

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**Giltzurruneko errenina-angiotentsina sistemaren eta  
fibroblastoen aktibazio proteina  $\alpha$ -ren ikerketa  
giltzurrun-zelulen kartzinoman**

Estudio del sistema renina-angiotensina intrarrenal y de la  
proteína de activación de fibroblastos  $\alpha$  en el carcinoma  
de células renales

Peio Errarte Yarza

Leioa, 2018

“I have not failed  
I’ve just found  
10 000 ways  
That won’t work”

*Thomas Alva Edison*



*Bizitza eman zenidatenentzat  
Eta zuen bizitzaren zati bat eskaintzen didazuenentzat*

*Hotel Kalifornian berriz elkartu arte*



## **ESKER ONAK**

Lehenik eta behin tesi honen zuzendariei nire eskerrik beroena helarazi nahi nizueke. Gorka Larrinagari aurrena, nigan jarritako konfiantzagatik eta uneoro erakutsitako prestutasun, laguntza eta inplikazioagatik. Bestetik, Iñaki Lopezi, ikuspuntu positibo ezinbestekoagatik eta elkarrizketa bakoitza lanean jarraitzeko motibazio saio bihurtzeagatik.

Baita tesi hau garatu den Fisiologia eta Erizaintzako Departamentuei eta berau osatzen duzuen irakasle, ikertzaile, tekniko eta administrariei ere. Batetik tesia garatzeko aukera eta erraztasunak ematearren eta bestetik lan honek badaukalako zuetako bakoitzaren aportazio txiki bat. Halaber nire esker ona luzatu nahi nizueke gainontzeko Departamentuetako profesionalei ere, zuen bulego eta laborategietako atea irekitzeagatik, zalantzak entzutearren eta jasotako laguntza eta aholku guztiengatik.

Maiderri, 5 urte luze iraun dituen proiektu honen pauso bakoitzean bidelagun izatearren, erabakiak hartzen laguntzearren eta egunerokoa neukan onena ateraraztearren. Lan guzti hau ulergaitza litzateke zure laguntzarik gabe. Itziar eta Iraiari, egunerokotasuna, laborategian zein arlo pertsonalean, errazagoa eta alaiagoa egitearren. Tesi honetatik zerbait esanguratsua atera bada elkarri laguntzeko eta zailtasun guztien gaintik jarrera positibo eta adiskidetsua mantentzeko gaitasunaren ondorio da zalantzarik gabe. Pozten nau laborategiko zein laborategitik kanpoko hamaika oroitzapen zuekin konpartitzeak. Laborategitik pasa zareten ikasle zein irakasle guztiei, guztiek zerbait berria irakatsi baitidazue.

BioDonostia Osasun Ikerketa Institutuko Onkologia Molekularreko taldeari, zuekin pasatako denboran taldeko partaide bat gehiago bezala sentiarazteagatik. Charles Lawrieri, zure laborategiko atea ireki eta ikerketa onkologikoaren mundua erakusteagatik eta bereziki Lorea Manterolari, nirekin horrenbeste inplikatzegatik eta nire lanaren gidaritza zure gain hartzearren. Bertan pasatako urte eta erdian

lagundu ninduzuen guztioi, bereziki Ibai, Erika, Paula, Haizea, Estitxu eta Leireri zuen adiskidetasuna da tesi honen emaitzarik esanguratsuen.

A César Echeverría del Instituto de Investigación CIBQA de la Universidad Bernardo O'Higgins por darme la posibilidad de realizar una estancia en su laboratorio que me permitió desarrollarme profesional y personalmente. En especial a Valentina y a Jordán por haberme hecho sentir como en mi propia casa durante el tiempo que pase en Santiago de Chile. Por endulzar el día con alfajores y por las noches de chorrillanas, chelas, buena conversación y carrete. ¿Cachái?

Etxekoei, bizitzako arlo guztietan bezala honetan ere zuen sostengua eta bultzada izango ez banitu bidea askoz nekezagoa izango litzatekelako. Naizena izatera iristeko baliabide, aholku, konfiantza eta maitasun guztia ematearren. Izatea nahi dudana izatera iristeko askatasuna eta laguntza eskaintzearren. Aita, ama, niretzat eredu bat zarete eta zuek emandako bizitza ulertzeko modua daukadan altxorrik handiena da. Ane, bizitzako une txarrenak eta onenak zurekin partekatzea opari bat delako, horrela izan dadila beti.

Bereziki Ainhoari, tesiaren alde ilunena jasatea tokatu zaizulako. Eskerrik asko zure konfiantzagatik, pazientziagatik, zure adiskidetasunagatik eta zure maitasunagatik. Eta batez ere, ezer ulertu gabe ere inork baino hobeto ulertu nauzulako. Horregatik eta beste mila gauzagatik.

Kaletarrei eta batez ere Gorke eta Oierri, beti mahaiaren bueltan elkartzeko arrazoi bat aurkitzearren. Arrakasta zein dezepzioak garagardotan neurtzen laguntzearren.

Tesi proiektu baten garapena gauza asko dira, lana, esfortzua, dedikazioa, inplikazioa eta sakrifizioa beste askoren artean. Hala ere, nire kasuan, prozesu aberasgarria izan da zalantzarik gabe, arlo profesional zein pertsonalean oztopoei aurre egiteko tresnez jabetzeko bidea izan den aldetik. Bizitza bera hartu-eman prozesu bat den heinean, nire aldetik ahal beste eman dut lan honen garapenean baina era berean, asko jaso dut urte guzti hauetan eta asko jasotzen dut esperientzia honek ezagutarazi dizkidan pertsonengandik. Plazer bat izan da bidea zuekin konpartitzea. Horregatik,

Mila esker denoi





## **LABURPENA. Resumen**



Giltzurrun-zelulen kartzinoma (RCC) organo honetako tubuluetako zelula epitelialetatik eratorritako minbizien taldea da. Munduko osasun erakundearen minbizi urologikoen sailkapenaren arabera, 15 RCC azpimota histologiko baino gehiago daude. Halere, intzidentzia altuena daukaten 3 azpimotek, “zelula argien giltzurrun-zelulen kartzinomak” (CCRCC), “giltzurrun-zelulen kartzinoma papilarrak” (PRCC) eta “giltzurrun-zelulen kartzinoma kromofoboak” (ChRCC) kasuen %90etik gora batzen dituzte. Lan honetan, hiru hauetaz gain, giltzurruneko onkozitoma (RO) ere aztertzen da, RCC onbera ohikoena. Gaur egun, diagnostikatzen diren minbizien %2,4 mota honetakoak dira eta minbiziak eragindako heriotzen %1,7ren erantzule dira. Bi aldiz ohikoagoa da gizonezkoetan emakumezkoetan baino eta intzidentzia nabarmen handiagoa da herrialde garatuetan. Hematuria, saihets-aldeko mina eta masa abdominalen agerpena dira bere sintoma klasikoak baina egun, eritasunaren fase berantiarren erakusle dira. Hala, gaixotasun asintomatikoa da fase goiztiarretan eta ondorioz, zoriz diagnostikatzen dira kasuen erdia baino gehiago, irudi teknikei esker. RCCdun gaixoen pronostikoa faktore ezberdinek baldintzatzen dute. 5 urteko biziraupena %90etik gorakoa da giltzurrunaren baitan lokalizaturiko tumoreetan baina nabarmen jaisten da inbasio maila altuagoa den estadioetan. RCC lokalizatuaren tratamendu estandarra nefrektomia da, hau da, giltzurrunaren erauzketa kirurgikoa. Tratamendu honek tumorearen ezabaketa eragin arren, gaixoen %30ak metastasiak garatzen ditu. Fase metastasikoetan, terapia gidatuen erabilera gailendu da, tirosina-kinasa hartzaileen eta mTOR seinalizazio bidearen inhibitzaileak lehen eta bigarren lerroko terapia gisa erabiltzen direlarik. Tratamendu hauek aldi batez gaixotasunaren kontrola ahalbideratu arren, tumoreek hauekiko erresistentzia garatzen dute. Ondorioz, RCC gaixoen maneiorako beharrezkoak dira arrisku handiko gaixoen eta tratamendu egokiaren aukeraketarako biomarkatzaileen garapena eta tratamenduaren optimizaziorako terapia berrien diseinua.

Tesi proiektu hau kokatzen den ikerketa taldean, peptidasek minbizi mota ezberdinen garapenean betetzen duten funtzioa sakonki azertu da. Peptidasak

lotura peptidikoak hidrolisatzen dituzten entzima multifuntzionalak dira, eta zelulen mintzari atxikita zein hauen barne edo kanpo inguruneetan aurki daitezke. Minbizian, bereziki inbasio eta migrazioarekin erlazionatu badira ere, etapa guztietan parte hartzen dute. Lan honetan, hainbat peptidasek giltzurrun-zelulen kartzinomaren garapenean biomarkatzaile eta diana terapeutiko gisa izan dezaketen potentziala aztertzen da. Batetik, errenina-angiotentsina sistema aztertzen da, angiotentsina peptidoak eraldatzeko gaitasuna daukaten entzimen (NEP/CD10, APA, ACE2 eta ACE) analisitik abiatuta. Bestetik, fibroblastoen aktibazio proteina  $\alpha$  (FAP $\alpha$ ) ikertzen da, minbiziari atxikitako fibroblastoen aktibazioan mugarri den serina peptidasa.

Errenina-angiotentsina sistema (RAS), presio arteriala eta elektrolito eta fluidoaren homeostasia erregulatzen duen sistema endokrino zirkulatorio gisa da ezaguna. Halere, ehun ezberdinetan RAS lokalak deskribatu dira, non zelulen hazkuntza, diferentziazioa eta apoptosia erregulatzen duten. Gainera, sistema honen asaldurak eritasun proliferatiboekin erlazionatu dira, tartean minbiziarekin. Lan honetan, RCCko azpimota histologiko ezberdinetan RASko peptidasen espresioa asaldatuta dagoela frogatzen dugu. Are gehiago, CCRCCan, entzima hauen adierazpenak ezaugarri kliniko-patologiko ezberdinekin korrelazionatu zuen. Hala, ACEren espresioa, angiotentsina II sistemako peptido bioaktiboaren ekoizle nagusia, igo egiten zen gradu histologikoarekin. Aldiz, APArenean, angiotentsina II/angiotentsina III bihurtzearen erantzulearena, jaitzi. Honek, angiotentsina II peptido kontzentrazioaren igoera iradokitzen du, eta AT2R hartzailearen jaitzierarekin batera, ACE/Ang II/AT1R ardatzaren bidezko seinalizazioa indartzen du, APA/Ang III/AT2R ardatzarena ahultzearekin batera. Ondorioz, asaldurek aurreneko ardatzari atxikitako tumorearen aldeko efektua areagotzea iradokitzen dute, APA/Ang III/AT2R ardatzari tumorearen aurkako rola emanez. Gainera APArenean espresio galerak, RCC gaixoen biziraupen okerragoarekin korrelazionatzen du, ideia hau indartuz. Bestalde, NEP/CD10 eta ACE2 entzimak espresatzen dituzten

tumoreen kopurua igo egiten da gradua eta estadioa igo ahala. Hauek, Angiotentsina 1-7 peptidoaren ekoizle nagusiak dira, zein berriki, migrazio eta inbasioarekin erlazionatu den RCCan. Gainera, NEP/CD10en adierazpena, biziraupen okerragoarekin erlazionatzen da. Orokorrean, RCCan errenina-angiotentsina sistema asaldatuta ageri da eta litekeena da bere osagaien espresio aldaketek, abantaila bat suposatzea minbiziaren garapenean.

Halaber, RASk RCCan dauzkan asaldurak gaixoen odolean islatzen diren aztertzeko, peptidasen aktibitate serikoa neurtu zen. Hala, NEP/CD10, ACE2 eta APA entzimen aktibitatea altuagoa zen RCC gaixoetan kontrolatan baino. Aldiz, CCRCCan ACEren aktibitate serikoa jaitsi egiten zen gradu altuko tumoredun gaixoetan eta metastasidunetan. Era berean, NEP/CD10 eta ACE2ren aktibitateak aldatu egiten ziren klinikan pronostikorako erabiltzen diren UISS eta SSIGN modeloetako taldeetan sailkatzean. Bien aktibitatea baxuagoa zen gaixotasunaren garapena jasateko arrisku altuagoa zeukaten taldeetan. Hala, ehunean eta serumean jasotako emaitzek aurkako joera erakutsi zuten. Ehunean NEP/CD10, ACE2 eta ACEren espresioak gora egin zuen tumoreen agresibitatea igo ahala, aktibitate serikoa aldiz jaitsi egiten zen.

Oro har, emaitza hauek RASaren entzimen aktibitate eta espresio aldaketek esangura klinikoak daukatela iradokitzen dute eta ondorioz tresna baliagarriak izan daitezke RCCren diagnostiko, pronostiko edo tratamenduen iturri bezala.

Fibroblastoen aktibazio proteina  $\alpha$  edo FAP $\alpha$ , ia esklusiboki minbiziari atxikitako fibroblastoen (CAF) mintzean espresatzen den proteina da. Bere espresioa tumore epitelialen %90ean deskribatu da eta orokorrean, pronostiko txarreko markatzailea da. Tesi proiektu honetan aurrenekoz deskribatzen da serina peptidasa honen adierazpena RCCan, non pronostikorako erabiltzen diren ezaugarri kliniko-patologikoekin korrelazionatu zuen, hala nola, gradua, inbasio lokala eta diametroarekin. Gainera aldagai hauek bezainbesteko potentziala erakutsi zuen biziraupen okerreneko gaixoak hautatzeko.

Tumoreen agresibitatearekin erakutsitako erlazio estuaren ondorioz, FAP $\alpha$ -ren espresioaren ikerketa metastasidun CCRCC (mCCRCC) gaixoen tumore primarioko zein metastasietako ehunera hedatu zen. mCCRCCan ere, tumore primarioko FAP $\alpha$ -ren adierazpena biziraupen okerragoarekin erlazionatu zen baina ez ordea ehun metastasikokoa. Gainera, korrelazio positibo bat atzeman zen ehun primarioko eta hauen metastasietako espresioaren artean. Are gehiago, FAP $\alpha$ -ren adierazpenak, ehun primarioan zein metastasikoan, RCCko tumoreen pronostiko gaiztoko hainbat ezaugarriekin bat egin zuen, hala nola estadio altuekin, nekrosiarekin, aldaera sarkomatoidearekin, metastasi sinkronikoekin eta bereziki gongoil linfatikoetako metastasiarekin.

Emaitza hauek FAP $\alpha$ -k metastasien garapenean rol garrantzitsua joka lezakela iradokitzen dute. Prozesu horretan erabilitako mekanismo potentzialen ikerketarako, FAP $\alpha$ -k markatzaile mesenkimalekin daukan erlazioa aztertu zen. Hala, korrelazio positiboa ikusi zen FAP $\alpha$  eta bimentinaren espresioaren artean, bai ehun primarioan zein metastasikoan. Edonola honek ez du ziurtatzen FAP $\alpha$ -k epitelio-mesenkima trantsizioa (EMT) gidatzen duenik. Izan ere, bimentinak, CAFek gidatutako inbasio kolektiboan parte hartzen dutela frogatu da. Inbasio mekanismo honetan, CAFek eta tumore-zelulek batera migratzen dute agregatuak eratuz. Litekeena da FAP $\alpha$  inbasio mota honetan inplikaturik egotea baina beharrezkoa da norabide honetan sakontzea serina proteasa honek RCCan daukan rola baieztatzeko.

Ondorioz, emaitza hauek FAP $\alpha$ -k giltzurrun-zelulen kartzinomaren pronostikorako tresna potentziala izan daitekeela frogatzen dute. Baina ez hori bakarrik, FAP $\alpha$ -ren espresio patroia bereizgarriak, metastasien garapenarekin daukan erlazioak eta ehun primario eta metastasikoetan erakutsitako korrelazioak, terapia gidatuen diseinurako iturri erakargarri bihurtzen dute.

# AURKIBIDEA

Esker onak.....	I
Laburpena.....	V
Aurkibidea.....	XI
Irudien aurkibidea.....	XV
Taulen aurkibidea.....	XIX
Akronimoak eta laburdurak.....	XXIII
1. SARRERA. Introducción.....	25
1.1 GILTZURRUN-ZELULEN KARTZINOMA (RCC).....	2
1.1.1 Giltzurruna.....	2
1.1.2 Giltzurrun-zelulen kartzinomaren ezaugarri orokorrak .....	7
1.1.3 Giltzurrun-zelulen kartzinomaren azpimota histologikoak .....	15
1.2 PEPTIDASAK .....	22
1.2.1 Peptidasen funtzioak.....	23
1.2.2 Peptidasak eta minbizia.....	25
1.3 ERRENINA-ANGIOTENTSINA SISTEMA (RAS) .....	28
1.3.1 Egitura eta funtzioa .....	28
1.3.2 RAS lokalak (IRAS): fisiologia eta patologia .....	32
1.3.3 RAS eta minbizia .....	33
1.3.4 Giltzurruneko errenina-angiotentsina sistema (iRAS) eta giltzurrun-zelulen kartzinoma .....	39
1.4 FIBROBLASTOEN AKTIBAZIO PROTEINA $\alpha$ (FAP $\alpha$ ) .....	45
1.4.1 Egitura eta funtzioa .....	45
1.4.2 FAP $\alpha$ -ren espresioa fisiologian eta patologian.....	47
1.4.3 FAP $\alpha$ eta minbizia .....	48
1.4.4 FAP $\alpha$ eta giltzurrun-zelulen kartzinoma.....	62



2.	HELBURUAK. Objetivos.....	64
2.1	1. KAPITULUA: GILTZURRUNEKO ERRENINA-ANGIOTENTSINA SISTEMAREN (IRAS) IKERKETA GILTZURRUN ZELULEN KARTZINOMAN (RCC) .....	67
2.2	2. KAPITULUA: FIBROBLASTOEN AKTIBAZIO PROTEINA $\alpha$ (FAP $\alpha$ ) ZELULA ARGIEEN GILTZURRUN-ZELULEN KARTZINOMAN (CCRCC) .....	68
3.	MATERIALAK ETA METODOAK. Materiales y métodos .....	70
3.1	LAGINA.....	72
3.1.1	Angiotentsinen entzima bihurtzaileen espresioa eta aktibitatea RCC gaixoetan .....	73
3.1.2	Angiotentsina II peptidoaren AT1R eta AT2R hartzaileen semi-kuantifikazioa .....	75
3.1.3	FAP $\alpha$ -ren espresioa CCRCC gaixoetan .....	76
3.2	ADIERAZPEN GENOMIKOA AZTERKETZEKO TEKNIKAK.....	78
3.2.1	Geneen espresioaren kuantifikazio erlatiboa.....	78
3.3	PROTEINEN AZTERKETARAKO TEKNIKAK.....	83
3.3.1	Proteinen espresioaren analisisa IHC-P bidez.....	83
3.3.2	Angiotentsina peptido bihurtzaileen aktibitatearen neurraketa .....	87
3.3.3	Proteina adierazpenaren semi-kuantifikazioa western blot teknikaren bitartez .....	90
3.3.4	Immunofluoreszentzia (IF) .....	95
3.4	ZELULEN KULTIBORAKO TEKNIKAK.....	97
3.4.1	Lerro zelularrak.....	98
3.4.2	Zelulen bideragarritasun entseguak.....	99
3.4.3	Wound healing edo zauri entseguak.....	99
3.4.4	MAPK/ERK seinalizazio bidearen aktibazio entseguak.....	100
3.4.5	Medio baldintzatuarekin buruturiko entseguak .....	101
3.4.6	Fibroblasto eta RCC lerroen arteko ko-kultiboak .....	102
3.5	ANALISI ESTADISTIKOA.....	103
4.	RESULTADOS. Emaitzak .....	104
4.1	CAPÍTULO 1: ESTUDIO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRARRENAL (IRAS) EN EL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES .....	106

