, Holmes G, Pfahringer B, Reutemann P, Witten IH. The WEKA Data Mining Software: An Update. *SIGKDD Explorations* 2009; The WEKA Data Mining Software: An Update; *SIGKDD Explorations*; 2009; 11: 10-18.
- Harada KI, Miyake H, Kusuda Y, Fujisawa M. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers in renal cell carcinoma: impact and prognostic outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. *BJU Int* 2012; 110: E1131-1137.
- He L, Fan C, Gillis A et al. Co-existence of high levels of the PTEN protein with enhanced Akt activation in renal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 1134-42.
- He H, Magi-Galluzzi C. Epithelial-to-mesenchymal transitions in renal neoplasms. *Adv Anat Pathol* 2014; 21: 174-80
- Higgins JP, McKenney JK, Brooks JD, Argani P, Epstein JI. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of renal cell carcinoma: The Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. *Hum Pathol* 2009; 40: 456-463.
- Hiley C, de Bruin EC, McGranahan N, Swanton C. Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine. *Genome Biol* 2014; 15: 453.
- Hugo H, Ackland ML, Blick T, et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 2007; 213: 374-383.
- Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* 2010; 101: 293-299.
- Jensen DE, Rauscher FJ 3rd. BAP1, a candidate tumor suppressor protein that interacts with BRCA1. *Ann NY Acad Sci* 1999; 886: 191-194.
- Jolly MK, Boareto M, Huang B, et al. Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. *Front Oncol* 2015; 5: 155.
- Jung M, Mollenkopf HJ, Grimm C et al. MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 3918-3928.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420-1428.

- Kanu N, Grönross E, Martínez P et al. SETD2 loss-of function promotes renal cancer branched evolution through replication stress and impaired DNA repair. *Oncogene* 2015; 34: 5699-5708.
- Kaufhold S, Bonavida B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *J Exp Clin Cancer Res* 2014; 33: 62.
- Kim HL, Seligson D, Liu X, et al. Using protein expression to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5464-5471.
- Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition. A cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol* 2009; 174: 1588-93.
- Krabbe LM, Westerman ME, Bagrodia A et al. Dysregulation of β -catenin is an independent predictor of oncologic outcomes in patients with clear cell renal cell carcinomas. *J Urol* 2014; 191 1671-7.
- Lawrie CH, Larrea E, Larrinaga G et al. Targeted next generation sequencing and non-coding RNA expression analysis of clear cell papillary renal cell carcinoma suggests distinct pathological mechanisms from other renal tumour types. *J Pathol* 2014; 232: 32-42.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172: 973-981.
- Lin TC, Liu YP, Chan YC et al. Ghrelin promotes renal cell carcinoma metastasis via Snail activation and is associated with poor prognosis. *J Pathol* 2015; 237: 50-61.
- Liu W, Liu Y, Liu H, Zhang W, An H, Xu J. Snail predicts recurrence and survival of patients with localized clear cell renal cell carcinoma after surgical resection. *Urol Oncol* 2015; 33: 69.
- López JI. Renal tumors with clear cells. A review. *Pathol Res Pract* 2013; 209: 137-146.
- López JI. Intratumor heterogeneity in clear cell renal cell carcinoma. An approach for the practicing pathologist. *APMIS* 2016; 124: 153-159.
- López JI, Guarch R, Camarasa N et al. Grade heterogeneity in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int* doi: 10.1002/BJUIw-2012-091-web.
- López JI, Guarch R, Larrinaga G, Corominas-Cishek A, Orozco R. Cell heterogeneity in clear cell renal cell carcinoma. *APMIS* 2013; 121: 1187-1191.
- López JI, Mosteiro L, Guarch R, Larrinaga G, Pulido R, Angulo JC. Low-grade metastases in high-grade clear cell renal cell carcinomas.

- A clinico-pathological study of 4 cases with an insight into the role of mesenchymal-to-epithelial transition process. *Ann Diagn Pathol* 2016; 20: 13-18.
- López-Beltrán A, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur Urol* 2006; 49: 798-805.
 - Mersenburg AS, Hennenlotter J, Kuehs U et al. Activation of PI3K is associated with reduced survival in renal cell carcinoma. *Urol Int* 2008; 80: 372-7.
 - Mikami S, Katsube KI, Oya M et al. Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. *Lab Invest* 2011; 91: 1443-58.
 - Murali R, Wiesner T, Scolyer RA. Tumours associated with BAP1 mutations. *Pathology* 2013; 45: 116-126.
 - Nassar A, Radhakrishnan A, Cabrero IA, Cotsonis GA, Cohen C. Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma. A tissue microarray-based study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010; 18: 433-441.
 - Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.
 - Ocaña OH, Córcoles R, Fabra A, et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell* 2012; 22: 709-724.
 - Ohba K, Miyata Y, Matsuo T et al. High expression of Twist is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 3158-65.
 - Pena-Llopis S, Vega-Rubin-de-Celis S, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2012; 44: 751–759.
 - Perrino CM, Huchtagowder V, Evenson M, Kulkarni S, Humphrey PA. Genetic alterations in renal cell carcinoma with rhabdoid differentiation. *Hum Pathol* 2015; 46: 9-16.
 - Porta C, Figlin RA. Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway and kidney cancer, and the therapeutic potential of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt inhibitors. *J Urol* 2009; 182: 2569-77.
 - Przybycin CG, McKenney JK, Reynolds JP et al. Rhabdoid differentiation is associated with aggressive behavior in renal cell carcinoma. A clinicopathologic analysis of 76 cases with clinical follow-up. *Am J Surg Pathol* 2014; 38: 1260-1265.
 - Pulido R. PTEN: a yin-yang master regulator protein in health and disease. *Methods* 2015; 77-78: 3-10.