4.1.1	Expresión de las enzimas del sistema renina-angiotensina en los diferentes subtipos de RCC y en tejido renal no neoplásico adyacente .....	106
4.1.2	Expresión de las enzimas del iRAS en función de las variables clínico-patológicas de pacientes con CCRCC.....	109
4.1.3	Asociación de la expresión de las enzimas del iRAS con la supervivencia de los pacientes con CCRCC .....	112
4.1.4	Expresión de los receptores AT1R Y AT2R en el CCRCC y en el tejido adyacente no neoplásico.....	115
4.1.5	Estudios <i>in vitro</i> con líneas celulares de RCC .....	117
4.1.6	Comparación de la actividad enzimática de las enzimas del RAS en el suero de pacientes con RCC y controles sanos .....	121
4.1.7	Actividad sérica de las enzimas del RAS en función de variables clínico-patológicas de pacientes con CCRCC .....	122
4.1.8	Relación de la actividad sérica de las enzimas del RAS con la supervivencia de pacientes con CCRCC.....	125
4.2	CAPÍTULO 2: PROTEÍNA DE ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS $\alpha$ (FAP $\alpha$ ) EN EL CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (CCRCC) .....	128
4.2.1	Análisis histológico de la expresión de FAP $\alpha$ en el CCRCC .....	128
4.2.2	La expresión de FAP $\alpha$ en función de las variables clínico-patológicas de pacientes con CCRCC.....	129
4.2.3	Asociación de la expresión de FAP $\alpha$ con la supervivencia de los pacientes con CCRCC.....	130
4.2.4	Expresión de FAP $\alpha$ en el CCRCC metastásico (mCCRCC) y su relación con variables clínico-patológicas.....	132
4.2.5	Impacto de la expresión de FAP $\alpha$ en la supervivencia a 10 años de pacientes con mCCRCC.....	135
4.2.6	Correlación de la expresión de FAP $\alpha$ con marcadores de transición epitelio-mesénquima (EMT).....	138
4.2.7	Efecto del secretoma de las líneas de RCC en la expresión de FAP $\alpha$ .....	139
4.2.8	Efecto del secretoma de los fibroblastos en la migración de líneas celulares de RCC primarias .....	140
4.2.9	Efecto del co-cultivo celular entre líneas de RCC primarias y fibroblastos.....	144

5.	DISCUSIÓN. Eztabaida .....	148
5.1	CAPÍTULO 1: ESTUDIO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRARRENAL (iRAS) EN EL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES .....	150
5.2	CAPÍTULO 2: PROTEÍNA DE ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS $\alpha$ (FAP $\alpha$ ) EN EL CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (CCRCC) .....	162
6.	CONCLUSIONES. Ondorioak .....	176
6.1	CAPÍTULO 1. ESTUDIO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRARRENAL (iRAS) EN EL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES. ....	178
6.2	CAPÍTULO 2: PROTEÍNA DE ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS $\alpha$ (FAP $\alpha$ ) EN EL CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (CCRCC) .....	179
7.	BIBLIOGRAFÍA. Bibliografia .....	180
8.	ANEXOS. Eranskinak .....	226

# **IRUDIEN AURKIBIDEA**

<b>1.1 Irudia.</b> Giltzurrunaren egitura .....	<b>3</b>
<b>1.2 Irudia.</b> Nefrona .....	<b>4</b>
<b>1.3 Irudia.</b> Glomerulua .....	<b>5</b>
<b>1.4 Irudia.</b> Giltzurrun-zelulen kartzinomaren intzidentzia mundu mailan.....	<b>7</b>
<b>1.5 Irudia.</b> RCCaren estadio ezberdinak eta bakoitzaren tratamendurako aukerak.	<b>10</b>
<b>1.6 Irudia.</b> CCRCCaren ikuspegi makroskopiko (A) eta mikroskopikoa (H&E) (B) ....	<b>16</b>
<b>1.7. Irudia.</b> PRCCaren ikuspegi makroskopiko (A) eta mikroskopikoa (H&E) (B).. ...	<b>18</b>
<b>1.8. Irudia.</b> ChRCCaren ikuspegi makroskopiko (A) eta mikroskopikoa (H&E) (B).. ...	<b>19</b>
<b>1.9. Irudia.</b> ROren ikuspegi makroskopiko (A) eta mikroskopikoa (H&E) (B). ....	<b>20</b>
<b>1.10. Irudia.</b> Peptidasa motak hidrolizatzen duten lotura peptidikoaren kokapenaren arabera.....	<b>22</b>
<b>1.11. Irudia.</b> Proteasek aktibaturiko hartzaileen mekanismoaren irudikapena .....	<b>24</b>
<b>1.12. Irudia.</b> Errenina-angiotentsina sistemaren (RAS) eskema orokorra eta ardatz bakoitzak maila lokalean eragiten dituen funtzio klasikoak.....	<b>29</b>
<b>1.13. Irudia.</b> Minbiziaren <i>hallmark</i> edo ezaugarri bereizgarriak eta minbizi zelulei haiek bereganatzea ahalbideratzen dieten ezaugarri gaitzaileak.....	<b>37</b>
<b>1.14. Irudia.</b> Angiotentsina peptidoen entzima bihurtzaileen espresioa giltzurruna eratzten duten zelula mota ezberdinetan (A), odol hodietako zeluletan (B) eta zelula infiltratzaileetan (C).....	<b>44</b>
<b>1.15. Irudia.</b> Tumore-zelulen eta mikroingurua osatzen duten gainontzeko osagaien arteko binoranzkoko komunikazioa ezinbestekoa da tumorearen garapenerako .....	<b>49</b>
<b>1.16. Irudia.</b> Minbiziari atxikitako fibroblastoen (CAF) jatorri ezberdinak.....	<b>51</b>
<b>1.17. Irudia.</b> Minbiziari atxikitako fibroblastoen aktibazio prozesuaren laburpena	<b>53</b>
<b>1.18. Irudia.</b> Minbiziari atxikitako fibroblastoen minbiziaren garapenean eragiten dute.....	<b>54</b>
<b>1.19. Irudia.</b> FAP $\alpha$ -k mekanismo ezberdinen bitartez minbiziaren garapena ahalbideratzen du.....	<b>58</b>

<b>3.1. Irudia.</b> Alderantzizko transkripzioaren protokoloko tenperatura zikloen irudikapena .....	<b>80</b>
<b>3.2. Irudia.</b> qPCRaren protokoloko tenperatura zikloen irudikapena .....	<b>82</b>
<b>3.3 Irudia.</b> Ehun mikroarrayen (TMA) eraikuntzaren infografia parafinaz beteriko ehunetatik abiatu eta tindaketa fasera iritsi arte .....	<b>84</b>
<b>3.4. Irudia.</b> RCC zelulen eta fibroblasto zelulen arteko ko-kultiboaren irudikapena .....	<b>102</b>
<b>Figura 4.1.</b> Tinción hematoxilina-eosina (A-E) e inmunohistoquímica (F-Y) de las enzimas del iRAS en los subtipos histológicos de RCC y en tejido renal adyacente al tumor.....	<b>107</b>
<b>Figura 4.2.</b> Expresión de las enzimas del iRAS en función del grado de Fuhrman (A), la invasión local (pT) (B) y el diámetro tumoral (C) .....	<b>110</b>
<b>Figura 4.3.</b> Curvas de Kaplan Meyer para el análisis de la supervivencia en pacientes con CCRCC en función de la expresión de NEP/CD10 (A) y APA (B) .....	<b>113</b>
<b>Figura 4.4</b> Expresión inmunohistoquímica de los receptores de AT1R (A-C) y AT2R (D-F) en tejido renal adyacente al tumor (A/D) y en CCRCCs de grado bajo (B/E) y alto (C/F).. .....	<b>115</b>
<b>Figura 4.5.</b> Estudio semicuantitativo de la expresión de AT1R en homogenados de CCRCCs y en tejido adyacente no neoplásico .....	<b>116</b>
<b>Figura 4.6.</b> Estudio semicuantitativo de la expresión de AT2R en homogenados de CCRCCs y en tejido adyacente no neoplásico .....	<b>117</b>
<b>Figura 4.7.</b> Expresión de los receptores del iRAS AT1R, AT2R y Mas1 en líneas celulares de RCC y una línea de células renales epiteliales.....	<b>118</b>
<b>Figura 4.8.</b> Análisis de la fosforilación de MAPK 44/42 (Erk 1/2) en respuesta al tratamiento con angiotensina II en líneas de RCC primarias A498 y 786O....	<b>118</b>
<b>Figura 4.9.</b> Efecto de los péptidos angiotensina II (A) y angiotensina 1-7 en la viabilidad de células de RCC primario.....	<b>119</b>
<b>Figura 4.10.</b> Efecto de los péptidos angiotensina II y angiotensina 1-7 (10 µM) en la migración de células de RCC primario .....	<b>120</b>
<b>Figura 4.11.</b> Actividad sérica de NEP/CD10 en función de los modelos pronósticos SSIGN y UISS.....	<b>125</b>

<b>Figura 4.12.</b> Curva de supervivencia de Kaplan-Meyer para pacientes con CCRCC en función de la actividad sérica de NEP/CD10.....	<b>126</b>
<b>Figura 4.13.</b> Tinción H&E e inmunohistoquímica de FAP $\alpha$ en CCRCCs con patrón de crecimiento en nidos o difuso.....	<b>129</b>
<b>Figura 4.14.</b> Curvas de Kaplan Meyer para el análisis de la supervivencia en pacientes con CCRCC en función de la expresión de FAP $\alpha$ .....	<b>131</b>
<b>Figura 4.15.</b> Tinción H&E e inmunohistoquímica de FAP $\alpha$ en CCRCC primario y metastásico.....	<b>132</b>
<b>Figura 4.16.</b> Curvas de Kaplan Meyer para el análisis de la supervivencia en pacientes con CCRCC primario (A) y metastásico (B) en función de la expresión de FAP $\alpha$ .....	<b>136</b>
<b>Figura 4.17.</b> Expresión génica relativa de FAP $\alpha$ en la línea de fibroblastos GM06114 .....	<b>139</b>
<b>Figura 4.18.</b> Análisis de la expresión proteica de FAP $\alpha$ en la línea GM06114 mediante inmunofluorescencia .....	<b>140</b>
<b>Figura 4.19.</b> Efecto del medio condicionado proveniente de células de fibroblasto en la migración de la línea de RCC primario A498 .....	<b>141</b>
<b>Figura 4.20.</b> Efecto del medio condicionado proveniente de células de fibroblasto en la migración de la línea de RCC primario 786O .....	<b>143</b>
<b>Figura 4.21.</b> Expresión génica relativa del factor de transcripción Slug en líneas de RCC primario en función del tiempo de co-cultivo con la línea de fibroblastos GM06114.....	<b>145</b>
<b>Figura 4.22.</b> Expresión génica relativa de N-cadherina y MMP2 en la línea A498 en función del tiempo de co-cultivo con la línea de fibroblastos GM06114 .....	<b>145</b>
<b>Figura 4.23.</b> Análisis de la expresión génica relativa de FAP $\alpha$ en la línea GM06114 a 24, 48 y 72 horas de co-cultivo indirecto con líneas de RCC primario .....	<b>146</b>
<b>Figura 5.1.</b> Balance entre los ejes principales del RAS en el desarrollo del RCC....	<b>154</b>
<b>Figura 5.2.</b> Diagrama de la síntesis del péptido Ang 1-7 en el RCC .....	<b>155</b>
<b>Figura 5.3.</b> Esquema de los 3 ejes centrales del RAS intrarrenal en el CCRCC.....	<b>158</b>
<b>Figura 5.4.</b> Diagrama de la invasión colectiva entre CAFs y células tumorales .....	<b>169</b>



# **TAULEN AURKIBIDEA**

<b>1.1. Taula.</b> AJCCko TNM estadioa RCCn ezartzeko sistemaren irizpideak (8. Edizioa) .....	<b>11</b>
<b>3.1. Taula.</b> Angiotentsinen entzima bihurtzaileen espresioa eta aktibitatea ikertzeko erabilitako RCC gaixoen ezaugarri kliniko-patologikoak .....	<b>74</b>
<b>3.2. Taula.</b> AT1R eta AT2R hartzaileen espresioa aztertzeke erabilitako CCRCC gaixoen ezaugarri kliniko-patologikoak .....	<b>75</b>
<b>3.3. Taula.</b> FAP $\alpha$ -ren espresioa aztertzeke erabilitako CCRCC gaixoen ezaugarri kliniko-patologikoak.....	<b>76</b>
<b>3.4. Taula.</b> FAP $\alpha$ -ren espresioa aztertzeke erabilitako mCCRCC gaixoen ezaugarri kliniko-patologikoak.....	<b>77</b>
<b>3.5. Taula.</b> Tesi proiektu honetan adierazpen genomikoa aztertzeke erabilitako, errektibo, material suntsikor eta gailuen laburpena .....	<b>78</b>
<b>3.6. Taula.</b> Alderantzizko transkripzioa burutzeko erabilitako errektiboak eta hauen bolumena .....	<b>79</b>
<b>3.7. Taula.</b> Gene espresioaren analisirako erabilitako hasleen sekuentziak .....	<b>81</b>
<b>3.8. Taula.</b> qPCR erreakzioa burutzeko erabilitako errektiboen zerrenda eta bakoitzaren bolumena .....	<b>82</b>
<b>3.9. Taula.</b> Proteinen immunohistokimika bidezko detekzioan erabilitako, errektibo, material suntsikor eta gailuen zerrenda .....	<b>83</b>
<b>3.10. Taula.</b> Immunohistokimika bidez azterturiko proteinen detekziorako erabilitako antigorputzak eta hauen protokolo optimizatuaren ezaugarriak ..	<b>86</b>
<b>3.11. Taula.</b> Angiotentsinen peptido bihurtzaileen aktibitatearen neurketarako erabilitako errektibo, material suntsikor, tanpoi eta gailuen taula.....	<b>87</b>
<b>3.12. Taula.</b> Proteinen Western Blot bidezko detekziorako erabilitako errektibo, tanpoi, material suntsikor eta gailuen zerrenda .....	<b>90</b>
<b>3.13. Taula.</b> Elektroforesi bidezko proteinen banaketarako erabilitako gelak egiteko errektiboak eta hauen proportzioak.....	<b>93</b>
<b>3.14. Taula.</b> Western Blot bidez azterturiko proteinen detekziorako erabilitako antigorputzak eta erabilitako diluzioak.....	<b>94</b>



<b>3.15. Taula.</b> Immunofloreszentzia bidez proteinak detektatzeko erreaktibo, tanpoi, material suntsikor eta gailuen zerrenda .....	<b>95</b>
<b>3.16. Taula.</b> Immunofluoreszentzia bidez azterturiko proteinen detekziorako erabilitako antigorputzak eta erabilitako diluzioak.....	<b>96</b>
<b>3.17. Taula.</b> Zelulen kultibo teknikak garatu ahal izateko erabilitako erreaktibo, material suntsikor eta gailuen zerrenda .....	<b>97</b>
<b>3.18. Taula.</b> In vitro entseguetarako erabilitako lerro zelularren zerrenda. ....	<b>98</b>
<b>Tabla 4.1.</b> Expresión de las enzimas de iRAS en función del subtipo histológico ..	<b>108</b>
<b>Tabla 4.2.</b> Valores de la P del test Log-Rank del análisis de supervivencia de expresión de las enzimas convertidoras de péptidos de angiotensinas para pacientes con CCRCC .....	<b>112</b>
<b>Tabla 4.3.</b> Análisis univariante y multivariante (modelo de Regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas con capacidad predictiva de la supervivencia en pacientes con CCRCC junto con la expresión de NEP/CD10 y APA .....	<b>114</b>
<b>Tabla 4.4.</b> Actividad sérica de las enzimas del RAS en pacientes con diferentes subtipos histológicos de RCC y sujetos control.....	<b>122</b>
<b>Tabla 4.5.</b> Actividad sérica de las enzimas del RAS en pacientes con CCRCC en función de diferentes variables clínico-patológicas .....	<b>123</b>
<b>Tabla 4.6.</b> Actividad sérica de las enzimas del RAS en pacientes con CCRCC en función de los modelos pronósticos SSIGN y UISS .....	<b>124</b>
<b>Tabla 4.7.</b> Puntos de corte y valores log-rank para la actividad de las enzimas del RAS en la predicción de supervivencia de pacientes con CCRCC.....	<b>126</b>
<b>Tabla 4.8.</b> Análisis univariante y multivariante (modelo de Regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas con capacidad predictiva de supervivencia en el CCRCC y la actividad NEP/CD10 .....	<b>127</b>
<b>Tabla 4.9.</b> Expresión de FAP $\alpha$ en función de variables clínico-patológicas en CCRCCs primarios .....	<b>130</b>
<b>Tabla 4.10.</b> Valores de la P del test Log-Rank del análisis de supervivencia de las variables clínico-patológicas y la expresión de FAP $\alpha$ para pacientes con CCRCC .....	<b>130</b>

<b>Tabla 4.11.</b> Análisis univariante y multivariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas con capacidad predictiva de supervivencia en el CCRCC junto con la expresión de FAP $\alpha$ .....	<b>131</b>
<b>Tabla 4.12.</b> Expresión de FAP $\alpha$ en función de variables clínicas y patológicas en CCRCCs primarios .....	<b>133</b>
<b>Tabla 4.13.</b> Expresión de FAP $\alpha$ en función de variables clínicas y patológicas en tejido metastásico .....	<b>134</b>
<b>Tabla 4.14.</b> Análisis univariante y multivariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas con capacidad predictiva de supervivencia en el CCRCC junto con la expresión de FAP $\alpha$ en tumores primarios y metastásicos .....	<b>137</b>
<b>Tabla 4.15.</b> Correlaciones entre la expresión de FAP $\alpha$ y marcadores de transición epitelio-mesénquima en tejido de CCRCC primario (FAPp) y metastásico (FAPm).....	<b>139</b>



## **AKRONIMOAK ETA LABURDURAK:**

- ACE:** angiotensin-converting enzyme
- iACE:** angiotensin-converting enzyme inhibitor
- ACE2:** angiotensin-converting enzyme 2
- AJCC:** American Joint Committee on Cancer
- Ang 1-7:** angiotensin 1-7
- Ang II:** angiotensin II
- Ang III:** angiotensin III
- APA:** aminopeptidase A
- ARB:** angiotensin II receptor blocker
- AT1R:** angiotensin II type 1 receptor
- AT2R:** angiotensin II type 2 receptor
- BMI:** body mass index
- CAF:** cancer-associated fibroblast
- CCRCC:** clear cell renal cell carcinoma
- mCCRCC:** metastatic clear cell renal cell carcinoma
- ChRCC:** chromophobe renal cell carcinoma
- CKD:** chronic kidney disease
- CM:** conditioned medium
- ECM:** extracellular matrix
- EMT:** epithelial-mesenchymal transition
- DNA:** deoxyribonucleic acid
- DPPIV/CD26:** dipeptidyl peptidase IV
- ECOG:** Eastern Cooperative Oncology Group
- FAP $\alpha$ :** fibroblast activation protein  $\alpha$
- FBS:** fetal bovine serum

**HIF:** hypoxia-inducible factor

**MAPK:** mitogen-activated protein kinase

**MMP:** matrix metalloproteinases

**NEP/CD10:** neprilysin, neutral endopeptidase

**PBS:** phosphate-buffered serum

**PI3K:** phosphatidylinositide 3 kinase

**PRCC:** papillary renal cell carcinoma

**PRR:** (pro)renin receptor

**PSA:** prostate-specific antigen

**RAS:** renin-angiotensin system

**iRAS:** intrarenal renin-angiotensin system

**IRAS:** local renin-angiotensin system

**RCC:** renal cell carcinoma.

**mRCC:** metastatic renal cell carcinoma

**RNA:** ribonucleic acid

**RO:** renal oncocytoma

**ROS:** reactive oxygen species

**RT:** room temperature

**RTK:** receptor tyrosine kinase

**SSIGN:** stage, size, grade and necrosis

**TGF- $\beta$ :** transforming growth factor beta

**TMA:** tissue microarray

**TNM:** Tumor size. Lymph Nodes affected. Metastasis

**UISS:** ucla integrated staging system

**VEGF:** Vascular-Endothelial Growth Factor

**VHL:** von-Hippel Lindau

**WHO:** World Health Organization

# **1. SARRERA. Introducción**



## 1.1 GILTZURRUN-ZELULEN KARTZINOMA (RCC)

Giltzurrun-zelulen kartzinoma (ingeleseko *Renal Cell Carcinoma* RCC) giltzurruneko tubuluetako zelula epitelialetatik eratorritako minbizien taldea da Munduko Osasun Erakundearen tumoreen sailkapenaren arabera (WHO *classification of tumors*). Giltzurrunean ematen diren minbizien %90 zelula hauetatik eratorriak dira eta beraz, organo hauetako minbizi ohikoena da.

### 1.1.1 GILTZURRUNA

Giltzurrunak abdomeneko atzeko hormari itsatsita dauden organo pareta dira, bizkarrezurraren alde banatan kokatuak. Gizaki helduetan, 115 eta 170 gramo arteko pisua izan ohi dute eta 11 cm luze, 6 cm zabal eta 3 cm lodi izan ohi dira gutxi gorabehera.

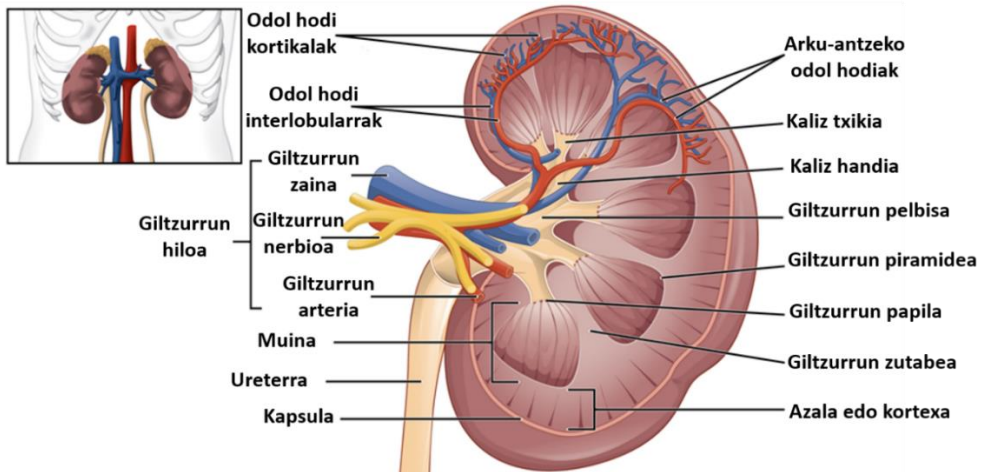
Giltzurrunak ezinbestekoak dira barne ingurunearen homeostasia mantentzeko. Betetzen dituzten funtzio ezberdinei erreparatuz gero, organismoaren homeostasia mantentzeko lanetan diharduten organoen artean garrantzitsuenak lirateke. Izan ere, metabolismitik sorturiko hondakinak iraitzez gain, zelulez kanpotiko fluidoaren osmolaritatea, bolumena, azido-base oreka eta konposizio ionikoa kontrolatzen dituzte. Are gehiago, parametro hauek zelulen barnean ere kontrolatzen dituzte zeharka bada ere (1).

Funtzio erregulatuak hauek bete ahal izateko, giltzurrunek iragazki gisa jarduten dute, jasotako odolatik abiatuz, gernua sortuz. Honela, giltzurrunen egitura estuki erlazionatuta dago bere funtzioarekin.



## Giltzurrunaren egitura

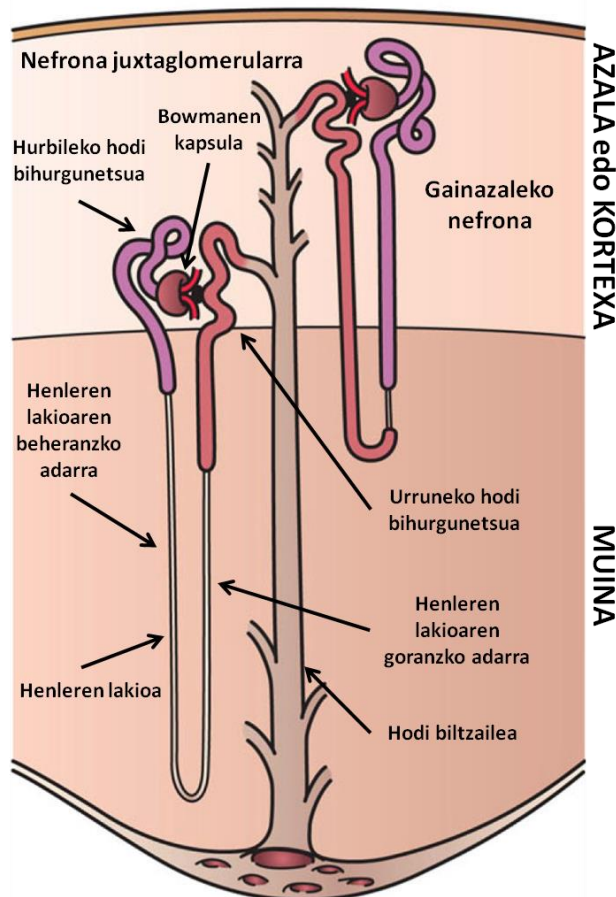
Giltzurruna zirkulazio sistemarekin zuzenean lotuta dago giltzurrun arteria eta zainaren bitartez. Hauek, giltzurrun pelbisarekin batera hilo deritzon zirrikituaren bitartez iritsi eta irteten dira giltzurrunetik (1.1 Irudia). Halaber, giltzurrunaren ebaketa longitudinal bat aztertuz gero, bi eremu ezberdin bereizi daitezke, kanpoaldeko azala edo kortexa eta barnealdeko muina. Giltzurrun piramide deritzen masa konikoek osatzen dute muina. Hauetako bakoitzaren erpinean, giltzurrun papila kokatzen da. Papila zeharkatuz, gertu giltzurrun kalizetara isurtzen da aurrena, ondoren, giltzurrun pelbisetik ureterreraino iritsiko dena (1,2).



**1.1 Irudia. Giltzurrunaren egitura.** Giltzurrunak abdomeneko atzeko hormari itsatsita dauden organo pareta dira. Irudian organo honen egitura eta osagai nagusiak ageri dira. (\*)*OpenStax College*k sortutako *The Kidney* izeneko irudiaren egokitzapena da, eta *Creative Commons*en CC-BY-3.0 lizentziarekin erabil daiteke.

## Nefrona

Nefrona giltzurrunaren unitate funtzionala da. Giza giltzurrun bakoitza 1,2 milioi nefronak osatzen dute eta zelula bakarreko geruzaz osaturiko hodi gisa definitzen dira. Nefrona bakoitza giltzurrun korpuskuluak (glomerulua eta Bowmanen kapsula), hurbileko hodiak, Henleren lakioak, urruneko hodiak eta hodi biltzaileak osatzen dute (1.2 Irudia). Atal bakoitza garraio funtzio espezifikoak burutzeko diseinaturiko zelula ezberdinez osatuta dago. Gainera, giltzurrunaren kortez eta muinean zehar duten kokapenaren arabera, bi mota bereizten dira, gainazaleko nefronak eta juxtaglomerularrak.



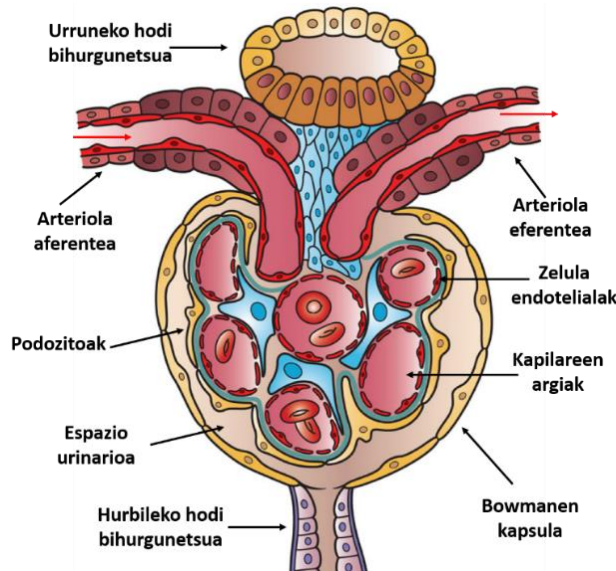
**1.2 Irudia. Nefrona.** Giltzurrunaren unitate funtzionala da. Giltzurrunean zehar daukaten kokapenaren arabera bi mota ezberdindu daitezke, juxtaglomerularrak (ezkerrean) eta gainazalekoak (eskuinean). (\*)Holly Fischerek sortutako *Kidney Nephron* izeneko irudiaren egokitzapena, *Creative Commons*en CC-BY-3.0 lizentziarekin erabil daiteke.

## 1. Sarrera. Introducción

Giltzurrun-zelulen kartzinoma mota ezberdinek, nefronaren atal ezberdinetako zelulatan daukate jatorria.

### *Glomerulua*

Kapilarrez osaturiko sarea da, Bowmanen kapsulak inguratua (1.3 Irudia). Bertan arteriola aferenteetatik iritsitako odola iragazi eta gertuaren aitzindari izango dena sortzen da. Lehenengo iragazi hau, plasmaren oso antzekoa da (proteinen kontzentrazioan izan ezik) baina giltzurruneko hodietan barrena aurrera egin ahala, zenbait osagairen absortzioa eta beste hainbaten jariaketa jasango ditu giltzurrun pelbisera iritsi aurretik.



**1.3 Irudia. Glomerulua.** Odolaren iragazpen prozesua hasten duen nefronaren atala. Kapilarrez osaturiko sarea da. (\*)Holly Fischerek sortutako *Kidney Nephron Cells* irudiaren egokitzapena, *Creative Commons* CC-BY-3.0 lizentziarekin erabilgarria.

### *Hurbileko hodiak*

Bowmanen kapsularen jarraian datorren nefronaren atala da, eta 12-25 mm-ko luzera eta 70 µm diametroko hodia da. Lehen zatia, hurbileko hodi bihurtzailea, xurgapen tubularrerako gainazala areagotzen duten mikrobilo ugariko zelula kuboideek osatzen dute. Henleren lakiora hurbilduz joan ahala, zelulen mikrobilo kopurua jaitsi egiten da eta baita mitokondrioena ere, zelulek morfologia lauagoa hartzen dutelarik.

## 1. Sarrera. Introducción

### *Henleren lakioa*

Henleren lakioa hodiaren paretaren lodiera murrizten den tartean hasten da. Hala, lakioaren zati fineko zelulak ezkatatsuak dira, hots, finak eta zapalak. Are gehiago, lakioaren goranzko zein beheranzko atala osatzen duten zelulak oso antzekoak dira egiturari dagokionez, funtzionaltasunari dagokionez ezberdintasunak nabarmenak diren arren. Goranzko atal lodiko zelulak aldiz, tamainan hurbileko hodia osatzen dutenen antzekoak dira, baina ez dute mikrobilorik alde luminalean.

### *Hodi distala edo urruneko hodia*

Henleren lakioak giltzurruneko kortexean daukan jarraipena da. Honen hasierako zelulak, Henleren lakioko goranzko atal lodikoen antzekoak dira eta amaierakoak aldiz hodi biltzailea osatzen dutenen antzekoak. Zelula guzti hauek mitokondriak inguratzen dituzten inbaginazioak dituzte beraien oinaldean. Azpimarragarria da urruneko hodia eratzen duten zelula nagusien artean, zelula tartekatuta deritzen beste zelula mota bat ere ageri dela. Hauek, ez dute inbaginaziorik mintzaren oinaldean baina bai ordea zitoplasmaren luzapenak alde luminalean. Anhidrasa karbonikoaren aktibitate altuagatik ezberdintzen dira.

### *Hodi biltzailea*

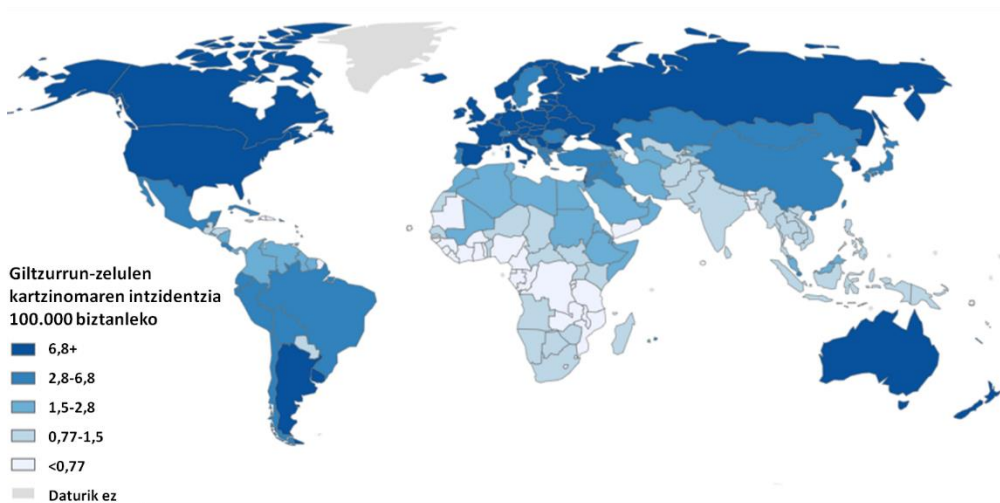
Urruneko hodiarekin batera nefrona distala eratzen du. Zelula kuboideek osatzen dute baina hurbileko hodiekin alderatuz hauek ez daukate luzapenik alde luminalean. Gainera, hauen artean ere, zelula tartekatuak aurkitu daitezke. Kortexean, hodi biltzaile bakoitzak 6 hodi distal ezberdin batzen ditu eta muinean sartu ahala, hodi biltzaileak bat eginez doaz Belliniren hodia eratuz. Honek amaitzeko giltzurrun kalizetan iragazten duelarik (2).

## 1.1.2 GILTZURRUN-ZELULEN KARTZINOMAREN EZAUGARRI OROKORRAK

### Intzidentzia eta heriotza-tasak

Mundu osoan zehar diagnostikatzen diren minbizietatik %2,4 inguru dira giltzurrun-zelulen kartzinoma eta minbiziak eragindako heriotzen %1,7ren erantzule dira (3). Beste era batera esanda, urtero 295 000 kasu berri diagnostikatu eta 134 000 heriotza eragiten ditu munduan (4). Euskal Autonomia Erkidegoari dagokionez, 2090 kasu berri diagnostikatu ziren 2009-2013 urteen artean (1449 gizonezkoetan eta 641 emakumezkoetan) eta intzidentziak urteko %2,4ko gorakada esanguratsua jasan zuen bi sexuetan. Gainera, 2011-2015 urteen artean 681 heriotza eragin zituen (452 gizonezkoetan eta 229 emakumezkoetan) (5).

Giltzurrun-zelulen kartzinoma bi aldiz ohikoagoa da gizonezkoetan emakumezkoetan baino. Halaber, intzidentzia askoz altuagoa da herrialde garatuetan, 15 aldiz altuagoa esaterako Europa iparraldeko eta mendebaldeko hainbat herrialdetan Afrikako hainbatekin alderatuz (1.4 Irudia) (6).



**1.4 Irudia. Giltzurrun-zelulen kartzinomaren intzidentzia mundu mailan.** 2012rako RCC kasuen estimazioa 100.000 biztanleko adinaren arabera estandarizatuta eta bi sexuak kontutan hartuta. (\*) Irudia Munduko Osasun Erakundearen (WHO) <http://globocan.iarc.fr> web orrialdetik ateratakoa da.

## 1. Sarrera. Introducción

Orokorrean giltzurrun-zelulen kartzinomaren intzidentzia gora doan arren, honek eragindako heriotza-tasa egonkortu edo jaitsi egin da herrialde garatuetan. Fenomeno honen arrazoietakoa bat irudi tekniken erabilera orokortuak eragin duen giltzurruneko masa txikien zorizko diagnostikoa izan liteke. Diagnostiko goiztiarra izanik, tumoreak 4 cm baino txikiagoak izan ohi dira eta oro har ez dute metastasirik aurkezten, pronostikoa hobetuz (7).

### **Arrisku faktoreak**

Giltzurrun-zelulen kartzinoma jasateko arriskua handiagoa da adinean aurrera egin ahala. Honela, 2013. urtean diagnostikaturiko giltzurrun minbizien %65 60 urtetik gorako pertsonengan jazo ziren. Halaber, heriotza-tasa altuena ere adin tarte honetan aurki daiteke, hain zuzen ere heriotza guztien %72,1 (8).

Adinak duen eragin saihestezinaz gain, beste 3 faktorek berebiziko garrantzia daukate RCCren garapenean (9):

#### *Tabakismoa*

Tabako erretzaileek giltzurrun-zelulen kartzinoma jasateko arrisku handiagoa dute ez erretzaileek baino, %50ekoa gizonezkoetan eta %20koa emakumezkoetan. Gainera arriskuaren igoera dosiaren menpekoa da (10).

#### *Obesitatea*

Gehiegizko pisua eta obesitateak giltzurrun-zelulen kartzinoma jasateko arriskua areagotzen dute. Gorputz masaren indizean (BMI) 5 kg/m<sup>2</sup>-ko igoerak arriskua %24ean handitzen du gizonezkoetan eta %34ean emakumezkoetan (11).

#### *Hipertentsioa*

Presio arterial altuak RCC jasateko arriskua areagotzen du. Obesitatea eta hipertentsioa estuki erlazionatuta dauden arren, giltzurrun-zelulen kartzinoma jasateko arriskuan duten eragina independentea da. Presio arterial altuaren kontrol eraginkorrak, anihipertentsibo bitartez esaterako, babes funtzioa betetzen dute (12).

## 1. Sarrera. Introducción

Hiru hauetaz gain, badira beste hainbat faktore kliniko RCCrekin erlazionatuak izan direnak, hala nola, diabetes mellitusa. Giltzurrun minbizia izateko arrisku areagotua frogatu da giltzurruneko gaixotasun kronikodun (CKD) pazientetan, hemodialisidunetan, giltzurrun transplantedunetan, giltzurruneko gaixotasun kistikodunetan eta aurretik giltzurrun-zelulen kartzinoma jasan dutenetan. Aldiz, ariketa fisikoak, barazki eta frutan aberatsak diren dietek eta alkoholaren neurrizko kontsumoak ( $\geq 15$  g/egun) babes gisa jokatuko lukete (9).

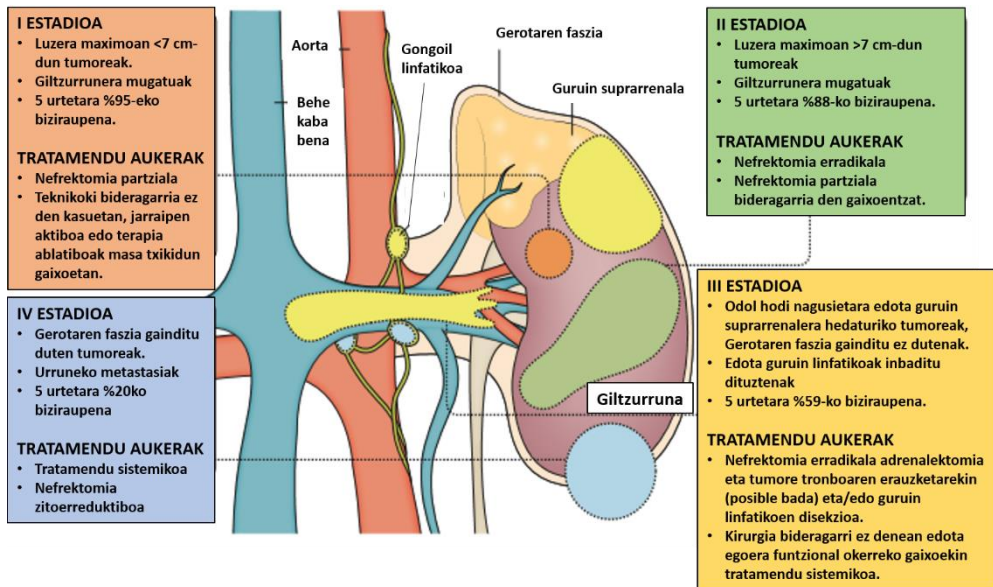
Faktore genetikoek ere eragiten dute. Giltzurruneko minbizi guztien %3-5 artean herentziazkoak direla kalkulatzen da. Herentziazko gaitzen ikerketak hainbat mutazio azaleratu ditu (BAP1, FLCN, FH, MET, PTEN, SDHB, SDHC, SDHD, TSC1, TSC2 eta VHL geneenak), hauetako batzuk gainontzeko minbizietan ere aurkitzen direnak (13). Gainera mutazio hauek giltzurrun minbizi azpimota jakinekin erlazionatzen dira.