- Renovanz M, Kim EL. Intratumoral heterogeneity, its contribution to therapy resistance and methodological caveats to assessment. *Front Oncol* 2014; 4: 142.
- Sankin A, Hakimi AA, Mikkilineni N et al. The impact of genetic heterogeneity on biomarker development in kidney cancer assessed by multiregional sampling. *Cancer Med* 2014; 3: 1485-92.
- Serrano MF, Katz M, Yan, Y, Kibel AS, Humphrey PA. Percentage of high-grade carcinoma as a prognostic indicator in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 2008; 113: 477-483.
- Shin Lee J, Seok Kim H, Bok Kim Y, Cheol Lee M, Soo Park C. Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor behavior and growth. *J Surg Oncol* 2003; 84: 166-72.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 5-29.
- Sourbier C, Lindner V, Lang H et al. The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* 2006; 66: 5130-42.
- Souza DLB, Bernal MM. Incidence, Prevalence and Mortality of Kidney Cancer in Spain: Estimates and Projections for the 1998-2022 Period. *Actas Urol Esp* 2012; 36: 521-526.
- Srigley JR, Delahunt B, Eble JN et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2013; 37: 1469-1489.
- Stillebroer AB, Mulders PFA, Boerman OC, Oyen WJ, Oosterwijk E. Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: Implications for prognosis, diagnosis, and therapy. *Eur Urol* 2010; 58: 75-83.
- Thierry JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890.
- Thisse B, el Messal M, Perrin-Schmitt F. The twist gene: isolation of a *Drosophila* Zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 3439-53.
- Trpkov K, Grignon DJ et al. Handling and staging of renal cell carcinoma: The International Society of Urological Pathology Consensus (ISUP) conference recommendations. *Am J Surg Pathol* 2013; 37: 1505-1517.
- Truong LD, Shen SS. Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 92-109.
- Tsuzuki T, Sassa N, Shimoyama Y et al. Tyrosine kinase inhibitor-induced vasculopathy in clear cell renal cell carcinoma: an unrecognized antitumour mechanism. *Histopathology* 2014; 64: 484-493.

- Tunuguntla HSGR, Jorda M. Diagnostic and prognostic molecular markers in renal cell carcinoma. *J Urol* 2008; 179: 2096-2102.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339: 1546-1558.
- Wang X, Zhang L, O'Neill A et al. Cox-2 inhibition enhances the activity of sunitinib in human renal cell carcinoma xenografts. *Br J Cancer* 2013; 108: 319-326.
- Williamson SR, Kum JB, Goheen MP, Cheng L, Grignon DJ, Idrees MT. Clear cell renal cell carcinoma with a syncytial-type multinucleated giant tumor cell component: implications for differential diagnosis. *Hum Pathol* 2014; 45: 735-744.
- Yang X, Xi C, Jin J et al. Adult renal cell carcinoma with rhabdoid differentiation: incidence and clinicopathologic features in Chinese patients. *Ann Diagn Pathol* 2015; 19: 57-63.
- Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008; 27: 5497-510.
- Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009; 119: 1429-37.
- Zhang BY, Cheville JC, Thompson RH et al. Impact of rhabdoid differentiation on prognosis for patients with grade 4 renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2015; 68: 5-7.
- Zhang BY, Thampson RH, Lohse CM et al. Carbonic anhydrase IX (CAIX) is not an independent predictor of outcome in patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) after long-term follow-up. *BJU Int* 2013; 111: 1046-1053.
- Zhu Y, Xu L, Zang J et al. Klotho suppresses tumor progression via inhibiting PI3K/Akt/GSK3 β /Snail signaling in renal cell carcinoma. *Cancer Sci* 2013; 104: 663-71.

Tablas

Anticuerpo	Fuente/código			Dilución
CAIX	Novocastra, NCL-L-CAIX	monoclonal	↑ pH	1:100
BAP-1	Santa Cruz, sc28383	monoclonal	↑ pH	1:30
Ki67	Dako, MIB-1	monoclonal	↑ pH	prediluido
COX2	Dako, CX-294	monoclonal	↑ pH	1:100
Snail	Abcam, ab180714	policlonal	↑ pH	1:75
Twist	Santa Cruz, sc15393	policlonal	↓ pH	1:250
ZEB1	Santa Cruz, sc25388	policlonal	↑ pH	1:100
β-catenina	Cell Marque, 760-4242	monoclonal	↑ pH	prediluido
E-cadherina	Roche, Ventana, 790-4497	monoclonal	↑ pH	prediluido
Vimentina	Roche, Ventana, 790-2917	monoclonal	↑ pH	prediluido
PTEN (6H2)	Dako, M3627	monoclonal	↑ pH	1:50
p110α	Pierce, PA5-27192	policlonal	↓ pH	1:500
Akt	Life Technologies, 700392	monoclonal	↑ pH	1:500
SETD2	Pierce, PA5-34934	policlonal	↑ pH	1:500

Tabla 1. Listado de Anticuerpos utilizados en ambas contribuciones.