### **Diagnostikoa eta pronostikoa**

Esan bezala, abdomeneko irudi teknikei esker, zoriz diagnostikatzen dira giltzurruneko minbizien %48-66 artean herrialde garatuetan. Honela, kasu hauen %80 inguruk ez dute sintomarik aurkezten (7). Hematuria, saihets-aldeko mina eta masa abdominalen agerpena dira RCCren sintoma klasikoak baina gaur egun gaixotasun aurreratuaren erakusle dira eta pronostikoa okerragotzen dute. Halaber, nekea, pisuaren galera eta anemia eritasun honi atxiki dakizkioken ezaugarri ez espezifikokoak dira (14). Diagnostiko guztien laurden batek gutxi gora-behera, metastasi sinkronikoak aurkezten dituzte, hau da, tumore primarioaren diagnostikoarekin batera, metastasiak ere detektatzen dira. Birrikak, hezurak, gibela eta garuna dira metastasiak garatzeko ehun ohikoenak. Are gehiago, tumore lokalizatuak ezabatzeko ebakuntza egin ostean, gaixoen heren batek, metastasi metakronikoak garatzen dituzte (15).

# 1. Sarrera. Introducción

RCCdun pazienteen pronostikoa faktore ezberdinek baldintzatzen dute. Edonola, badaude onarpen zabala duten predikziorako tresnak, tumorearen ezaugarri ezberdinetatik abiatuz, bizi itxaropenaren estimazio bat ahalbideratu eta tratamendurako erabakiak hartzeko erabiltzen direnak (16). Hauen artean ezagunena tumorearen estadioa da, *American Joint Committee on Canceren (AJCC)* TNM sistema delarik erabiliena RCCn (1.5 Irudia) (17).



**1.5 Irudia. RCCaren estadio ezberdinak eta bakoitzaren tratamendurako aukerak.** Estadio baxuetako tumoreak (I eta II) giltzurrunera mugatuta daude eta ez dute tratamendu sistemiko beharrik. Aldiz estadio altuetan (III eta IV), tumoreak inguruko edo urruneko ehunak inbaditu ditu, tratamendu sistemikoa beharrezkoa da eta biziraupenak nabarmen egiten du behera. (\*) Hsieh eta lankideen *Renal Cell Carcinoma* reviewtik ateratako irudiaren egokitzapena (18).

Honela, AJCC estadioak, tumoreak 4 taldetan sailkatzen ditu tumore primarioaren inbasio lokala (T edo pT), gongoil linfatikoen afekzioa (N) eta metastasien existentziaren (M) arabera (1.1. Taula). Sailkapenean gora egin ahala, tumorearen hedapena handiagoa da eta beraz pronostikoa okerragoa.



## 1. Sarrera. Introducció

**1.1. Taula. AJCCko TNM estadioa RCCn ezartzeko sistemaren irizpideak (8. Edizioa).** Estadioa, tumore primarioaren tamaina eta inbasio lokalak, inguruko gongoil linfatikoen zein urruneko ehunen inbasioa kontutan hartuta ezartzen da.

<b>Tumore primarioaren inbasio lokala (T edo pT)</b>	
pTX	Tumore primario baloraezina
pT0	Tumore primarioaren ebidentziarik ez
pT1	Giltzurrunera mugaturiko tumorea, $\leq 7$ cm dimentsio handiengan
pT1a	$\leq 4$ cm-ko tumoreak
pT1b	$>4$ cm baina $\leq 7$ cm-ko tumoreak
pT2	Giltzurrunera mugaturiko tumorea, $\geq 7$ cm dimentsio handiengan
pT2a	$> 7$ cm baina $\leq 10$ cm-ko tumoreak
pT2b	$> 10$ cm-ko tumoreak, giltzurrunera mugatuak
pT3	Odol hodi nagusietara edo giltzurrun inguruko ehunetara hedaturiko tumoreak, baina ez guruin suprarrenal (ipsilateralera), ezta Gerotaren fasziar haratago.
pT3a	Giltzurrun zainera edo honen zaina segmentarioetara hedaturiko tumoreak edo giltzurrunaren inguruko edota giltzurrun sinuko gantzerara hedaturikoak, edota sistema pelbikalizeala inbaditurikoak baina ez Gerotaren fasziar haratago.
pT3b	Kaba zainera diafragmaren azpitik nabarmen hedaturiko tumoreak
pT3c	Kaba zainera diafragmaren gainetik nabarmen hedaturiko tumoreak edo kaba benaren horma inbaditu dutenak
pT4	Gerotaren fasziar haratago inbaditu duten tumoreak (alboko guruin suprarrenal ipsilateralera hedapena barne)
<b>Inguruko gongoil linfatiko inbasioa (N)</b>	
NX	Inguruko gongoil linfatikoen inbasio baloraezina
N0	Inguruko gongoil linfatikoetan metastasirik ez
N1	Metastasiak inguruko gongoil linfatikoen
<b>Metastasiak urruneko ehunetan (M)</b>	
M0	Metastasirik ez
M1	Metastasiak urruneko ehunetan
<b>Estadioa</b>	
I estadioa	T1, N0, M0
II estadioa	T2, N0, M0
III estadioa	T1/T2, N1, M0; T3, N0 edo N1, M0
IV estadioa	T4, edozein N, M0; Edozein T, edozein N, M1

## 1. Sarrera. Introducción

Ohikoena izan arren, estadioa ez da klinikan erabili ohi den tresna pronostiko bakarra. 1982an, Fuhrmanek, tumoreak gradutan sailkatu zituen, tumore-zelulen nukleoaren tamaina, irregulartasuna eta nukleoloen prominentziaren arabera (19). Gradu sailkapen honek bere mugak dituen arren (ez da erabilgarria tumore azpimota guztietan), unibertsalki erabiltzen da RCCren prognosian. 2012an, Patologia Urologikoetarako Erakunde Internazionalak (ingelesezko ISUP), gradu bidezko sailkapena ezartzeko parametroak doitu zituen (20).

Halaber badaude tumoreari atxikitako hainbat ezaugarri pronostikoan zuzenean eragiten dutenak. Esaterako, minbizi zelulen diferentziazio sarkomatoide eta rhabdoidea, biak pronostiko okerrago baten adierazgarri dira (21,22). Antzera, nekrosiaren presentziak pronostiko gaiztoko hainbat faktoreekin korrelazionatzen du (23).

Faktore pronostiko hauen konbinazioz algoritmo eta nomograma ezberdinak sortu dira RCCdun gaixoen pronostikoa optimizatzeko helburuarekin. Modelo hauek tumorearen errekurrentzia, metastasien agerpena edota heriotza iragartzeko tresna erabilgarriak dira eta ondorioz, gaixoaren jarraipen mota edo tratamendu adjubantearen beharra zehazteko erabiltzen dira. Hauen artean esanguratsuenak Kaliforniako Unibertsitateko *UCLA Integrated Staging System* (UISS) eta Mayo Klinikaren *Stage, Size, Grade and Necrosis* (SSIGN) dira (24,25). Aurrenekoak, TNM estadioa, gradua eta *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) *patient performance status*a erabiltzen ditu gaixoak errekurrentziarako arrisku baxu, ertain eta altukoaren artean estratifikatzeko. Bigarrenak aldiz, bere izena osatzen duten parametroak darabilzki eta soilik zelula argien giltzurrun-zelulen kartzinoma (CCRCC) azpimotan aplikatzen da.

### Tratamendua

RCCarentzat tratamendu estandarra kirurgia da, sendatzeko gaitasuna duen bakarra baita eta beraz, bideragarria den kasu guztietan aplikatzen da, izan nefrektomia partzial (PN) zein erradikala (RN) (26). Kirurgia tumorearen estadio klinikoak eta gaixoaren egoera orokorrak baldintzatzen dute. Bideragarria ez den kasuetan, gaixoaren jarraipen aktiboa eta terapia ablatiboak erabiltzen dira, krioterapia eta radiofrentzia bidezko ablazioa kasu (27). Izan ere, RCC ohiko kimioterapia eta erradioterapia tratamenduekiko erresistentea da (28,29).

#### *Kirurgia*

Kirurgia tratamendu ohikoena, nefrektomia erradikala da, hots, giltzurrun osoaren, inguruko gantz eta gongoil linfatikoen eta giltzurrun gaineko guruinaren erauzketa, gaur egun laparoskopia bidez gauzatzen dena (30,31). Hala ere, nefrektomia partzialak, giltzurrunaren parenkima osasuntsua ahal bezain beste mantentzea helburu duenak, erradikalak bezain emaitza onak erakutsi ditu tumore goiztiarretan eta halaber bada ere, (giltzurrun bakarreko gaixoetan, CKDdunetan eta aldebiko tumoreen kasuan esaterako) erabiltzen da (32,33).

Giltzurrun-zelulen kartzinoma metastasikodun (mRCC) gaixoetan tumore primarioaren erauzketak (nefrektomia zitoerreduktiboa), gaixoaren biziraupena luzatzen du, 7,7 hilabetetik 17,1 hilabetera batez beste, tratamendu sistemikoa jasotzen ari diren gaixoetan (34). Halaber, metastasektomiak, hots, metastasien erauzketa kirurgikoak, bideragarria den kasuetan, biziraupena luzatzen du (35).

#### *Terapia gidatuak*

Azken hamarkadan mRCCdun gaixoei zuzendutako hainbat agente terapeutiko eta immunoterapiarako agente bat onartu dira mRCCaren tratamendua aldatuz. Agente terapeutikoei dagokienez, bi taldetan sailka daitezke; batetik angiogenesiaren kontrako terapia edo tirosin kinasa hartzaileen (RTK) inhibitzaileak, diana gisa *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-en seinalizazio bidea dutenak eta bestetik *mammalian target of rapamycin* (mTOR)-en inhibitzaileak.

## 1. Sarrera. Introducción

Aurrenekoen artean daude, sorafenib, sunitinib, pazopanib eta axitinib esaterako. Hain zuzen ere, 2007an argitaratutako lan batek, sunitinibak ordurarteko tratamenduek (interferon- $\alpha$  eta IL-2) baino erantzun eta biziraupen tasa hobekak zituela frogatu zuen (36). Honek sunitiniba lehen lerroko tratamendu estandar gisa kokatu zuen, pazopanib eta bevacizumab/interferon- $\alpha$  konbinazioarekin batera. Tratamendu hauen arazo nagusia tumoreek hauekiko aurkezten duten erresistentzia da, batzuen kasuan berezkoa eta besteetan hartutakoa (37). Honela bigarren lerroko tratamendu gisa, beste RTK inhibitzaile batzuekin batera, everolimus eta temsirolimus mTORen inhibitzaileak erabiltzen dira (38,39). Hauen bitartez, gaixotasuna kontrolatzea lortzen da, 8-9 hilabetez lehen lerroko tratamenduan eta 5-6 hilabetez bigarrenekoan (37–39). Tratamendu hauek bereziki azpimota histologiko ohikoenerako (CCRCC) diseinatuak izan arren, RTKen inhibitzaileak azpimota denetan erabiltzen dira, eraginkortasun mugatuagoa izan arren (40).

Berriki, ikerketa ildo berri bat ireki du immunoterapiarako agenteen generazio berri batek, zeintzuek T zelula inmuunen "*checkpoint*"ak inhibitzen dituzten. Hauen artean nivolumab deritzon antigorputzak eraginkortasun handiagoa erakutsi du bigarren lerroko tratamendu gisa everolimusak baino (41). Gainera, erantzun tasa altuagoa dauka eta baita tolerantzia hobea. Honen edo antzekoen eta VEGFaren aurkako terapien konbinazioa bideragarria dela frogatu da eta mRCCren tratamenduaren oinarri izango da hurrengo urteetan.

### **Etorkizuneko perspektibak**

Tumoreen biologiaren ulermenak eta terapia gidatuen garapenak giltzurrun-zelulen kartzinomaren tratamenduan aurrerapen nabarmenak eragin ditu. Edonola, tumorearen heterogeneotasunak eta tratamenduen aurka garaturiko erresistentziak, emaitza klinikoa baldintzatzen jarraitzen dute. Guzti hau kontutan hartuta, honakoak dira gaitz honekin erlazionaturiko erronka garrantzitsuenak.

## 1. Sarrera. Introducción

### *Arrisku handiko gaixoen detekziorako eta tratamendu egokiaren aukeraketarako biomarkatzaileen garapena*

RCCko hainbat ohiko mutaziok tratamendu espezifikoaren eraginkortasuna iragartzeko gaitasuna erakutsi dute. Esaterako, KDM5C mutaziodun gaixoen sunitinibarekiko erantzuna, everolimusarenarekiko baino bi aldiz hobea da, progresiorik gabeko biziraupena kontutan izanez gero (42). Halaber, jakinda kirurgia osatzailea jasan duten gaixoen %30 inguru berriro erituko direla, fenomeno hau iragartzeko gaitasuna duten biomarkatzaileak oso eraginkorrak lirateke. Hauek guztiak pronostikorako erabiltzen diren algoritmo eta nomogrametara gehitzea, lagungarria litzateke kasuan kasuko tratamendu egokiena aukeratzeko.

### *Terapia berrien garapena eta tratamenduaren optimizazioa*

Inmunoterapiaren arloan zein beste diana batzuen aurka garapenean dauden botika berriek RCCren tratamenduan aurrerapen nabarmenak eragitea espero da. Honela, eta kontuan izanda sendagarri espezifiko hauen konbinazioa bakarrarena baino eraginkorragoa dela, erronka gaixo bakoitzarentzat hoberena den tratamendu erregimena diseinatzea izango da. Tratamenduen toxizitatea ekidin eta hauen aurka garaturiko erresistentzia saihestu eta gainditzea arrakastarako gakoak izango dira.

### 1.1.3 GILTZURRUN-ZELULEN KARTZINOMAREN AZPIMOTA HISTOLOGIKOAK

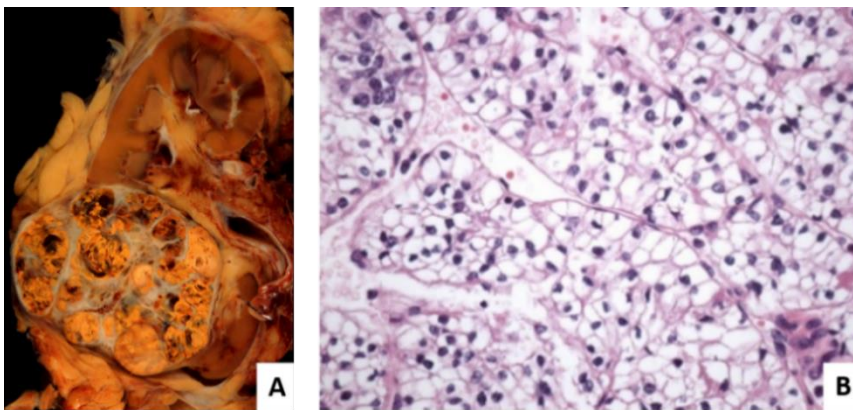
2016. urtean Munduko Osasun Erakundeak argitaratutako gernu aparatuko minbizien sailkapenaren arabera, gutxienez giltzurruneko zelula epitelialetan jatorria duten 15 minbizi mota zenbatu daitezke (43). Ohikoenak "zelula argien giltzurrun-zelulen kartzinoma" (ingeleseko *clear cell renal cell carcinoma* CCRCC), giltzurrun-zelulen kartzinoma papilarra (*papillary renal cell carcinoma* PRCC) eta giltzurruneko zelulen kartzinoma kromofoboa (*chromophobe renal cell carcinoma* ChRCC) dira. Hiru azpimota hauek giltzurrun-zeluletako minbizien %90etik gora batzen dute (44). Lan honetan intzidentzia altueneko hiru azpimotez gain giltzurruneko onkozitoma (*renal oncocitoma* RO) ere aztertu da, giltzurruneko neoplasia onbera ohikoena.

## Zelula argien giltzurrun-zelulen kartzinoma: CCRCC

Giltzurrun-zelulen kartzinomen artean ohikoena da, kasu guztien %70 ingururekin (45). Gainera, pronostiko gaiztoena daukana da, metastasiak jasateko probabilitatea 4 aldiz handiagoa baita azpimota honetan beste bietan baino. Honela, 5 eta 10 urteko biziraupen tasa %71 eta %62koa da hurrenez hurren (46).

Makroskopikoki, ongi mugaturiko tumore biribildu, nodular eta bakartia izan ohi da (1.6 Irudia). Tubulu proximaleko zeluletan du jatorria eta beraz, giltzurrun kortexean kokatzen da, sarri bertatik nabarmenduz. Tumore-zelulen gantz kantitate altuak kolore horixka karakteristikoa ematen dio. Halaber, nekrosia, hemorragiak, eta kaltzifikazioak ohiko ezaugarriak dira.

Mikroskopikoki aldiz, zitoplasma zabal eta argi zelulek eraturiko tumoreak dira, mintz zelular ezberdinez inguratuak (1.6 Irudia). Tumore-zelulak odol-hodi sare batean txertatuta ageri dira eta egitura ezberdinak har ditzakete, solidoa, albeolarra eta azinarra kasu eta hauek sarri nahasita ageri dira (47).



**1.6 Irudia.** CCRCCaren ikuspegi makroskopiko (A) eta mikroskopikoa (H&E) (B). Makroskopikoki, giltzurrunaren beheko poloan kokaturiko 8 cm-ko tumorea ikus daiteke, giltzurrun kortexetik haratago hedatzen dena (A). Hematoxilina-eosina tindaketak tumore-zelulen zitoplasma zabal eta argia ikustea ahalbideratzen du. (\*) A irudia Ed Uthmanek sortutako *Renal Cell Carcinoma* izeneko irudiaren egokitzapena da, *Creative Commons*en domeinu publikorako utzia.

## 1. Sarrera. Introducción

Azpimota histologiko honen patofisiologian von Hippel-Lindau (VHL) tumoreen gene supresoreak berebiziko garrantzia dauka. CCRCCan mutazio arruntena da (48) eta hain da garrantzitsua non bere galera osoa, dela mekanismo genetiko zein epigenetiko bidez, minbizi mota honen garapenean ezinbesteko aitzindari kontsideratzen den (49). VHL genearen galerak, HIF1 $\alpha$  eta HIF2 $\alpha$  hipoxia faktoreen metaketa eragiten du, ehunen oxigenazioa arrunta izan arren. Transkripzio faktore hauen pilaketak angiogenesisia, glikolisia eta apoptosia erregulatzen dituzten geneak aktibatzen dituzte (50). Honek azaltzen du, batetik, CCRCC tumoreak lipido eta glikogenoan aberatsak izatea eta bestetik, tumoreen baskularizazio maila altua eta ondorioz, VEGF itu gisa daukaten tratamenduen eraginkortasuna.

Edonola, VHL genearen galera hutsa ez da nahikoa CCRCC garatzeko. Honela, minbiziaren genomika aztertzeko proiektuek, prebalentzia altuko hainbat mutazio detektatu dituzte, hala nola PBRM1, SETD2, BAP1, KDMC5 eta MTOR geneenak (48). MTOR genearen mutazioak aktibatzaileak izan ohi dira eta tratamenduan seinalizazio bide honen inhibitzaileek duten eraginkortasuna azaltzen dute (51).

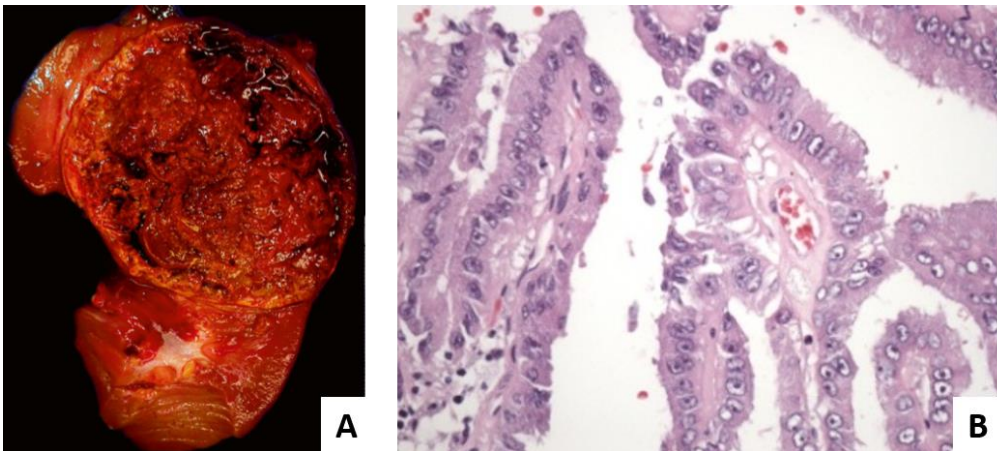
Tumoreen analisi genetiko multiregionalak CCRCCaren izaera heterogenikoa azaleratu eta honen filogenia ulertzen lagundu du. Horrela, VHL genearen mutazioa eta 3p besoaren galera heterozigotikoa gertaera unibertsalak dira tumorean (52). Aldiz gainontzeko mutazio ohikoenek, distribuzio heterogeneoa daukate tumore primario zein metastasien gune ezberdinetan. CCRCC-aren tumore-barneko heterogeneotasun honek gaixotasunaren pronostiko ez-ziurra baldintatzen du (55).

Azken urteetan immunoterapia izaten ari den garapenak minbiziaren tratamendurako estrategia berriak proposatu ditu. Zentzu honetan, azpimarragarria da *The Cancer Genome Atlas* ikerketa programan aztertutako 19 minbizi motatatik, T zelulen infiltrazio maila altuena CCRCCan aurkitu zela (53), immunoterapiak RCCko azpimota honetan eraginkortasun handia izan dezakeela iradokitzen baitu.

## Giltzurrun-zelulen kartzinoma papilarra: PRCC

Nahiz eta CCRCctik urrun, giltzurrun-zelulen kartzinomen artean bigarren azpimota ohikoena da, kasu guztien %18,5 inguru PRCCak direlarik. CCRCcak bezala, nefronako hurbileko hodietan dauka jatorria baina honek baino pronostiko hobea dauka, 5 urteko biziraupen tasa %91n kokatzen delarik (46).

Ongi mugaturiko tumore kortikalak izan ohi dira, sarri kapsula fibrotiko sendoz inguratuak (1.7. Irudia). Hemorragia, nekrosia eta degenerazio zistikoa ezaugarri arruntak dira eta tumore foko ezberdinen agerpena gainontzeko RCC azpimotetan baino ohikoagoa da (45). Mikroskopikoki, egitura papilar eta tubularrek osatzen dute, proportzio ezberdinetan. Nukleo papilarrak geruza zelulabakarrez osatzen dira. Nukleo fibrobaskularrak diagnostiko diferentzialerako gakoak dira, gune pseudopapilarrak tumore azpimota ezberdinetan agertzen baitira. PRCCaren nukleo ezberdinak makrofago apartuz zabalduak ageri ohi dira.



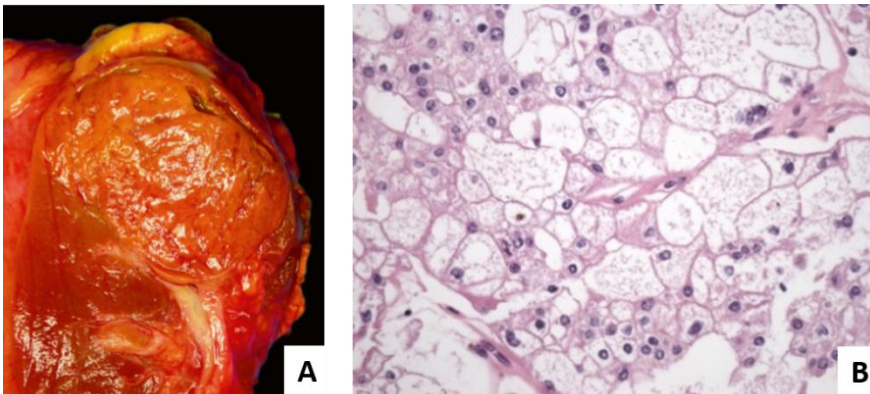
**1.7. Irudia. PRCCaren ikuspegi makroskopiko (A) eta mikroskopikoa (H&E) (B).** Makroskopikoki, ongi mugaturiko tumorea ikus daiteke, foko hemorragiko ugariduna (A). Mikroskopikoki aldiz geruza zelulabakarrez osaturiko egitura papilarrak ikus daitezke (B). (\*) A irudi makroskopikoa, *Essentials of Anatomic Pathology* liburuko *Neoplasms of the kidney* kapitulutik egokitu da.



## Giltzurren-zelulen kartzinoma kromofoboa: ChRCC

Giltzurrun-zelulen kartzinomen artean hirugarrena da intzidentziari dagokionez, diagnostikaturiko kasu guztien %5-7 artean talde honetan sailkatu daitezkelearik (45). Pronostikoari dagokionez, 5 urteko biziraupen portzentaia %88 inguruan kokatzen da, diagnostikoa oro har estadio baxuetan gertatzea arrazoi nagusia delarik (46).

Ongi mugaturiko masa esferiko pseudoenkapsulatuak izan ohi dira, kolore marroi argidunak (1.8. Irudia). Hodi biltzaileetako zelula tartekatuetan du jatorria tumore mota honek. Nekrosia eta hemorragia ezohikoak dira eta tumore handienetan soilik atzematen da orbaindura. Mikroskopikoki, hazkuntza patroia homogeneoa duen arren, tarteka egitura tubularrak bereiztu daitezke.



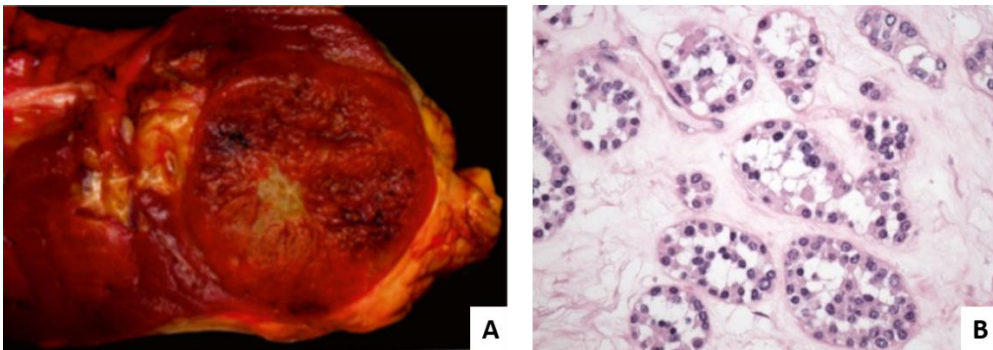
**1.8. Irudia. ChRCCaren ikuspegi makroskopiko (A) eta mikroskopikoa (H&E) (B).** Egitura makroskopikoan masa esferiko marroikarak izan ohi dira (A). Mikroskopikoki aldiz, erraz ezberdindu daitezke zelula klasiko poligonal handiak eta zitoplasma granularreko zelula eosinofiloak. (\*) A irudia, *Essentials of Anatomic Pathology* liburuko *Neoplasms of the kidney* kapitulutik egokitu da.

Bi zelula mota ezberdinek osatzen dituzte ChRCCak, zelula klasikoek eta eosinofilikoek. Aurrenekoak, zelula poligonal handiak dira, mintz plasmatico sendodunak eta mukopolisakaridoz beteriko zitoplasma handia daukate. Eosinofilikoak aldiz, zelula txikiagoak dira, zitoplasma granular dunak eta organuluak nukleo irregularraren inguruan kokatzen dira. Tumorea soilik zelula mota honek osatzen duenean, ChRCCaren aldaera eosinofiliko gisa klasifikatzen da.

## Giltzurruneko onkozitoma: RO

Onkozitoma, hodi biltzaileetako zelula tartekatuetatik eratorritako neoplasia onbera da, giltzurruneko neoplasia epitelial guztien %5 inguru azpimota honetakoak direlarik.

Orokorrean, ongi mugaturiko neoplasia bakartiak izan ohi dira, marroi argi edo kaoba kolorekoak (1.9. Irudia). Orbaingura neoplasia guztien heren batean atzeman daiteke, bereziki tamaina handiena duten neoplasietan. Halaber hemorragia eta nekrosia ezohiko ezaugarriak dira. Mikroskopikoki, zitoplasma granular eta eosinofilo handiko zelula poligonalek osatzen dituzte, mitokondrietan oso aberatsak direnak. Hauek, tubulu, mikrokiste edo habi solidotan antolatzen dira, estroma edematsu hipozelularrean. Nukleo borobil eta uniformeak izan ohi dute, erdian kokaturiko nukleolo nabarmenduna.



1.9. Irudia. ROren ikuspegi makroskopiko (A) eta mikroskopikoa (H&E) (B). Ezkerrean, onkozitoma zirkular bakartia atzeman daiteke, erdiguneko orbain eta guzti. Eskuinean, H&E tindaketak, estroma hipozelularrean tartekaturiko habia solidoak atzeman daitezke. (\*) A irudi makroskopikoa, *Essentials of Anatomic Pathology* liburuko *Neoplasms of the kidney* kapitulutik egokitu da.

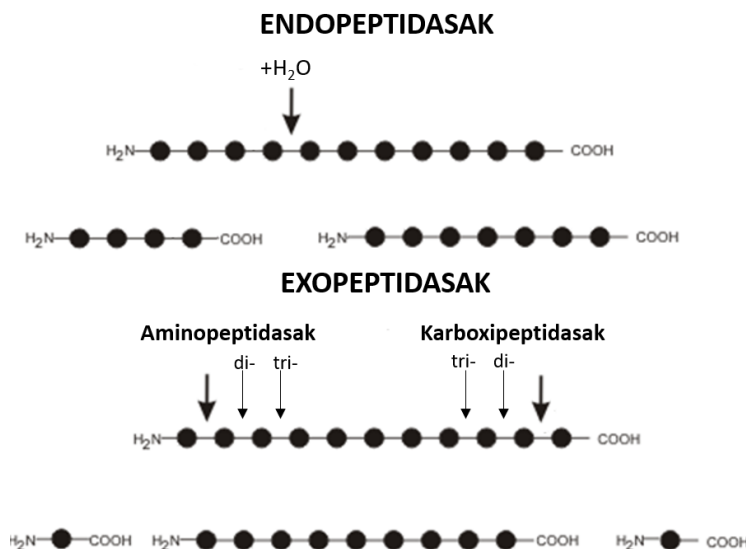
Ezaugarri makroskopiko bereizgarriak dituen arren, onkozitoma RCC azpimota ezberdinetako aldaera eosinofilikoarekin nahastu ohi da, bereziki ChRCCarenarekin. Izan ere, ChRCCK eta ROK hodi biltzaileetako zelula tartekatuetan dute jatorria eta zenbait ezaugarri morfologiko, histologiko eta immunohistokimiko dauzkate amankomunean. Esaterako, bi tumore azpimotatan aurki daitezke zelula tartekatuen ezaugarri diren mikrobikusulak, kopuru ezberdinean bada ere. Halaber, antzeko gene espresio patroia deskribatu da bi tumore azpimota hauetan (54).

## 1. Sarrera. Introducción

Gainera, ChRCC eta RO tumoreen ezaugarri histomorfologikoak dituzten tumore hibridoak ere deskribatu dira, *hybrid oncocytic/chromophobe renal tumors* (HOCT) bezala izendatu direnak (55). Hori dela eta, bi azpimota hauek ezberdintzea ahalbideratzen duen tresnen bilaketak ikergai izaten jarraitzen du (56). Are gehiago, ChRCC eta RO espektro morfologiko beraren bi ertzak direla proposatu izan da, hau da, ChRCCa ROk denboran zehar jasandako gaiztotze prozesuaren emaitza dela (57).

## 1.2 PEPTIDASAK

NC-IUBMBren (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) arabera, peptidasa gisa ezagutzen da lotura peptidikoa hidrolizatzeko gaitasuna daukan edozein entzima. Transkribatutako gene guztien %2k peptidasak kodifikatzen dituzte eta ondorioz, proteina funtzionalen talde handienetakoa osatzen dute. Gaur egun ehundaka peptidasa ezagutzen dira exopeptidasa eta endopeptidasak zenbatuz gero (1.10. Irudia). Aurrenekoek amino zein karboxi terminaletako -aminopeptidasak eta karboxipeptidasak hurrenez hurren- aminoazido bat eta hiru aminoazido artean hidrolizatzen dituzte. Endopeptidasek aldiz aminoazido katearen barnealdeko loturak hidrolizatzen dituzte eta hidrolisi mekanismoaren arabera, 6 taldetan sailkatzen dira: endopeptidasa aspartiko (A) eta glutamikoak (G), zisteina (C), serina (S) eta treonina (T) endopeptidasak eta metaloendopeptidasak (M). Talde hauetan sailka ezin daitezken hainbat peptidasa ere badaude (U) (58).



**1.10. Irudia. Peptidasa motak hidrolizatzen duten lotura peptidikoaren kokapenaren arabera.** Endopeptidasek, aminoazido sekuentziaren barnealdean eragiten dute, aldiz exopeptidasek amino zein karboxi muturretan. Sekuentziatik bi edo hiru aminoazido erauzten dituzten kasuetan di eta tripeptidasa izenak hartzen dituzte. (\*) Boumphreyfrek sortutako *Peptidase Action* izeneko irudiaren egokitzapena da, eta *Creative Commons*en CC-BY-3.0 lizentziarekin erabil daiteke.

## 1. Sarrera. Introducción

Azken hamarkadetan peptidasen eta hauen ezaugarrien ezagutzan izandako aurrerapenak, beraien substratu eta inhibitzaileekin batera, biologian, medikuntzan eta bioteknologian duten garrantzia nabarmendu dute. Honela, entzima proteolitikoen sailkapen eta izendatze sistemak berebiziko garrantzia hartu du. Hierarkikoki, peptidasak espezie, familia, klan eta mota katalitikoaren arabera sailkatzen dira (59). Espezieek, substratu espezifiko eta funtzio biologiko bertsuak dituzten peptidasak batzen dituzte. Halaber, hauek, familiatan elkartzen dira, aminoazido sekuentzian duten homologiaren arabera. Klanak ordea, aitzindari amankomun batetik eratorritako peptidasen familiek osatzen dituzte. Amaitzeko, klanak goian aipaturiko mota katalitiko ezberdineko taldeetan sailkatzen dira (A, G, C, S, T, M eta U). Irizpide hauek kontutan hartuz, peptidasa bakoitzak identifikatzaile espezifiko bat dauka, familiaren izena (adbz. M5) eta hiru digitu zenbakien sekuentziaz osatua (adbz M5.003) (60).

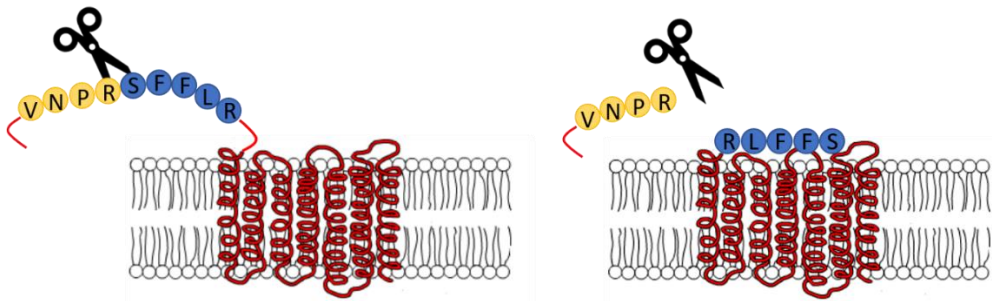
### 1.2.1 PEPTIDASEN FUNTZIOAK

Peptidasak zelulen mintzetan zein barne eta kanpo inguruetan aurkitu daitezken entzima multifuntzionalak dira. Peptido bioaktiboekin eta hauek lotzen dituzten hartzaileekin batera sistema peptidikoak osatzen dituzte. Mintzera ainguraturiko peptidasa, honetatik askatu daiteke *shedding* deritzon mekanismoaren bitartez, hau da, beste proteasa batek mintzera lotzen duen domeinutik askatuta. Horrela, peptidasa bera mintzera ainguratuta nahiz gorputzeko fluido ezberdinetan aurkitu daiteke, egoera solugarrian. Hala ere, gorputzeko fluidoetan aurki daitezken peptidasek jatorri anitza dutela onartzen da.

Peptidasek organismoen biziraupenerako ezinbestekoak diren hainbat prozesu biologiko erregulatzen dituzte, ziklo zelularra, erantzun immunologikoa, zelulen apoptosia eta proteinen degradazioa beste hainbaten artean (61). Horretarako, peptidasek beren aktibitatearen menpekoak zein honekiko independenteak diren mekanismoak erabiltzen dituzte. Mekanismo ezagunena peptido bioaktiboen eraldaketa da. Hidrolisi bidez, berauen funtzioaren aktibazio,

## 1. Sarrera. Introducción

inhibizioa edo modulazioa eragin ditzakete eta ondorioz seinalizazio zelularrean eragin, zenbait zitokina, hormona edo neuropeptidorekin ikusi den bezala. Gainera, ez dute soilik komunikazio zelularrekin erlazionaturiko peptidoengan eragiten, baita esaterako zelulaz kanpoko matrizea (ECM) eratzen duten osagaietan. Honen erakusle argienak matrizeko metaloproteinasak dira, zeintzuk zelulaz kanpoko matrizean eraginez zelulen migrazioa gidatu dezaketen (62). Are gehiago, zelula-zelula eta hauen eta zelulaz kanpoko matrizearen arteko atxikitzea erregulatzen duten molekuletan ere eragiten dute bi fenomenoak erregulatuz (63). Halaber, hainbat serina proteasek *Protease-activated receptor* (PAR) deritzen hartzaileengan eragiten dute, hauen N-terminalaren proteolisiaren bitartez, seinalizazioa aktibatzen duen N-terminal berria desmaskaratzen dutelarik (1.11. Irudia)(64).



**1.11. Irudia. Proteasek aktibatutako hartzaileen mekanismoaren irudikapena.** Proteasak, aktibitate entzimatikotik bidez, N-terminal extrazelularreko aminoazido sekuentzia bat ezabatu eta hartzaileari lotzen zaion N-terminal berria azaleratzen du. (\*) Bensaccountek sortutako 7 TM Receptors izeneko iruditik abiatuta sorturiko irudia, *Creative Commons*en CC-BY-3.0 lizentziarekin erabil daiteke.

Hala ere, zenbait prozesu fisio-patologikotan, peptidasen eragina beren aktibitate entzimatikotik haratago doala frogatu da (65). Esaterako, proteina ezberdinekin interakzionatuz ere jarduten dute. Hala, MALT1 proteasak berebiziko garrantzia dauka T zelulen aktibazio prozesuan, non beste proteinekin lotzeko daukan domeinu ezberdinei esker, *scaffold* edo aldamiu proteina gisa jokatzen duen. Adhesio molekula gisa jokatzen duen beste peptidasa talde bat ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) familiarena da (66). Gainera, zelulen mintzera ainguratutako proteasek, beste hainbat proteinekin interakzionatuz, seinalizazio bide ezberdinak ere aktibatu ditzakete, hartzaile funtzioa burutuz. Hauen artean

## 1. Sarrera. Introducción

ezagunenetarikoa, *membrane type 1-matrix metalloproteinase* (MT1-MMP) da, zeinak mitogenoek aktibaturiko proteina kinasen/zelulaz kanpoko seinaleek erregulaturiko (MAPK/ERK) bidearen bitartez, zelulen hainbat ezaugarri erregulatu ditzaken (67).

Peptidasek zelulen funtzionamendu egokian betetzen dituzten funtzioak kontutan hartuz arrazoizkoa da sistema peptidikoen alterazioak hainbat egoera patologiko sostengatzea. Hala nola, eritasun kardiobaskular eta hanturazkoak, gaixotasun neurodegeneratiboak eta minbizia. Hori dela eta, peptidasak tratamendu ezberdinen iturri eta diagnostikorako zein pronostikorako tresna gisa potentzial handia duten molekulak dira (68). Are gehiago, zenbait peptidasen inhibitzaileak gaitz ezberdinen ohiko terapia farmakologikoan erabiltzen dira. Honen adibide esanguratsua, errenina-angiotentsina sistemaren inhibitzaileena da, zeinak presio arteriala kontrolatzen duen eta ondorioz bere blokeatzaileak hipertentsioaren tratamenduan erabiltzen dira (69). Era berean, dipeptidil peptidasa IVk (DPPIV/CD26), glucagon like peptide (GLP-1), insulinararen produkzioa estimulatzen duen hormona, hidrolizatzen du. Honela, DPPIV/CD26ren inhibitzaileak edo gliptinak, diabetesaren tratamenduan erabiltzen dira (70,71).

### 1.2.2 PEPTIDASAK ETA MINBIZIA

Peptidasek minbiziaren garapenean daukaten eginkizunaren ikuspuntua nabarmen aldatu da bi kontzeptuen ezagutzan sakondu ahala. Hasiera batean peptidasen funtzioa migrazio eta inbasioa ahalbidetzera mugatzen zela uste zen, matrice extrazelularrean eraginez. Aldiz, gaur egun ezaguna da entzima hauek minbiziaren garapenearen etapa ezberdinetan parte hartzen dutela.