Heterogeneidad	n	%
Tipo celular	21	43,75
Grado	20	41,66
CAIX	11	22,91
BAP-1	5	10,41
COX2	7	14,58
Ki67	18	37,50

Tabla 2. Evaluación de la heterogeneidad en 48 CCRCCs

Acs	Homogéneo		Heterogéneo
	positivo	negativo	
Snail	8	0	32 (80%)
Twist	1	23	16 (40%)
ZEB-1	1	14	25 (62.5%)
β -catenina	22	3	15 (37.5%)
E-cadherina	0	25	15 (37.5%)
Vimentina	18	2	20 (50%)
PTEN (6H2)	0	26	14 (35%)
p110 α	34	0	6 (15%)
Akt	0	28	12 (30%)
SETD2	23	0	17 (42.5%)

Tabla 3. Resumen de los resultados inmunohistoquímicos en 40 casos

Respuesta variable	Variable determinante	Precisión individual 1	Precisión individual 2	Precisión total
Heterogeneidad de grado	Inmunotinción Snail	Snail het->Grado het 75% (24/32)	Snail hom->Grado hom 100% (8/8)	80% (32/40)
Grado	Tipo celular	Cel. clara (homo)->Grado bajo (G1/G2) 88.57% (31/35)	Cel. granular (het)->Grado alto (G3/G4) 80% (4/5)	87.5%
Diámetro	Vimentina	Diam>3.7->Vim het 72.72% (16/22)	Diam<=3.7->Vim hom 72.22% (13/18)	72.5% (29/40)

Tabla 4. Los resultados de la clasificación CART sobre tres variables de respuesta diferentes (primera columna) revelaron tres variables determinantes diferentes (segunda columna). La precisión individual (columnas 3 y 4) muestra la actuación de la clasificación con respecto a cada grupo de variable de respuesta y la precisión total (columna 5) muestra la actuación general de la clasificación aplicada al conjunto de datos.

Figuras

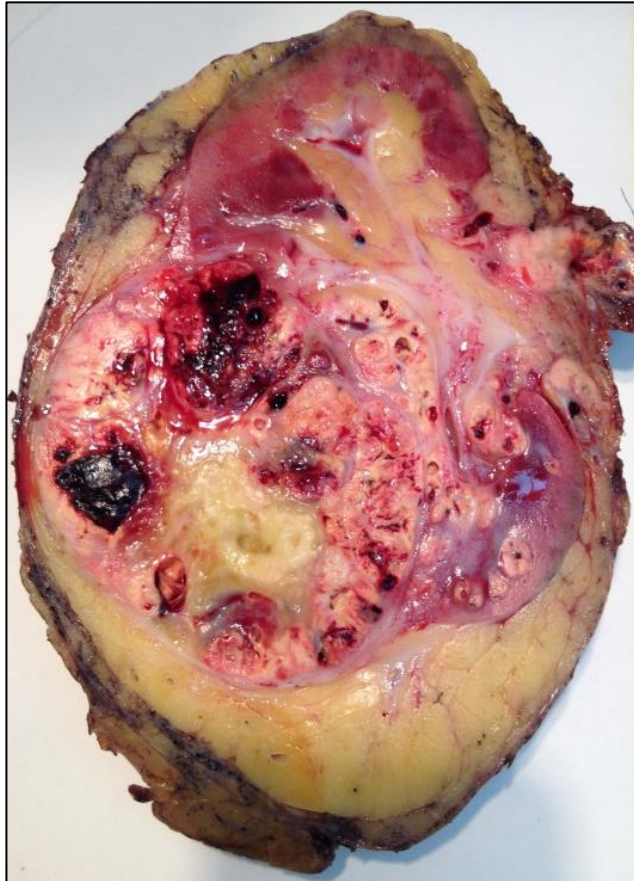


Figura 1. Imagen macroscópica de un carcinoma renal de células claras creciendo en el polo inferior del riñón mostrando áreas necróticas y hemorrágicas

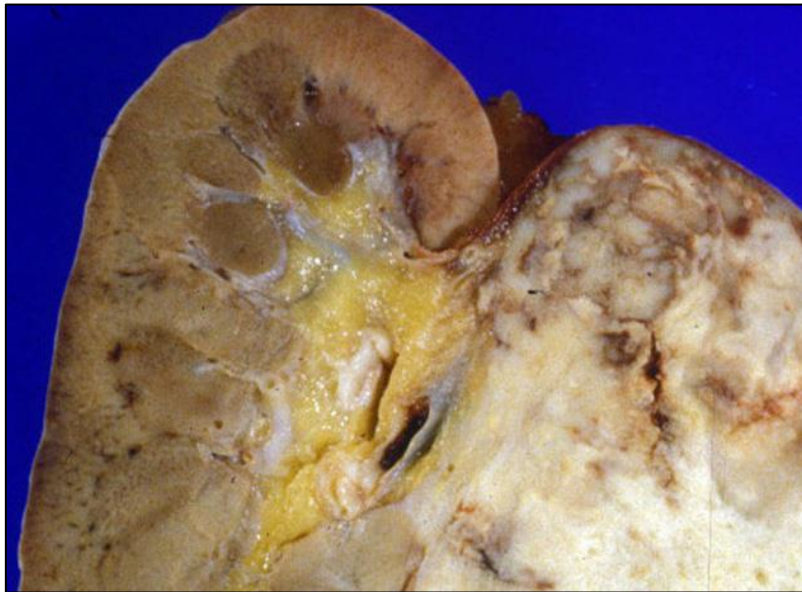


Figura 2. Detalle macroscópico de un carcinoma renal de células claras con áreas blanquecinas indicativas de diferenciación sarcomatoide.