Minbiziarena, mutazio ezberdinen metaketaren eraginez, kontrolik gabeko hazkuntza zelularra garatu duten gaixotasunen taldea da. Ezaguna da genetikoki eraldatutako zelula hauek hainbat gaitasun bereganatzen dituztela, *hallmarks of cancer* deritzenak, tumorea garatu eta inguruko nahiz urruneko ehunak inbaditzeko

## 1. Sarrera. Introducción

(72). Ezaugarri hauek eskuratzeko, ezinbestekoa da tumore-zelulen eta inguruko estromako zelulen arteko komunikazioa, tumore ingurune inflamatariora ezartzeko. Peptidasek, berebiziko garrantzia dute komunikazio honetan, hazkuntza faktore, zitokina eta matrize faktore ezberdinen aktibitate biologikoa erregulatuz tumorearen garapena gidatzen baitute (73). Ez hori bakarrik, hauek eragindako seinalizazio bideak erregulatu eta komunikatzen dituzte, zelulen erantzuna baldintzatuz.

Mutazio metaketaren ondorioz tumoreen aldeko geneen eta tumore-ezabatzaileen artean sorturiko desorekak proteasetan ere eragiten du. Esaterako, seinalizazio intrazelularrean erregulatzailer gisa jarduten duten peptidasen funtzio galera minbizi ezberdinetan deskribatu da (74). Zelulen mintzean zein hauetatik kanpo kokatzen diren proteasen espresioa eta aktibitatea ere aldatuta ageri dira. Gainera, aldaketa hauek ehun eta tumore motaren araberakoak direla frogatu da *in vivo* ikerketen bitartez (75).

Honegatik guztiagatik, peptidasak itu erakargarriak dira minbiziaren tratamendurako farmakoen bilaketan. Honela, estrategia ezberdinak diseinatu dira, ez soilik aktibitate entzimatikoa inhibituz, baita tumoreetan gainespresaturiko proteasen aktibitatea prodroga zitotoxikoak aktibatzeke aprobetxatuz (76). Hala ere, peptidasen inhibizioak arrakasta mugatua izan du tumoreen aurkako tratamenduan (77). Honen erakusle argiena matrizeko metaloproteinasak (MMP) dira. Minbiziaren garapenean daukaten garrantzia ezagutu eta hauen inhibizioak fase preklinikoetan emaitza ona eman arren, fase klinikoan ez dute eraginkortasunik erakutsi, neurri handi batean MMP ezberdinen arteko selektibotasun ezaren ondorioz (78,79). Aldiz proteasoma inhibitzen duen Bortezomib, mieloma multiplearen tratamendurako erabiltzen da 2003az geroztik, proteina proapoptotikoen degradazioa inhibituz eta tumore-zelulen heriotza eraginez (80).



## 1. Sarrera. Introducción

Edonola, peptidasek minbiziaren biologian duten espresio aldaketa oso erabilia izan da klinikan, tratamendurako ez bada ere, bai tresna diagnostiko edo pronostiko bezala. Adibide argiena, *prostate-specific antigen* (PSA)rena da, prostatako minbiziaren diagnostikorako tresna erabiliena, serina proteasa bat da (81). Ez da hau adibide bakarra; *urokinase plasminogen activator* sistemako osagaiak, entzima bera (serina proteasa bat), hartzailea eta inhibitzailea, bularreko minbizian tresna pronostiko eta diagnostiko gisa erabiltzen dira eta beren erabilera beste hainbat tumoretara zabaltzea proposatu da (82). Zenbait zisteina peptidasa eta aurretik aipaturiko DPPIV/CD26 ere, biomarkatzaile gisa erabiliak dira (75,83). NEP/CD10en espresio bera, beste hainbaten artean giltzurrun-zelulen kartzinoman erabilia da, CCRCC eosinofiloak ChRCC eta RO eosinofiloetatik bereizteko (84).

Hori dela eta, tesi proiektu honetan errenina-angiotentsina sistema peptidikoak eta FAP $\alpha$  peptidasak giltzurrun-zelulen kartzinomaren biologian daukaten funtzioa aztertzen da, pronostikorako, diagnostikorako zein tratamendurako jomuga gisa izan dezaketen potentziala ikertzeko.

## 1.3 ERRENINA-ANGIOTENTSINA SISTEMA (RAS)

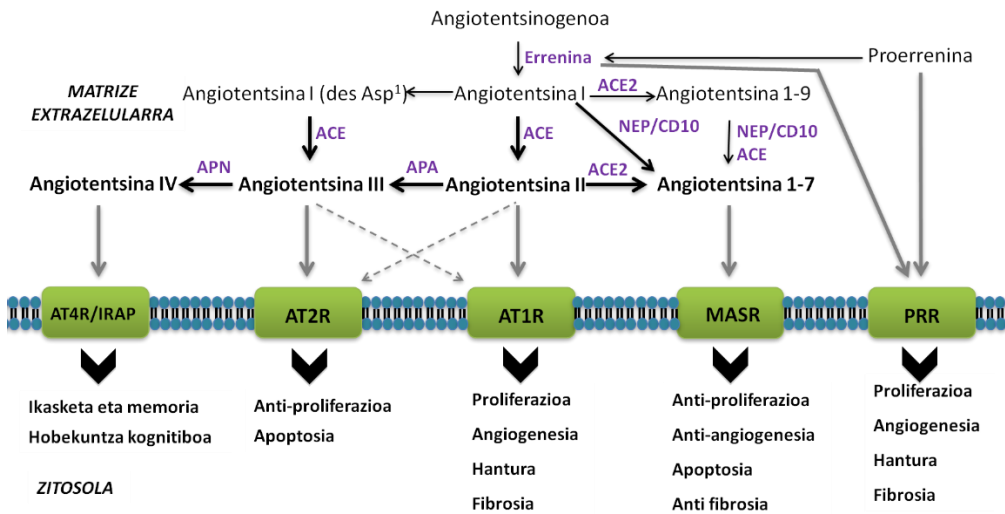
Errenina-angiotentsina sistemaren ezagutza asko aldatu da 1898an Tigerstedt eta Bergmanek errenina deskubritu zutenetik. Hasiera batean presio arteriala eta elektrolito eta fluidoaren homeostasia erregulatzen zuen sistema endokrino zirkulatorio gisa deskribatu zena, gaur egun hori eta askoz gehiago da. RASko osagaiak ehun ezberdinetan deskribatu dira eta honek, RAS lokalen (IRAS) sorrera ekarri du (85). Are gehiago, zelulen barneko angiotentsina II-aren sintesiak, RAS intrazelularren existentzia ere iradoki du (86).

### 1.3.1 EGITURA ETA FUNTZIOA

XX. mendean zehar eta XXI. mende hasieran RASren eskema osatuz joan da, hartzaille, entzima eta peptido bioaktiboz osaturiko sarea eratuz. 1930eko hamarkadan Buenos Airesen eta Indianapolisen simultaneoki garaturiko ikerketetan, erreninaren akzioz sorturiko molekula basoaktibo bana deskribatu zuten, hipertentsina eta angiotonina gisa izendatu zituztenak hurrenez hurren. Era berean, errenina sistemaren izaera entzimatikoa (hipertentsinasak) eta hipertentsinaren izaera peptidikoa ere deskribatu ziren (87). 1957an bi ikerketa taldeetako buruek *Sciencen* argitaraturiko oharrean, bi izenen baturatik eratorritako angiotentsina izena onartu zuten peptido bioaktiboarentzat, angiotentsinogenoa aitzindariarentzat eta angiotentsinasak entzimentzat (88). Honela, 50eko hamarkada erdialderako RASaren ardatz klasikoa deskribatuta zegoen: Angiotensinogenoa /Errenina/Angiotentsina I (Ang I)/Angiotentsinaren entzima bihurtzailea (ACE) /Angiotentsina II (Ang II)/AT1R osatuta. Ang II sintetikoaren erabilerak RASaren funtzioen inguruko ikerketa ahalbideratu zuen hurrengo hogeitun urteetan zehar. Honela, RAS hipertentsioaren eta beste hainbat prozesuren garapenean zeukan rola inguruko eztabaida ACEren inhibitzaileen garapenak argitu zuten 70eko hamarkadaren amaieran (89). Are gehiago 90eko hamarkadaren hasieran angiotentsina II-ren 1 eta 2 motako hartzailleak, AT1R eta AT2R hurrenez hurren, sekuentziatu eta hauen aurkako antagonista espezifikoak garatu ostean (90).

# 1. Sarrera. Introducción

Mende berriaren hasierarekin batera angiotentsinaren entzima bihurtzailearen entzima homologo bat deskribatu zen, angiotentsinaren entzima bihurtzailea 2 (ACE2) moduan izendatu zena (91). Honek, angiotentsina II hidrolizatu eta angiotentsina 1-7 peptidoa sortzen du, zeinak Mas1 hartzailerearen bitartez, Ang II-ak AT1 hartzailerearen bitartez eragindako efektua antagonizatzen duen. Peptido bioaktibo, entzima eta hartzailere berriek RASn jokatzeko duten rola ezagutu ahal da, eskema osatuz joan da (1.12. Irudia).



1.12. Irudia. Errenina-angiotentsina sistemaren (RAS) eskema orokorra eta ardatz bakoitzak maila lokalean eragiten dituen funtzio klasikoak. Ardatzen arteko orekak prozesu fisiologikoen erregulazio zuzena ahalbideratzen du.

Honela, gaur egungo RAS gutxienez bost ardatz ezberdinek osatzen dute (92):

## Ang I/ACE/Ang II/AT1R ardatza

Angiotentsina II RASko peptido bioaktibo nagusia da eta AT1R nahiz AT2R hartzailereei lotu dakeiken arren, AT1R bidezko seinalizazioz garatzen ditu bere funtzio nagusiak. AT1R *G protein coupled receptor (GPCR)* motako hartzailere da eta seinalizazio bide ezberdinak aktibatzen ditu. Esaterako, DAG/IP3 bidez Ca<sup>2+</sup> intrazelularren mobilizazioa eragiten du, baina baita MAPK, PI3K, JNK, JAK/STAT bideen aktibazioa eta RTK hartzailereen trans-aktibazioa (93).

### **Ang II/ACE2/Ang 1-7/Mas1 ardatza**

Ardatz honen aktibazioa, oro har, Ang II/AT1R ardatzaren funtzio fisiologiko zein patologikoen aurkako efektuarekin erlazionatu da. Honela, Mas1 hartzaileak, hau ere GPCR bat, MAPK eta COX-2 bideen inhibizioz zein NO/cGMP bidearen aktibazioz Ang II/AT1Rren eragina orekatzen du. Edonola, ardatz honen efektua ez da unibertsala eta zenbait kasutan Ang II/AT1R ardatzaren antzeko efektuak ere egotzi zaizkio (94).

### **Ang II/APA/Ang III/AT2R ardatza**

Ang II-k bezala Ang III-k ere AT1R zein AT2R hartzaileak lotzeko gaitasuna erakutsi duen arren, berriki AT2R hartzailearen estekatzaile nagusia dela frogatu da, behintzat giltzurrunean. Honela AT2R bidezko seinalizazioak, batez ere NO/cGMP bitartez ematen denak, Ang 1-7/Mas1 ardatzarekin batera, ardatz klasikoaren efektuen aurkako “babes-sarea” osatzen du (92).

### **Ang III/APN/Ang IV/IRAP ardatza**

Egun, RASren ardatzik ezezagunena da eta bere funtzio nagusia ikasketa eta memoria prozesuen baitan kokatzen da. Halaber, hurbileko tubuluetako glukosaren garraioarekin ere erlazionatu da. Aipagarria da baita ere Ang IV peptidoa AT1 hartzailearen bidezko seinalizazioa aktibatzeke gai dela (94).

### **Proerrenina/errenina/Proerrenina-errenina hartzailea**

Proerrenina-errenina hartzaileak (PRR) mintza behin zeharkatzen duen domeinu bakarra dauka eta 350 aminoazidok osatzen dute. Ez soilik errenina, baizik eta proerrenina aitzindaria ere espezifikoki lotzeko gunea dauka. Honen eraginez, MAPK Erk1/2 seinalizazio bidearen aktibazioa eragiten du eta zeharka beste batzuen ere bai. Bere funtzio fisiologikoak, oro har, Ang II/AT1R ardatzak eragindakoekin lerrokatzen dira (92).

Edonola, RASren inguruko ezagutzak aurrera jarraitzen du eta osagai berriak deskribatu dira azken urteetan (95).

## 1. Sarrera. Introducción

RAS endokrinoaren funtzioa aski ezaguna da; presio arterial edo sodio kloruro kontzentrazio baxuek nahiz sistema nerbioso sinpatikoaren aktibazioak estimulaturik, giltzurruneko zelula juxtaglomerularrek errenina aktibatu eta zirkulaziora jariatzen dute. Bertan, gibelak jariaturiko angiotensinogenoa Ang I bihurtzen du, zein biriketan, kapilareetako endotelio-zeluletan eta baita giltzurrunetako zelula epitelialetan Ang II bihurtuko den, ACEren aktibitate entzimatiakoaren eraginez. Ang II-ak AT1R hartzaiaren bitartez, odol hodian uzkurdua eragiten du hauen muskulu leunaren konstriktzioz. Halaber, giltzurrunetako guriak estimulatu ditu, aldosterona jariatzen dezaten. Honek sodio/potasio homeostasia erregulatzen du giltzurrunetako hurbileko hodian sodioaren birxurgapena bultzatuz. RAS hipotalamoan ere eragiten du egarri sententzia eraginez. Mekanismo hauen eta beste batzuen bitartez, RAS odol bolumena, eta presioa erregulatzen ditu (96). RASren desorekek arazo kardiobaskularrak, hipertentsioa eta giltzurruneko eritasunak eragin ditzake eta horregatik sistema honen inhibitzaileak hipertentsioaren zein giltzurruneko hainbat eritasun kronikoren (CKD) tratamenduan farmako erabilienetarikoak dira (97).

Edonola, presio arteriala baldintza fisiologikoetan mantendu ahal izateko, Ang II-ren sintesia bezain garrantzitsua da honen degradazioa. ACE2 eta Aminopeptidasa A (APA) dira Ang II-ren hidrolizatzaile nagusiak, eta Ang 1-7 eta Ang III peptidoak ematen dituzte produktu gisa hurrenez hurren. Hauek, metabolito hutsak izateaz haratago, peptido bioaktibo izaten jarraitzen dute eta efektu espezifikokoak eragiten dituzte beren hartzaiaren bitartez. Are gehiago, Ang II/ACE2/Ang 1-7/Mas1 eta Ang II/APA/Ang III/AT2R ardatzek, RASren ardatz klasikoaren eragin kaltegarria orekatzen dute, honen eta Proerrenina/errenina/PRR ardatzaren aurkako efektuak bultzatuz (92).

### 1.3.2 RAS LOKALAK (IRAS): FISILOGIA ETA PATOLOGIA

Berriki argitaraturiko *review* batean, homeostasi eta patologiarako nonahiko sistema gisa deskribatzen dute errenina-angiotentsina sistema (98). Izan ere, organismoaren homeostasirako ezinbestekoak diren funtzioak erregulatzen ditu eta sistemaren alterazioak hainbat eritasunetan antzeman dira. Ondorioz, RAS*k* ikerketa gai izaten jarraitzen du, aipaturiko ardatzek egoera fisiopatologiko ezberdinetan duten rola ezagutzatratamendurako erabilgarri izan daitezkelakoan.

RAS sistemako osagaiak beren funtzio endokrinoarekin erlaziorik ez zuten ehunetan detektatzeak *RAS lokalak edo ehuneko RAS* deritzenen aurkikuntza eragin zuen. Oro har, seinalizazio autokrino, parakrino eta intrakrino bidez, zenbait funtzio erregulatzen dituzte, zelulen hazkuntza, diferentziazioa eta apoptosia kasu (85,86). Gaur egun giza organismoko ehun ugarietan deskribatu dira IRASak, hala nola bihotzean, garunean, ugalketa eta digestio ehunetan, nerbio sisteman eta baita giltzurrunetan ere. RAS lokal hauek, RAS zirkulatorioarekin elkarrekintzan jardunez garatu ditzakete beren funtzioak, bihotzean eta giltzurrunetan gertatzen den bezala, edota aldiz era autonomoan, garunean bezala. Bien eragina osagarria izan ohi da eta ehun ezberdinen funtzio fisiologikoak garatzeko erregulatuzaile garrantzitsuak dira.

Zelula zein ehunen fisiologian daukaten garrantzia kontutan izanda ez da harrizkoa RASren asaldurek egoera patologiko ezberdinei bide ematea. Izan ere, ehunen hanturan, fibrosian eta beste hainbat prozesu kaltegarritan parte hartzen dute (99). Ondorioz, RAS lokalak izaera guztiz ezberdineko eritasunekin erlazionatu dira. Hauen artean aurkitzen dira Parkinsona eta Alzheimerre bezalako gaixotasun neurodegeneratiboak (100), antzutasuna eta erreprodukzio organoekin erlazionaturiko hainbat gaixotasun (101), gibekeko eritasun kronikoak (102) eta baita minbizia ere (103). Hauetan guztietan RAS ardatzen desoreka batek Ang II-ren seinalizazioa areagotuz gaixotasunaren garapena ahalbideratzen du (100,101,103,104).

## 1. Sarrera. Introducción

Hori dela eta RAS sistema mota ezberdinetako eritasunen tratamendurako iturri gisa proposatu da (105). RASren inhibitzaileak giltzurruneko gaixotasun kronikoen tratamenduan oso erabiliak dira, honen fase terminalerako garapena geldotzen baitute, eragindako efektu antihipertentsiboez haratago (106). Are gehiago, RASaren blokeoak diabetes mellitus zein hipertentsiodun gaixoek CKDak garatzea ekidin dezakela proposatu da, ikusitako emaitzak kontrajarriak diren arren (106,107).

Gainera, RASren eskema berriak, tratamendu potentzialen aukera Ang I/ACE/Ang II/AT1R ardatz klasikoaren inhibizioetik haratago zabaltzen du, honen efektu kaltegarrien inhibizioaz gain, ardatz babesgarrien agonismoa tresna terapeutiko erabilgarri gisa proposatu delarik (92,99).

### 1.3.3 RAS ETA MINBIZIA

Minbizi zelulek egoera fisiologikoan homeostasia mantentzen duten sistema erregulatuak bereganatzen dituzte beraien garapenerako. Errenina-angiotentsina sistema ez da salbuespena. XX. mende amaieran argitaraturiko ikerketa erretrospektibo batean, ACEren inhibitzaileek minbiziaren jasateko arriskua gutxitzeko gaitasuna daukatela iradokitzen zen (108). Gainera, hipertentsioaren aurka erabiltzen diren gainontzeko tratamenduek ez zuten horrelako abantailarik erakutsi, efektua, presio arterialaren gutxitzean baino RASren inhibizioan kokatuz.

Honek eta aurrerago garaturiko antzeko ikerketek RAS lokalek tokian tokiko minbizian daukaten rola eztabaidagai bihurtu zuten, gaur eguneraino dirauen ikerketa lehen berri bat zabaltzen. Honela, meta-analisi bidezko azterketa epidemiologikoen, RASren inhibitzaileek ez soilik minbiziaren jasateko arriskuan baita honen errekurritzean eta gaixoen biziraupenean ere eragin onuragarria daukatela frogatu dute (109–112). Hala ere, eragin hau zenbait ezaugarri baldintzatzen dute. Honela, biziraupenaren hobekuntza handiagoa da angiotentsina II hartzaileen blokeatzaileen (ARB) kasuan ACEren inhibitzaileetan (iACE) baino (112). Gainera, emaitzak ezberdinak dira tumore motaren arabera. Honela, kolon eta ondesteko

## 1. Sarrera. Introducción

minbizian, pankreakoan, prostatakoan eta gernu aparatuko hodietakoetan biziraupen orokorra altuagoa da RAS blokeatzaileak hartzen dituzten gaixoetan. Ez ordea, esaterako, bularreko minbizidun pazienteetan (111,112).

Antzera, RASko osagaien geneen polimorfismoak, batez ere ACErenak, minbizia jasateko arriskuarekin erlazionatu dira. Honela, ACEren odol eta ehun kantitatean eragiten duen (I/D) polimorfismoaren kasuan, zeinetan D/D genotipodunek I/I-dunek baino bi aldiz ACE gehiago daukaten, aurreneko genotipoa edo I/D heterozigotikoa hainbat minbizi egoerarekin erlazionatu dira, minbizi gastrikoarekin edo prostatakoarekin esaterako (113,114).

Bestalde, hainbat ikerketek RASko osagaien espresioa minbizi egoeratan aldatuta ageri dela baieztatu dute. Orokorrean, tumoreen aldeko ardatzetako osagaiak Errenina-ProErrenina eta batez ere ACE/Ang II/AT1R ardatza gainespresatuta ageri dira tumore ezberdinetan, endometrioan, maskurikoan, prostatakoan eta giltzurrunekoan esaterako eta zenbait kasutan pronostiko gaiztoarekin erlazionatu dira bularrekoan eta laringekoan kasu (115–120). Aldiz, ACE2/Ang 1-7/Mas1 ardatzeko partaideen adierazpena, orokorrean, jaitsi egiten da. Hala deskribatu da ACE2rekin gibeledu zelulen kartzinoman eta pankreakoan esaterako eta baita Mas1 hartzailearekin bularretako hodietako kartzinoma inbaditzailean (121–123). Mas1 ordea koloneko minbizian gainespresatuta ikusi da (124).

Hauekin batera, *in vitro* zein *in vivo* garaturiko esperimenduek RAS tumore biologian daukan rolari buruzko informazioa osatu dute. Honela, sistema hau minbizi zelulek garatzen dituzten ezaugarri bereizgarri edo *hallmarkekin* estuki erlazionaturik dagoela frogatu da (1.13. Irudia) (93,103).



### **Proliferazio seinaleen mantentzea eta hazkuntza inhibitzeko seinaleekiko desentsibilizazioa**

RASk proliferazioan duen eragina luze ikertu da. Honela, Ang II-ren AT1R bidezko seinalizazioak zelulen mitosia bultzatzen du tumore zein estomako zeluletan eraginez eta baita zeharka endotelio-zelulen hazkuntzaren bitartez (93). Efektu hau, beste hainbat artean, urdaileko minbizian, gibelakoan, bularrekoan zein prostatakokoan deskribatu da (125–128) eta seinalizazioarako bide zelularrak ere ezagunak dira, MAPK eta PI3K eta  $Ca^{2+}$  intrazelularrena kasu. Berriki, Ang II/ACE konplexuak, zelulan barneratu eta nukleora translokaturaz proliferazioa bultzatzeko gaitasuna daukala ikusi da (129).

Alderantziz, Ang II-k AT2R bidez, proliferazioaren kontrako propietateak garatzen ditu (130,131). Honela, minbizi ezberdinetan bi ardatz hauetako osagaiek jasaten duten espresio galera hazkuntza inhibitzeko seinaleak gainditzeko mekanismo gisa uler daiteke. Esaterako, ACE2ren adierazpenaren murrizketak, angiotentsina II peptidoaren gainespresioarekin korrelazionatzen du eta zelulen proliferazioa areagotzen du pankreako minbizian (122).

### **Apoptosia saihestea**

Proliferazioan ikusirikoari jarraiki, AT1R bidezko seinalizazioak minbizi zelulen biziraupena sustatzen du, gutxienez, bi seinalizazio bide ezberdinetatik. Batetik NF- $\kappa$ B eta honen seinalizazioz sorturiko BCL-XL eta survivin apoptosiaren aurkako proteinen bitartez eta baita PI3K-Akt bidezko kaspasen inhibizioz (132,133). Are gehiago, AT1R hartzailearen antagonistak agente apoptotiko gisa deskribatu dira (134). Halaber, AT2R hartzailearen aktibazioak tumore mota ezberdinetan apoptosia eragiten duela deskribatu da (135,136). Ang 1-7/Mas ardatzak ere apoptosia bultzatzen du hainbat minbizitan (137).

### **Angiogenesiaren indukzioa**

RASk tumoreetako odol hodi berrien sorreran daukan garrantzia sakonki aztertu da, oso erlazionatua baitago tumorearen garapenarekin eta baita honi atxikitutako inflamazioarekin ere. Honela, Ang II-k angiogenesiaren aldeko faktore ezberdinen espresioa sustatzen duela deskribatu da, tartean VEGF, AT1R hartzaillearen inhibizioz blokeatzen dena (138,139). AT2R hartzaillearen rola ez da hain argia, izan ere, hainbat minbizi motatan angiogenesia inhibitzeko gaitasuna erakutsi arren (131,135) efektu guztiz antagonikoak ere deskribatu baitira (140). Mas1 hartzaillearen tumoreen aurkako efektua, hein handi batean, bere angiogenesiaren aurkako efektuari atxikitu zaio (137,141,142). Aipatzekoa da halaber, RASko peptido aitzindariak, angiotensinogenoak, efektu antiangiogenikoa daukala (143).

### **Migrazioa, inbasioa eta metastasien garapena**

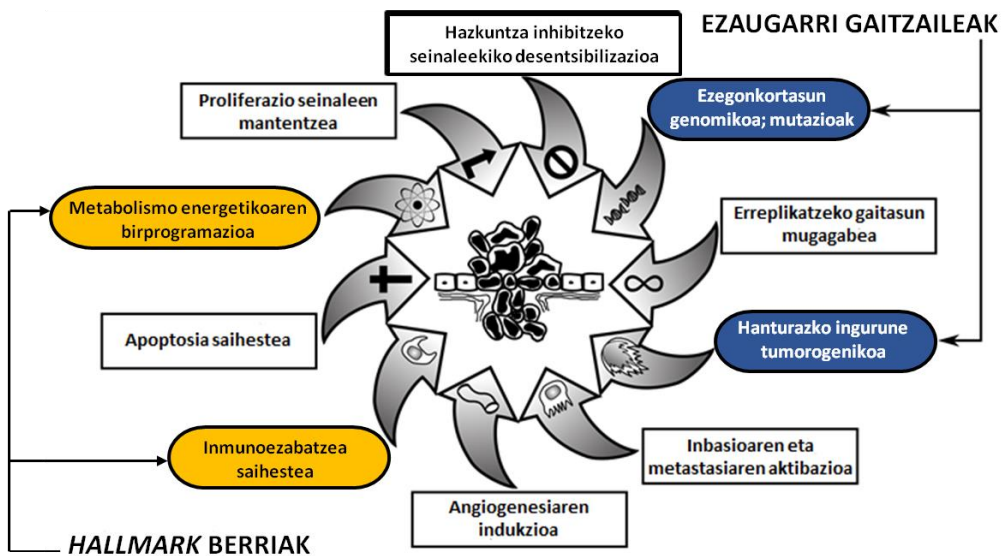
Metastasien garapena mugarri da minbiziaren garapenean, minbiziaren heriotza gehienak metastasiak eragiten baititu. RASren ardatz klasikoaren aktibazioa fenotipo inbaditzailearekin erlazionatu da minbizi mota ugarian (144–146) eta honen inhibizioak, izan iACE zein ARB bidez, metastasien aurkako potentziala erakutsi du (147,148). Ang 1-7/Mas1 hartzaillearen ardatzak aldiz, orokorrean, metastasien aurkako babes funtzioa erakutsi du (149–151).

### **Metabolismo energetikoaren birprogramazioa**

Minbizi zelulek beren energia produkzioa egokitzen dute gaiztotze prozesuan harturiko gaitasunei bide emateko. RASko peptidoek zuzenean eragiten dute energiaren metabolismoan eta ondorioz RAS sindrome metabolikoarekin erlazionatu da. Gainera, alderantzizko efektua ere deskribatu da, hots, egoera energetikoak RASrengan ere eragiten du. Honek guztiak RASk minbizi zelulen nahiz tumore-mikroinguruko beste zelulen energiaren kudeaketan rol bat izan dezakela iradokitzen du (152–154).

## Erreakzio immunologikoaren saihespena

Tumorearen garapena ekiditeko helburuarekin, organismoak erantzun immunologikoa garatzen du tumore-zelulen aurka. Edonola, hauek, estrategiak garatzen dituzte, ez soilik erantzunari aurre egiteko, baizik eta honen eragileak, beren garapenerako aprobetxatzeko. Testuinguru honetan, Ang II-k, AT1R hartzailaren bidez, *macrophage/monocyte chemoattractant protein 2* (MCP-2) proteinaren sintesia bultzatu eta tumorearen makrofago infiltrazioa areagotzen du eta efektu hau, AT2Rren inhibizioz areagotzen da. Halaber, ARBek aipaturiko infiltrazioa gutxitzeko gaitasuna daukate (155,156).



**1.13. Irudia.** Minbiziaren *hallmark* edo ezaugarri bereizgarriak eta minbizi zelulei hauek bereganatzea ahalbideratzen dieten ezaugarri gaitzaileak. RAS lokalak minbiziaren *hallmark* ezberdinekin erlazionatu dira, batez ere ACE/Ang II/AT1R ardatza hauen garapenerekin erlazionatu delarik. (\*) Philippe Hupék sortutako *Hallmarks of cancer* izeneko irudiaren egokitzapena, *Creative Commons*en CC-BY-3.0 lizentziarekin erabil daiteke.

Edonola, RASko osagaien adierazpenaren asaldurak, sistemaren blokeatzaileen efektua eta *in vitro* zein *in vivo* ikusitako efektuak ez dira unibertsalak, ezberdintasunak atzeman baitira ehun ezberdinetatik eratorritako minbizietan. Hala, kolonean esaterako angiotentsina II-ak proliferazioan eraginik ez duela deskribatu da (124). ACE2/Ang 1-7/Mas1 ardatza ere ez da beti tumorearen aurkako efektuekin

erlazionatu, apoptosiaren aurkako eta migrazioa eta inbasioaren aldeko efektuak ere garatzen baititu, giltzurrunean kasu (157,158). Ondorioz, RAS lokalen efektua ehunaren araberakoa izan litekela proposatu da.

### **Ezaugarri gaitzaileak**

Hantura, ezegonkortasun genomikoarekin batera, minbiziaren *hallmarken* oinarrian dago. Izan ere, hanturazko tumore-mikroinguruak minbizi zelulek beren gaitasun bereizgarriak bereganatzea ahalbideratzen du. RASren ardatz klasikoaren aktibazioa hanturaren bitartekari nagusietako bat da. Izan ere, zenbait egoera patologikotan, arteriosklerosian, CKDetan edo sindrome koronario akutuetan esaterako, hantura eta oxidazio ekintzak betetzen ditu, batez ere Ang II/AT1R bitartez eta iACE zein ARBek efektu hau antagonizatzen dute (159).

Gaixotasun hauen ikerketak RASk hantura sustatzeko erabiltzen dituen mekanismo ezberdinak bistaratu ditu. Laburki, Ang II-k AT1R hartzailearen aktibazioaren bitartez hantura sustatzen duten hainbat zitokina, kimiozina, transkripzio faktore eta adhesio molekularen espresioa eragiten du. Ondorioz, zelula inflamatorioak odoletik ehunera igarotzen dira, infiltrazioa handituz. Aldi berean, sistema immuneko leukozito, endotelio-zelula eta odol hodietako muskulu lehuneko zelulengan hanturaren aldeko efektuak eragiten ditu bitartekari ezberdinen bitartez. Esaterako, Ang II/AT1R ardatzak, tumorearen perfusioa eta ondorioz oxigenazioa erregulatzeko gaitasuna du, mikroinguruaren hipoxia eta azidosi egoerak bultzatuz. Honek halaber tumore-mikroinguruaren izaera immunoezabatzailea indartzen du (160). AT2 eta Mas1 hartzaileen ardatzak aldiz, Ang II-k gidaturiko hanturaren aldeko efektua orekatzen dutela deskribatu da hainbat kasutan, aspektu honetan ere emaitza kontrajarriak lortu diren arren (161). Honela, RASk tumore-mikroinguruaren izaera inflamatorioan laguntzen du, minbizi zelulei garatu ahal izateko ezaugarriak bereganatzea ahalbideratuz (162).

## 1. Sarrera. Introducción

RASren ardatz ezberdinak erregulatzen dituzten konposatuak minbiziaren tratamendu potentzial gisa identifikatu dira (163–165). Are gehiago, berriki garatu diren entsegu klinikoek tratamenduen bideragarritasuna frogatu dute eta Ang 1-7 peptidoaren kasuan, hainbat tumore solidotan eta bereziki sarkoma metastasikoaren tratamenduan erabilgarri izan daitekela frogatu da (166–168). Gainera, tumore desmoplasian eta mikroinguruaren izaera immunoezabatzailean duen eragina kontutan izanda, RASren inhibitzaileak gaur egun bogan dagoen immunoterapiaren osagarri ideal gisa proposatu dira (160). Horregatik, RASren inhibitzaileek, minbiziaren aurkako tratamenduaren aurkako entsegu klinikotan parte hartzen jarraitzen dute gaur egun (NCT01821729 clinicaltrials.gov).

### 1.3.4 GILTZURRUNEKO ERRENINA-ANGIOTENTSINA SISTEMA (iRAS) ETA GILTZURRUN-ZELULEN KARTZINOMA

Azken hamarkadetan garaturiko ikerketek, giltzurrunak angiotentsina peptidoen bidezko seinalizazioa garatu ahal izateko osagai ezberdinak sintetizatzeke gaitasuna duela nabarmendu dute. Hori adierazten du giltzurruneko angiotentsina II peptidoaren kontzentrazioa plasmakoa baino 1000 aldiz handiagoa izateak (169). Honela, giltzurruneko RASak (iRAS), efektu hemodinamiko garrantzitsuak garatzen ditu, RAS zirkularrarekin elkarlanean, presio arterialaren erregulatzaile nagusia delarik. Baina ez hori bakarrik, giltzurrun zelulen proliferazioa eta ehunaren birmoldaketa ere erregulatzen ditu oxigenoaren espezie erradioaktiboen (ROS)en produkzioa iraunarazi eta honen ondoriozko hazkuntza faktore eta zitokina profibrotikoen sintesi bidez. Halaber, kolagenoaren deposizioan ere eragiten du, hau degradatzen duten entzimengan eraginez (170). Ondorioz, iRASren hiperaktibazioa egoera patologiko ezberdinekin erlazionatu da, hipertentsioarekin, nefropatia diabetikoarekin, CKDeekin eta fibrosiarekin esaterako (171).

RASk giltzurrun-zelulen kartzinomaren sorreran eta garapenean daukan inpaktua ere sakonki aztertu da. Adibidez, ikerketa epidemiologikoen erakutsi dute RASko hainbat generen polimorfismoek, eta bereziki AGTR1 genearenek, RCC

## 1. Sarrera. Introducción

jasateko arriskuan eragiten dutela (172). Aldiz, aipaturiko ACEren I/D polimorfismoa ChRCCarekin erlazionatu da, ez ordea PRCC eta CCRCCrekin (173).

RASren inhibitzaileen erabilera emaitza kliniko hobetuarekin erlazionatu da RCCn. Hala, nefrektomia jasandako gaixoen artean RASaren inhibitzaileak hartzen zituztenetan metastasien agerpena berantiarragoa zen eta ondorioz biziraupena hobe (174). Gainera, RASaren inhibizio espezifikoaren ondorio dela frogatu da, biziraupenaren hobekuntza handiagoa baita hauen kasuan beste antihipertentsibo batzuekin alderatuz (175). Are gehiago, mRCCan, angiogenesiaren aurkako tratamenduz gain RASaren inhibitzaileak hartzen zituzten gaixoen biziraupena hobe zen hartzen ez zituztenekin alderatuz (175–177) Beraz, RASaren blokeoak tumorearen garapena geldotzen du fase goiztiar nahiz metastasikoetan eta terapia antiangiogenikoekin efektu sinergikoa duela frogatu da.

XX. mendearen amaierarako ezaguna zen AT1R eta AT2R hartzaileen presentzia giltzurrun-zelulen kartzinoman (178). Hartzaile hauen espresioa, faktore pronostiko gisa proposatu da CCRCCn tumorearen agresibitatearekin eta biziraupen okerragoarekin korrelazionatzen baitute (117). Hala ere, ez dira giltzurrun-zelulen kartzinoman asaldatuta ageri diren RASko osagai bakarrak. Hala, ACE eta ACE2 entzimen aktibitatearen jaitsiera detektatu da CCRCC, ChRCC eta RO azpimota histologikoen kohorte txiki batean, inguruko ehun normalarekin alderatuz gero. Adierazpenari dagokionez, ACE, CCRCCko tumore hodietan atzeman da. ACE2ren espresioaren galera hiru tumore azpimotatan ikusi da, partziala CCRCCren kasuan eta totala ChRCC zein ROn (179). APA entzimaren aktibitatea, Ang II/Ang III eraldaketaren erantzule nagusia, nabarmen baxuagoa da giltzurrun-zelulen kartzinoma azpimota histologiko ezberdinetan ehun normalarekin konparatuz (180).

*In vivo* garatutako entsegetan ere, iACE eta ARB ezberdinek RCC tumoreen hazkuntza eta metastasien kopurua murrizteko gaitasuna erakutsi dute (181,182). Gainera murrizketa, angiogenesiaren inhibizioarekin erlazionatu da (148). Are

## 1. Sarrera. Introducción

gehiago, RASaren inhibitzaileek *adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK)* seinalizazio bidearen inhibizioa ekidinez eragiten dutela deskribatu da (183).

*In vitro*, ARB ezberdinek RCC zelulen eta giltzurruneko zelula arrunten proliferazioan eragiteko duten gaitasuna aztertu da. Soilik Telmisartanak, apoptosi bidez, erakutsi zuen zelulen hazkuntza gelditzeko gaitasuna, baina efektu hau, AT1R hartzailearen inhibizioari baino, PPAR- $\gamma$  aktibatzeke gaitasunari egotzi zaio (184,185).

RASaren beste ardatzei dagokienez, 2015ean Zheng eta lankideek Ang 1-7 peptidoak bere Mas1 hartzailearen bitartez RCC zelulen migrazioa eta inbasioa eragiten duela frogatu zuen, Akt bidezko seinalizazioaren ondorioz (158).

Fase preklinikoetan RAS sistemaren inhibizioak giltzurrun-zelulen kartzinomaren tratamendurako erakutsitako potentzialak entsegu klinikoei bide eman die. Honela, RASren inhibizioak, betiere beste tratamendu batzuekin batera, hainbat terapia zuzenduekin alderagarriak diren emaitzak eman dituzte mRCCn (186,187).

Ebidentzia hauek guztiek giltzurruneko RAS lokala RCCrekin erlazionatzeaz gain, sistemaren erregulazio maila konplexu bat iradokitzen dute. Izan ere, RAS lokal bakoitzak profil entzimatico ezberdina dauka eta ondorioz angiotentsina peptidoen sintesia ezberdina da ehun bakoitzean. Hala, giltzurrunak angiotentsina peptidoak degradatzeko gaitasun berezia dauka, ACE eta ACE2 entzimez gain, peptido hauek eraldatzeko gaitasuna daukaten hainbat aminopeptidasa eta endopeptidasa espresatzen baititu (188). Are gehiago, animalia modelo baten arabera, giltzurrunak Ang I eta Ang II peptidoak degradatzeko daukan gaitasuna biriketakoa eta zirkulaziokoa baino handiagoa da eta hauen efektu parakrinoarekin erlazionatuta dago (189). Halaber, hipertentsiodun gaixoetan, giltzurruneko arteriatik jasotako Ang I peptidoaren %9 soilik eraldatu zen Ang II-ra, gainontzeko %70 inguru, beste

## 1. Sarrera. Introducción

peptido batzuetara metabolizatu zirelarik (189). Ondorioz, angiotentsina peptidoak eraldatzeko gaitasuna daukaten peptidasak giltzurruneko RASren funtzioaren erregulatzailer nagusiak dira, peptido bioaktiboen sorreraren erantzuleak baitira. Honakoak dira peptidasa garrantzitsuenak (1.14. Irudia):

### **Angiotentsinen entzima bihurtzailea (ACE)**

Entzima honen aktibitatea angiotentsina II peptidoaren iturri nagusia da egoera fisiologikoetan. Karboxi terminaleko bi aminoazido erauzten ditu eta beraz dipeptidil-karboxipeptidasa bat da. Bi domeinu katalitikodun proteina monomerikoa da. Giltzurrunean, basoetako endotelio-zelulatan, hurbileko hodiedetan eta zelula interstizialetan espresio altua du. Mintz zelularrean kokatzen da, domeinu katalitikoak kanpoalderantz orientatuta. Bertatik jariatua izan daiteke, giltzurrun hodiedetako fluidoetara esaterako non aktibitate entzimatikoa mantentzen duen. Aipaturikoaz gain, beste substratu batzuegan ere eragiten du, Ang 1-7, P substantzia, bradikinina 1-9 eta beste hainbat kininengan esaterako. Bere funtzio entzimatikoz gain, hartzaile gisa ere joka dezake zenbait kinasaren aktibazioa eraginez, endotelio-zeluletan ikusi den bezala (190).