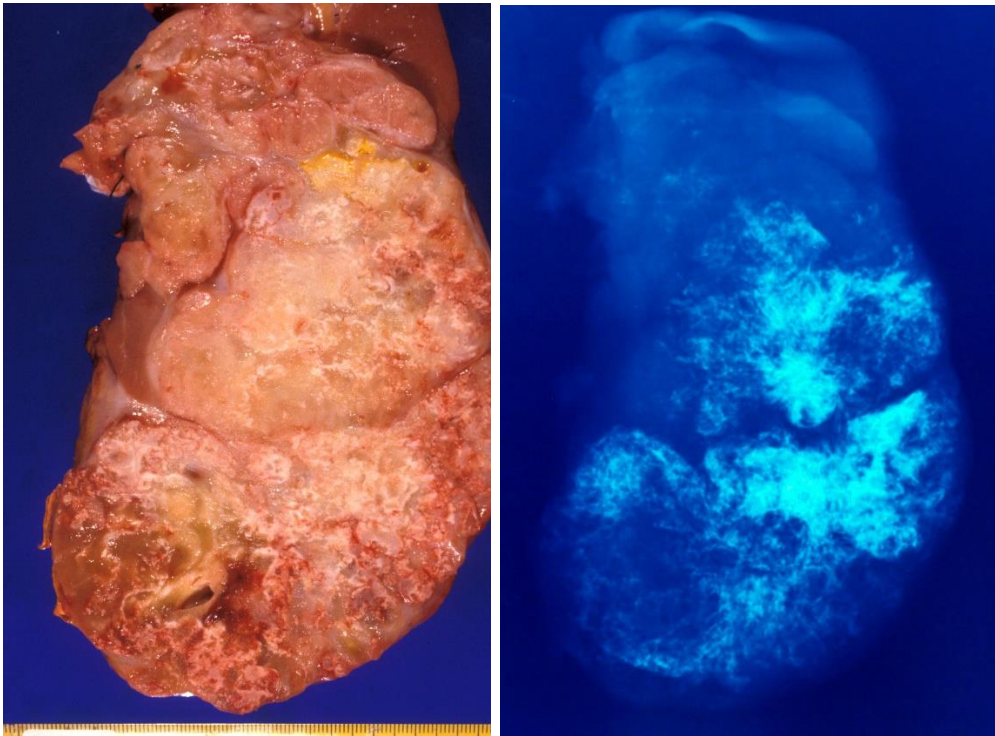


Figura 3. Imágenes macroscópica y radiológica de un carcinoma renal de células claras con extensas áreas sarcomatoides con calcificación secundaria asociada.

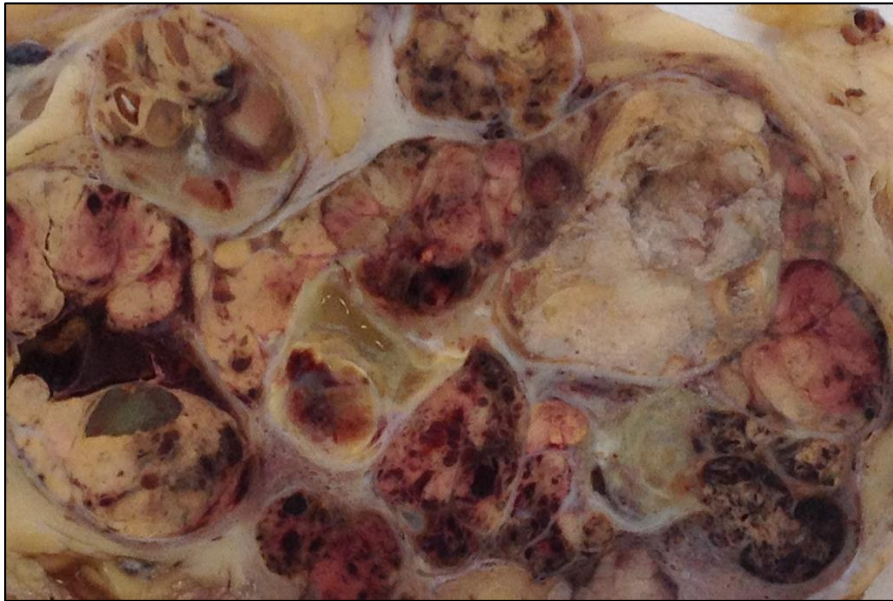


Figura 4. Detalle macroscópico de un carcinoma renal de células claras mostrando múltiples nódulos de aspecto heterogéneo.



Figura 5. Aspecto macroscópicamente homogéneo en un carcinoma renal de células claras con heterogeneidad microscópica e inmunohistoquímica.

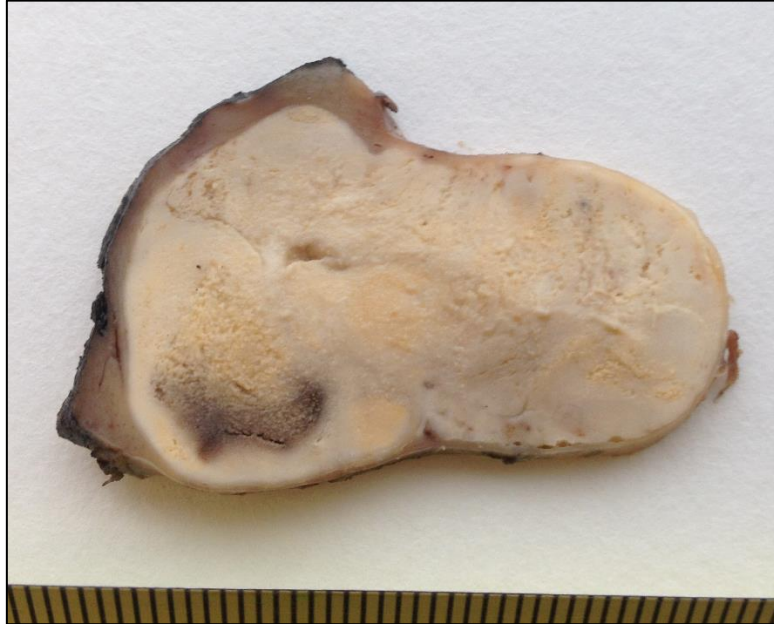


Figura 6. Imagen macroscópica de un tumor macroscópica e histológicamente homogéneo.

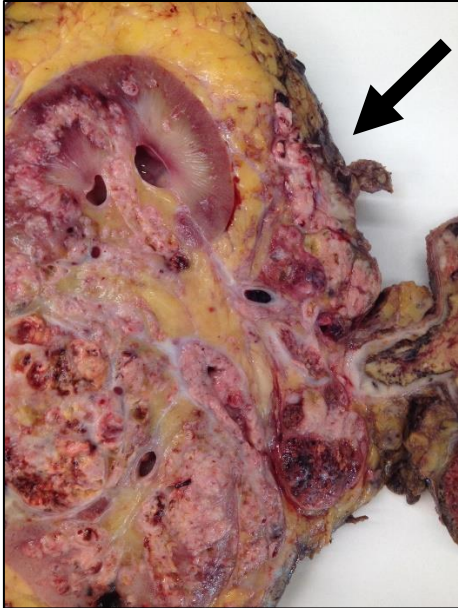


Figura 7. Invasión macroscópica del tejido adiposo perirrenal y de la vena renal (flechas).

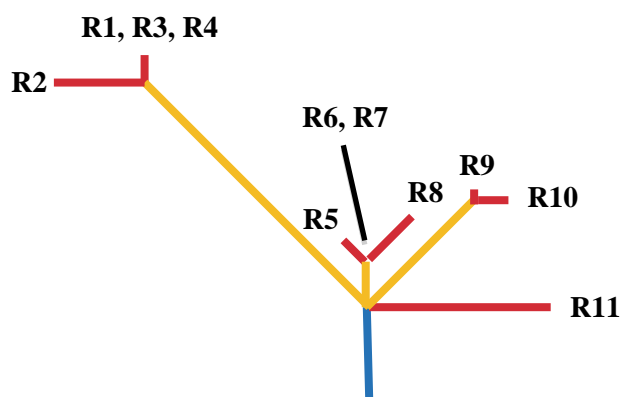
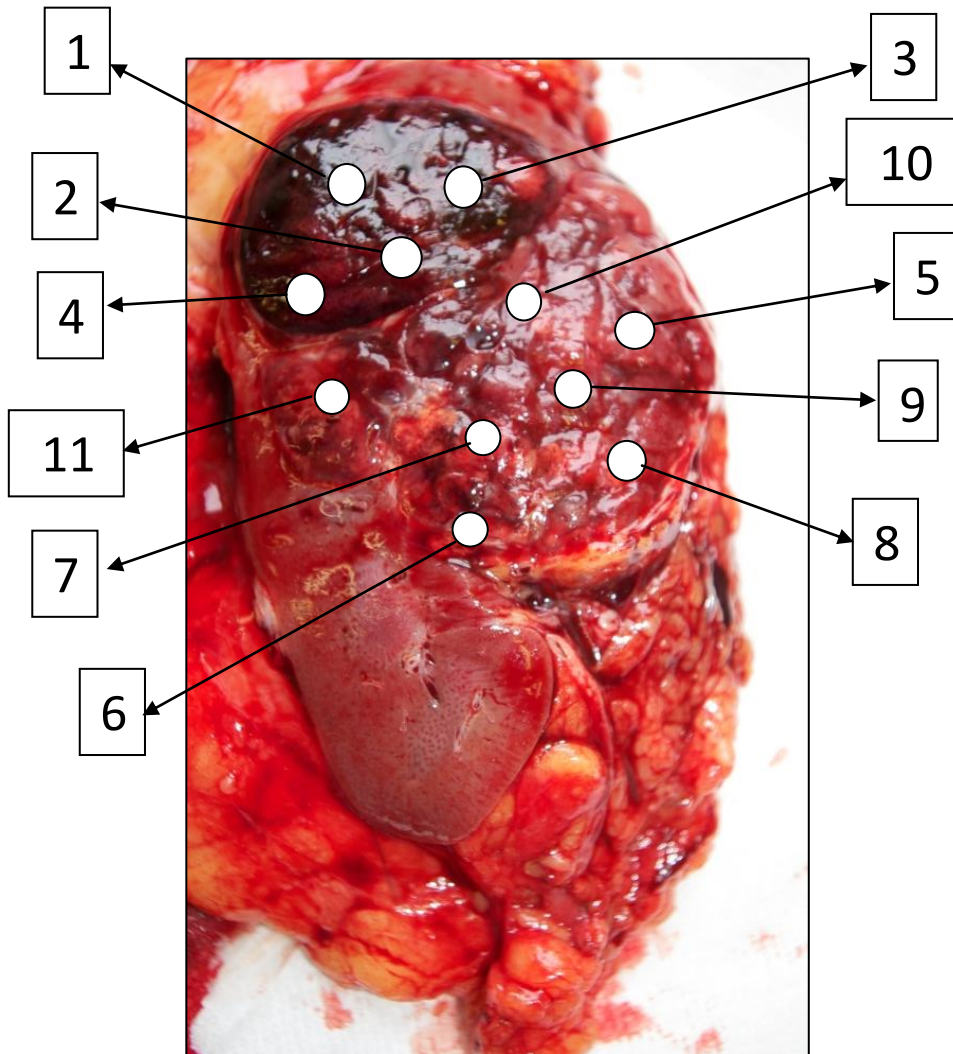


Figura 8. Ejemplo de heterogeneidad genómica regional ramificada según las distintas áreas topográficas en un caso de carcinoma renal de células claras.

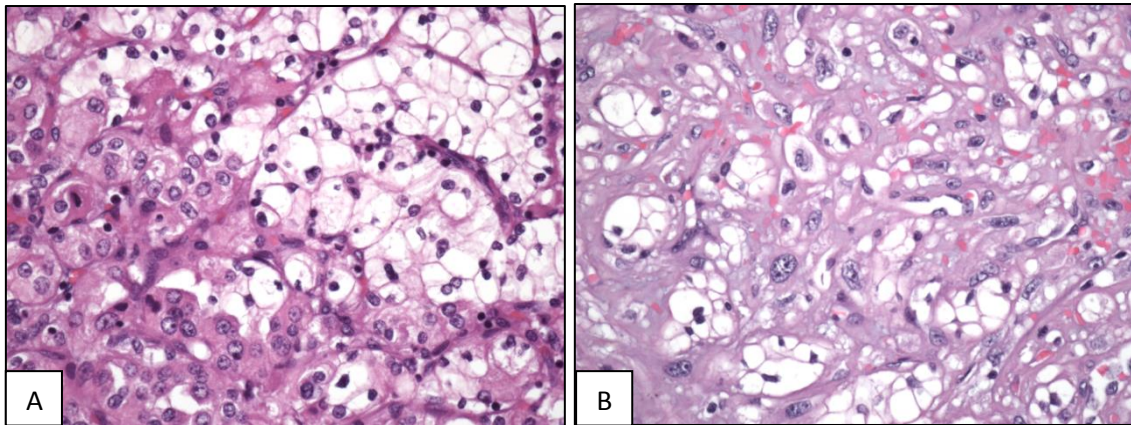


Figura 9. (A) Imagen histológica de la variabilidad celular del carcinoma renal de células claras mostrando áreas contiguas de células claras y eosinófilas. (B) Imagen microscópica de un carcinoma renal de células claras en donde aparecen células de alto y bajo grado entremezcladas.

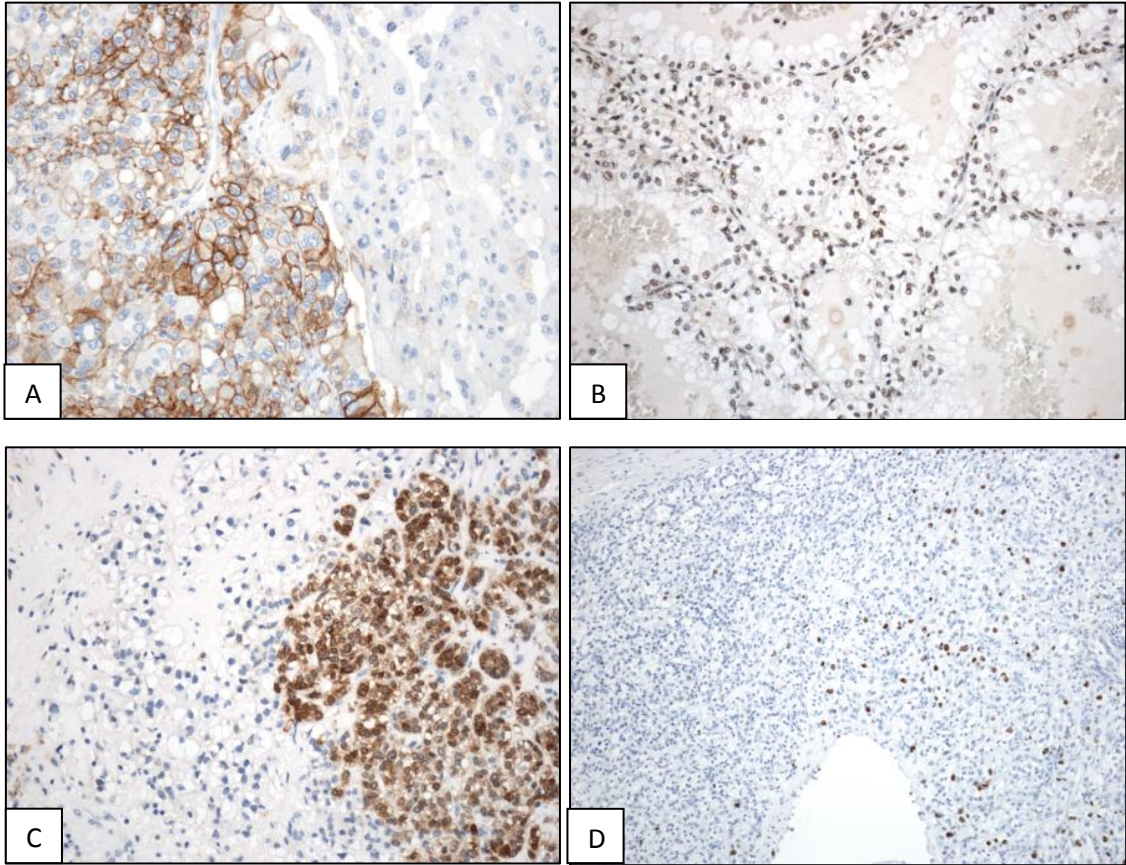


Figura 10. Detalle inmunohistoquímico de tinción parcial con (A) CAIX, (B) BAP-1, (C) COX2 y (D) Ki67.

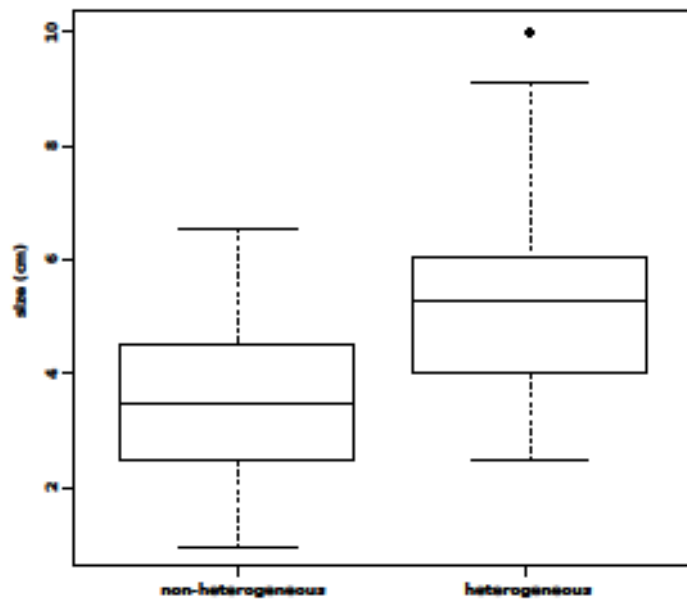


Figura 11: Diferencias significativas en el tamaño tumoral entre los casos homogéneos y los heterogéneos.

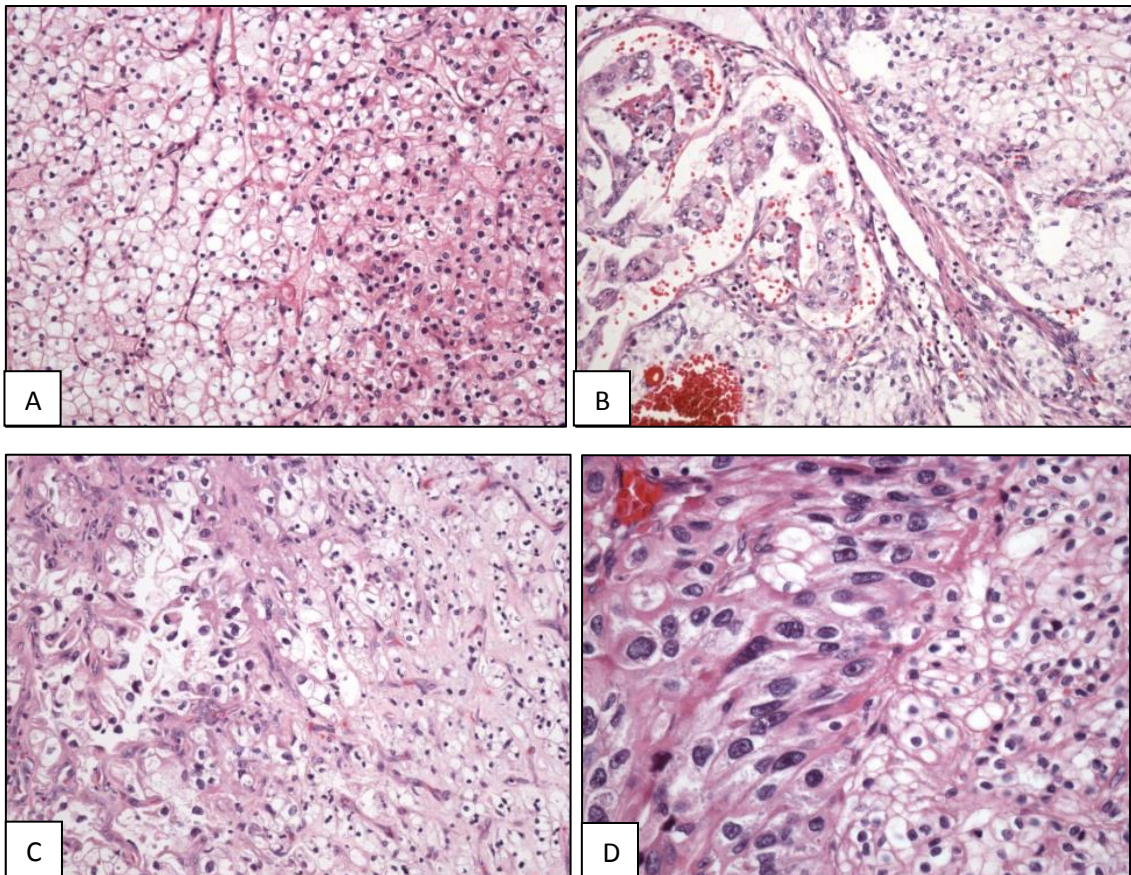


Figura 12. Heterogeneidad intratumoral en áreas tumorales adyacentes de CCRCC en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina. (A) Células claras y granulares, (B) arquitectura tumoral celular papilar y sólida, (C) grados de Fuhrman alto (papilar) y bajo (sólido), (D) grados de Fuhrman alto y bajo en células claras (patrón sólido).

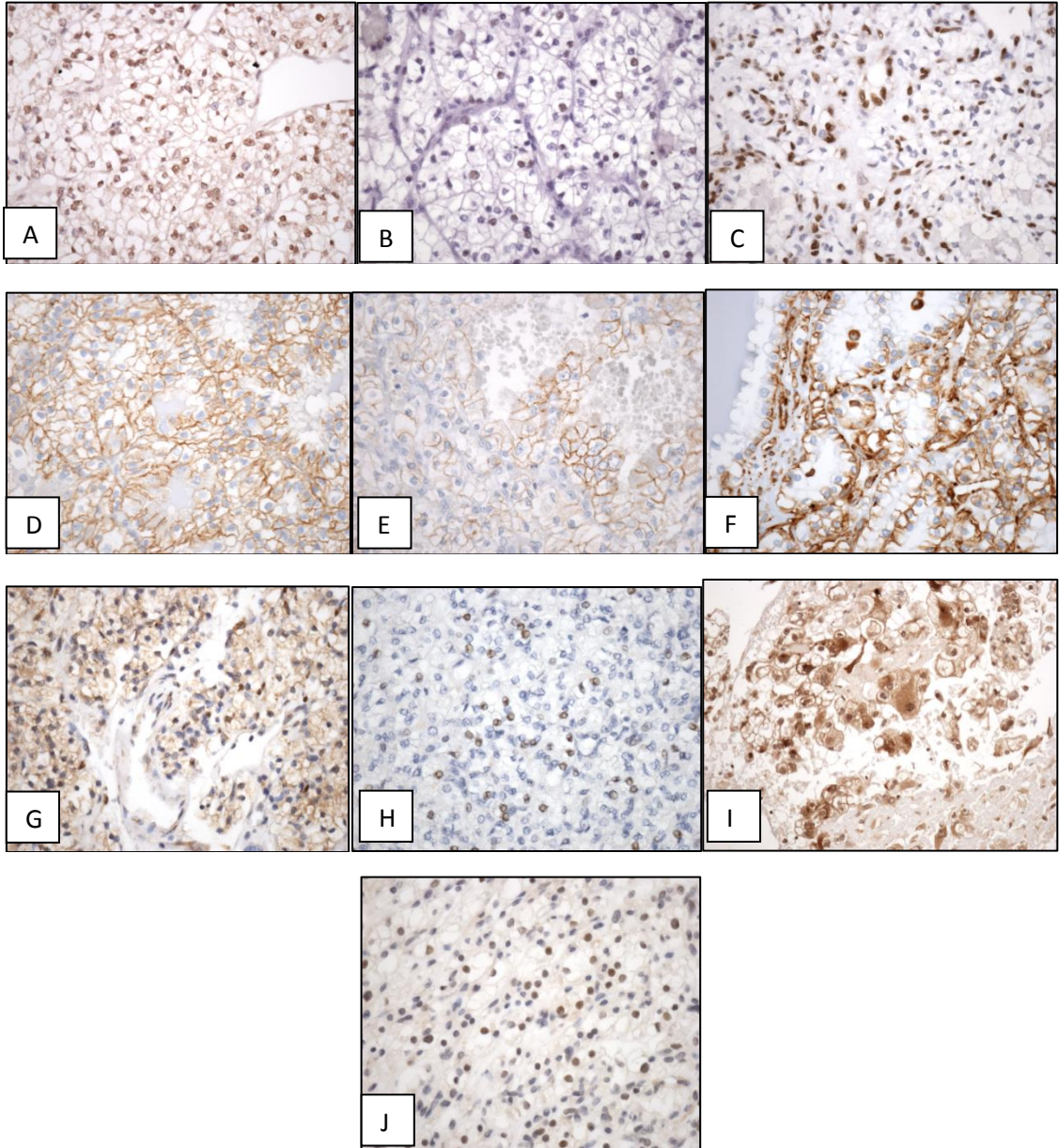


Figura 13. Patrón de tinción inmunohistoquímica, nuclear y/o citoplásmica, en el carcinoma renal de células claras, (A) Snail, (B) Twist, (C) ZEB1, (D) β -catenina, (E) E-cadherina, (F) vimentina, (G) PTEN, (H) p110, (I) p-Akt, (J) SETD2.



Datos Biográficos

Laura Zaldumbide Dueñas (Bilbao, 1977) obtiene la Licenciatura en Medicina en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) en 2001. Durante el periodo 2002-2006, realiza su residencia en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Marqués de Valdecilla” de Santander bajo la supervisión del Profesor Fernando Val Bernal, Catedrático de Anatomía Patológica de la Universidad de Cantabria. Desde 2012, pertenece a la plantilla de patólogos asistenciales del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Cruces, en Barakaldo, Bizkaia, donde ejerce oficialmente las funciones de Tutora de Residentes.

Es profesora asociada a tiempo parcial (3h) de Anatomía Patológica desde 2013 en el Departamento de Especialidades Médico-Quirúrgicas de la UPV/EHU.

Comienza sus trabajos de tesis en 2014 y defiende en 2016.

Contribuciones científicas