Klinikan, entzima honen inhibitzaileak (iACE), hipertentsioaren zein CKDen tratamendurako terapia gisa erabiltzen dira. Gainera, CD143 bezala ere ezagutzen da, eta zelula ama hematopoietikoen markatzailea da (191).

### **Angiotentsinen entzima bihurtzailea 2 (ACE2)**

Sekuentzia genomikoan ACE entzimaren %42ko homologia izan arren, propietate katalitiko guztiz ezberdinak dauzka. Zink dependentea den domeinu katalitiko bakarra dauka, ACEren inhibitzaileek eragiten ez diotena. Karboxi terminaleko aminoazido bakarra ezabatuz eragiten du bere substratuengan. Antzeko efizientziarekin eragiten du apelin 13, dinorfina eta Ang II-rengan. Edonola, bere funtzio ezagunena eta ikertuena Ang II/Ang 1-7 hidrolizazioa da nahiz eta RASn bertan, Ang I Ang 1-9 bihurtzeko gaitasuna ere baduen. ACE bezala, mintz zelularrari



atxikita zein modu solugarrian aurki daiteke. Giltzurrunean, hurbileko hodian zeluletan espresio altua deskribatu da, glomeruluan eta odol-hodietan ere detektatu den arren (190).

### **Neprilisina edo endopeptidasa neutroa (NEP/CD10)**

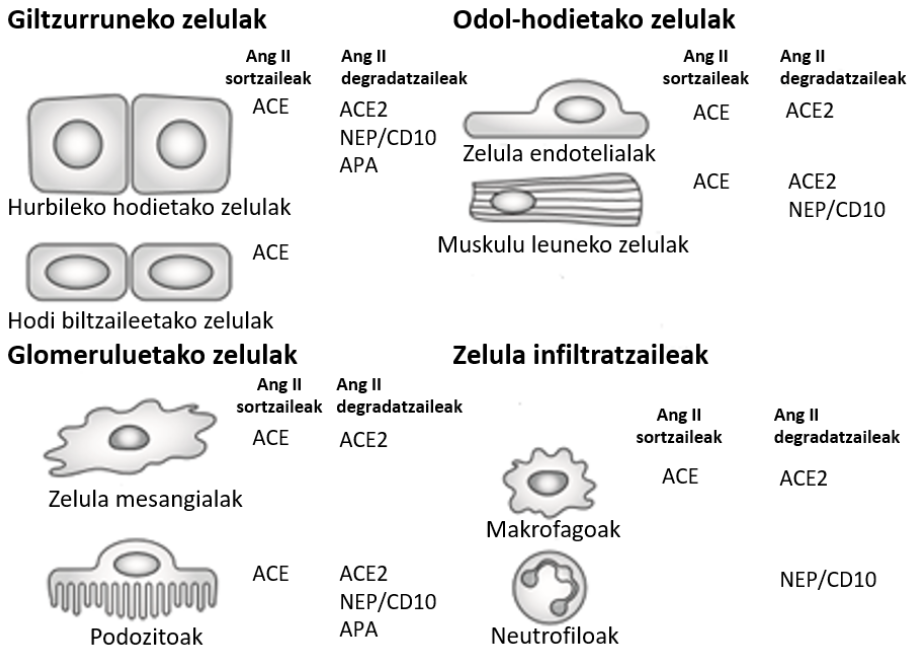
ACE eta ACE2 bezala, zinkarekiko dependentzia daukan metaloproteinasa da. Hasiera batean entzefalina degradatzeko gaitasunagatik “entzefalinas” gisa ezagutu arren, endopeptidasa honek, adrenomedulina, angiotentsinak, kininak, endotelinak, P substantzia eta peptido natriuretikoak degradatzeko gaitasuna erakutsi du. Angiotensinei dagokionez, angiotentsina 1-7 peptidoaren sintesian parte hartzen du, Ang I zein angiotentsina 1-9 peptidoetatik abiatuz. Halere, sintetizatzen duen peptidoaren eta Ang II-ren degradazioan ere hartzen du parte.

NEP/CD10 eta ACEren inhibitzaile dualak hipertentsioaren tratamendurako proposatuak izan diren arren, ez dute ACEren inhibitzaileek baino eraginkortasun handiagoa erakutsi eta angioedema kasuekin erlazionatu dira. Giltzurrunean espresio altua dauka, batez ere hurbileko hodietako zelulen mintzetan eta zelula glomerularretan. RCCari dagokionez CCRCCan espresatzen da, ChRCC eta ROn aldiz ez (190). Hori dela eta, CCRCCaren aldaera eosinofiloa beste azpimota histologikoetako imitatzaileetatik bereizteko markatzaile gisa erabiltzen da (192).

### **Aminopeptidasa A (APA)**

Zink dependentea den metaloproteinasa honek aminoazido glutamiko eta aspartikoak hidrolizatzen ditu N-terminaletik. Bere funtzio ezagunena, Ang II/Ang III angiotentsina peptidoen eraldaketa den arren, beste hainbat peptido bioaktiborengan ere eragiten du, hala nola, neurokinina B, kromogranina A eta kolezistokinina-8rengan. Bere espresioa ezberdina da gizaki ehunetan eta bereziki altua giltzurruneko hodi eta glomeruluetan non Ang II-ren degradatzaile nagusietakoa den. Mintzari atxikitako homodimero gisa ezagutu arren, bere aktibitate entzimatikoa plasman ere detektatu da (193).

# 1. Sarrera. Introducción



**1.14. Irudia. Angiotentsina peptidoen entzima bihurtzaileen espresioa giltzurruna eratzen duten zelula mota ezberdinetan (A), odol hodietako zeluletan (B) eta zelula infiltratzaileetan (C). (\*) Juan Carlos Q. Velezen *The importance of the intrarenal renin-angiotensin system artikulutik* moldatutako irudia (188).**

Peptidasa hauen funtzioa sakonki aztertu da giltzurrunean, bereziki hipertentsioarekin eta gaixotasun kardiobaskularren harira. Honela, beren espresio zein aktibitatearen asaldurak egoera patologiko ezberdinekin erlazionatu dira. Giltzurruneko RAS lokala minbiziaren garapenean inplikaturik aurkitu denez, arrazoizkoa da hau erregulatzen duten peptidasek rol garrantzitsua joko dezaketela pentsatzea.

## 1.4 FIBROBLASTOEN AKTIBAZIO PROTEINA $\alpha$ (FAP $\alpha$ )

Fibroblastoen aktibazio proteina  $\alpha$  (FAP $\alpha$ ) prolina eta beste aminoazido batzuen arteko loturen hidrolisiaren bitartez, peptido bioaktiboak eraldatzen dituen serina proteasa da. 80. hamarkadaren bigarren erdialdean deskribatu zuen aurrenekoz, fibroblastoen aktibazioa karakterizatzeko antigenoen bilaketan ziharduen talde batek (194). Hauek garaturiko F19 antigorputz monoklonalak minbizi eta granulosa ehunetako fibroblastoetan erakutsitako espresio maila altutik datorkio izena. Bigarren talde batek, zelulaz kanpoko matrizea degradatzen duten mintzeko proteasen ikerketa baten baitan, 170 KDa-eko gelatinasa aktibitatedun peptidasa deskribatu zuten, *sephrase* moduan deskribatu zutena (195,196). Bi proteinen klonazio eta sekuentziazio prozesuek FAP $\alpha$  eta *sephrase* mintzeko glikoproteina bera zirela frogatu zuten (197,198). Ordutik, FAP $\alpha$  egoera patologiko ezberdinetan deskribatu da eta ez soilik fibroblastoetan. Gainera, FAP $\alpha$ -ren isoforma solugarri eta intrazelularrak ere deskribatu dira egun izaera multifuntzionaleko peptidasatzat hartzen delarik (199,200).

### 1.4.1 EGITURA ETA FUNTZIOA

FAP $\alpha$  II motako mintz proteina integrala da, mintza zeharkatzen duen eta honen barnealdean kokatzen den 18 eta 6 aminoazidoz osaturiko bi domeinuk eta 736 aminoazidodun zelulaz kanpoko domeinu batek osatua. Domeinu katalitikoa azken honetan kokatzen da serina (S624), aspartato (D702) eta histidinak (H734) serina proteasa izaera ematen dioten triada katalitikoa eratzen dutelarik (201). Izan ere S624 aminoazidoa funtsezkoa da FAP $\alpha$ -ren aktibitate entzimatiakoan, dipeptidil peptidasa zein endopeptidasa aktibitateak gidatzen baititu. Halaber, dimerizazioa eta glikosilazioa ezinbestekoak dira aktibitate entzimatiakoarentzat (202).

## 1. Sarrera. Introducción

Dipeptidil peptidasa 4,6,8,9, prolil endopeptidasa, prolil karboxipeptidasa eta beste hainbatekin batera, post-prolil peptidasen familiaren baitan kokatzen da. Gainera, estuki erlazionatuta dago DPPIV/CD26arekin. Biek domeinu egitura bera daukate, izan ere, bi peptidasen sekuentziak berdinak dira %50ean eta homologia %70era igotzen da domeinu katalitikoan (197). Hala ere, aktibitate katalitikoari dagokionez aldea nabarmena da. Biek dipeptidil-peptidasa aktibitatea daukaten arren, FAP $\alpha$ -k gelatina, I motako kolagenoa eta beste hainbat degradatzea ahalbideratzen dion endopeptidasa aktibitatea ere badu (203). Ezaugarri honek familiako gainontzeko peptidasengandik bereizten du. Gainera, FAP $\alpha$  eta DPPIV/CD26k heterodimero funtzionalak eratu ditzakete eta beren funtzioak garatu ahal izateko era kooperatiboan jarduten dutela proposatu da (204). Are gehiago, gene beraren bikoizketatik eratorritako proteinak direla baieztatu da (205).

FAP $\alpha$ -ren dipeptidil peptidasa eta endopeptidasa aktibitate dualak substratu ezberdinen eragiteko gaitasuna eskaintzen dio. Honela, 2011. urtean Keane eta lankideek argitaraturiko ikerketa batean, zenbait peptido neurologiko, hala nola Y neuropeptidoa (NPY), YY peptidoa, B motako peptido natriuretiko eta P substantzia FAP $\alpha$ -ren dipeptidil peptidasa aktibitatearen substratu gisa deskribatzen dira, neurobiologian rol bat izan dezakeela iradokiz (206).

Edonola, endopeptidasa aktibitateak bereizten du FAP $\alpha$  familiako gainontzeko entzimengandik eta ondorioz, arrazoizkoa da aktibitate hau bere funtzioen garapenean garrantzitsua dela pentsatzea. Zentzu honetan, gelatina eta I motako kolagenoa dira bere substratu ezagunenak. Hori dela eta, FAP $\alpha$ -k matrizeko metaloproteinasekin (MMP) elkarlanean, kolagenoaren degradaziotik eratorritako peptido bioaktiboen sorreran parte hartzen duela proposatu da, esanahi biologikoa guztiz argitu gabe dagoen arren (207). Halaber, FAP $\alpha$ -ren lehen substratu ezaguna  $\alpha$ 2-antiplasmina ( $\alpha$ 2-AP) da, eta digeritzean, fibrinari atxikitzen zaio honen egonkortasuna areagotuz (208). SPRY2 ere, tirosina kinasa hartzaileen inhibitzaile natural bat, FAP $\alpha$ -ren substratu gisa deskribatu da (209). Berriki, FAP $\alpha$ -k *Fibroblast*

## 1. Sarrera. Introducción

*Growth Factor* 21-engan (FGF-21) ere eragiten duela ikusi da. Hau, glukosa eta lipidoen metabolismoaren erregulatzailerik garrantzitsua izanik, FAP $\alpha$  II motako diabetesaren eta metabolismoaren nahasmenduen tratamendurako jomuga gisa proposatu da (210,211).

Edonola, aipaturiko aktibitate entzimatikoa bereizgarria ez da FAP $\alpha$ -k bere funtzioak garatzeko daukan mekanismo bakarra. Mutante katalitikoaren bidezko ikerketek aktibitate entzimatikoz haratagoko funtzioak atxiki baitizkiote (212).

Honela, FAP $\alpha$ -k mintz zelularreko seinalizazio molekulekin proteina konplexuak eratuz hainbat funtzio gidatzeko aukera aztertu da. Zentzu honetan, FAP $\alpha$ -k ez soilik DPPIV/CD26rekin baita  $\beta$ 1 integrinekin eta *urokinase Plasminogen Activator Receptor* (uPAR) ere konplexuak eratu ditzakela frogatu da eta hauen bidezko seinalizazioak funtzio zelularren erregulazioan eragin dezakela (213).

### 1.4.2 FAP $\alpha$ -ren ESPRESIOA FISILOGIAN ETA PATOLOGIAN

FAP $\alpha$ -k giza ehunean espresio patroi karakteristikoa dauka. Batetik, bere adierazpena enbriogenesiarekin erlazionatu da, fetuetako zenbait ehun mesenkimaletan detektatu baita (194). Bestetik, salbuespenak salbuespen, gizaki helduen ehunek ez dute peptidasa hau espresatzen. Gizaki helduetan, soilik endometrioan, hezur muineko zelula ama mesenkimaletan, muskuluan eta pankreako A zelulatan deskribatu da (214–216).

Aldiz, estroma aktiboarekin erlazionaturiko egoera patologiko ezberdinetan FAP $\alpha$ -ren espresioa induzitzen dela baieztatu da. Honela, FAP $\alpha$  izar-itxurako gibelego zelulatan detektatu da gaixo zirrotikoetan (217). Halaber biriketako fibrosi idiopatikodun gaixoen fibroblastoen fokoetan eta interstizio fibrotikoetan ere espresatzen da (218). Hanturarekin estuki erlazionatuta ere ikusi da, artritis eta arteriosklerosi kasuetan esaterako (219,220). Baita Crohnen gaixotasunean ere (221). Minbizian ere detektatu da, tumore-zelulatan, baina batez ere estromako zelulatan, tumore epitelialen %90ean espresatzen dela baieztatu delarik (222).

Patologia guztiek *tissue remodeling* deritzon fenomenoak daukate amankomunean, hau da, ehunen berrikuntza eta berrantolaketa, eta FAP $\alpha$ -ren funtzio biologikoa honekin lotu da (223).

Espresio patroi bereizgarri honen ondorioz, non FAP $\alpha$ -ren espresio ia egoera patologikoetara soilik mugatzen duen, peptidasa hau gaitz ezberdinen tratamendurako jomuga erakargarri bilakatu da.

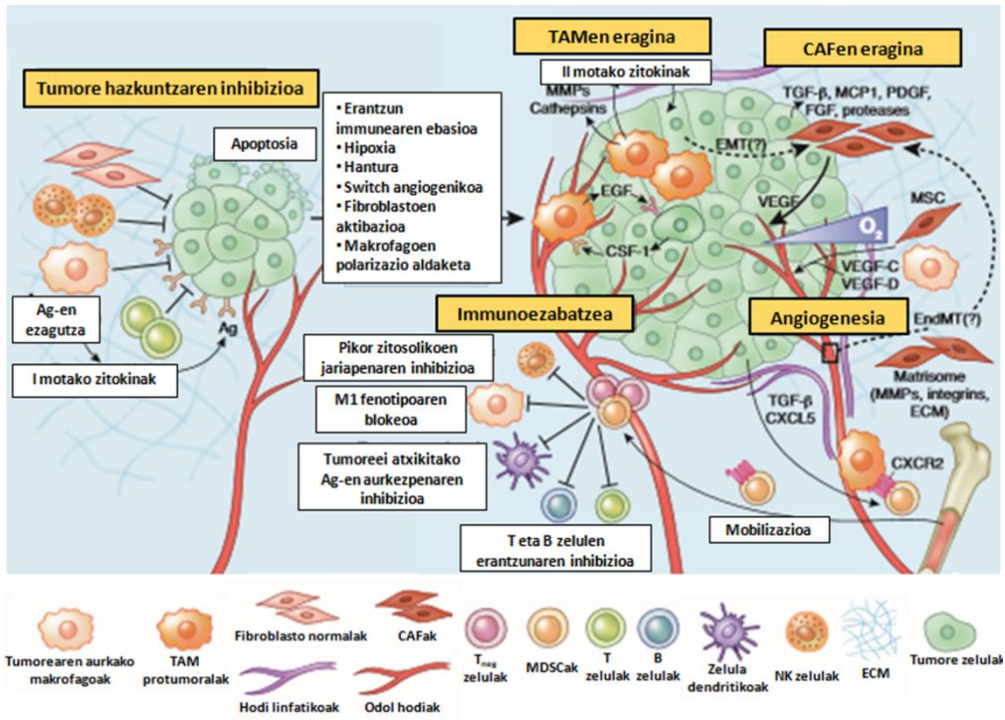
### 1.4.3 FAP $\alpha$ ETA MINBIZIA

Tumoreak sekula ixten ez diren zauri gisa deskribatu dira. Izan ere, tumoreak ebolutiboki ehunen birsorkuntza eta birmoldaketarako garatu diren mekanismo babesleak bere garapen propiorako bereganatzen ditu (224). Fibroblasto aktiboen eta FAP $\alpha$ -ren beraren adierazpena ehunen birmoldaketan inplikaturiko egoera fisiopatologikoen markatzaile gisa deskribatu izanak minbiziaren garapenean ere rol garrantzitsuak izan ditzaketela pentsarazten dute.

### **Tumore-mikroingurua**

Minbiziaren ikuspegia nabarmen aldatu da tumore-zelulaz osaturiko masa soiletik gaur egun ezagutzen den zelula mota ezberdinez osaturiko ehun konplexuetara. Honela, tumoreak mikroinguru konplexu baten baitan sortu eta garatzen dira non tumore-zelula eta estromako zelulen arteko komunikazio bidirekzionala ezinbestekoa den tumorearen garapenerako (1.15. Irudia) (225).

Beraz, tumore-zelula epitelialez gain, endotelio-zelulek, zelula immuneek, fibroblastoez, zelulaz kanpoko matrizeak eta hauen arteko komunikaziorako zitokina eta hazkuntza faktoreek osatzen dute tumorearen mikroingurua. Edonola, mikroinguruaren konposizioa ezberdina da osatzen duten zelulen proportzioaren eta hauen aktibazioaren arabera. Are gehiago, tumorearen mikroingurua eraldaketa konstantean dagoela proposatu da eta tumore-zelulei beren ezaugarri bereizgarri edo *hallmarkak* bereganatzea ahalbideratzen die (226). Modu honetan, minbiziaren hazkuntza, inbasio eta metastasi prozesuak babesten ditu (227).



**1.15. Irudia. Tumore-zelulen eta mikroingurua osatzen duten gainontzeko osagaien arteko binoranzkoko komunikazioa ezinbestekoa da tumorearen garapenerako.** Tumorearen hastapenetan, sistema immunologikoko zelulek, fibroblastoek eta makrofagoek tumorea erasotzen dute baina denborarekin tumorearen garapena bermatzeko “hezten” ditu tumoreak. (\*) Quail DF eta Joyce JA.ren *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis* artikulutik moldatua (227).

Tumore-mikroinguruaren ezaugarri nagusienetako bat bere hanturazko izaera da. Tumoreetako zelula immuneen infiltrazioa XIX. mendetik ezagutzen den arren, inflamazioak minbiziaren garapenean daukan rola ikergai izaten jarraitzen du (224). Hasiera batean tumorearen aurkako erantzuntzat hartu arren, egun ezaguna da minbiziaren garapena ere ahalbideratzen duela (1.15. Irudia) (228). Izan ere, minbizia eragiten duten zenbait kanpo eragile eta baita hainbat arrisku faktore ere inflamazio kronikoarekin erlazionatu dira, bakterio eta birusen infekzioa eta tabakismoa esaterako (229,230). Horregatik, gaur egun, “ezaugarri gaitzaile” gisa ezagutzen da, hots, minbizi zelulei beren gaitasun bereizgarriak bereganatzea ahalbideratzen dien baldintza gisa (72).

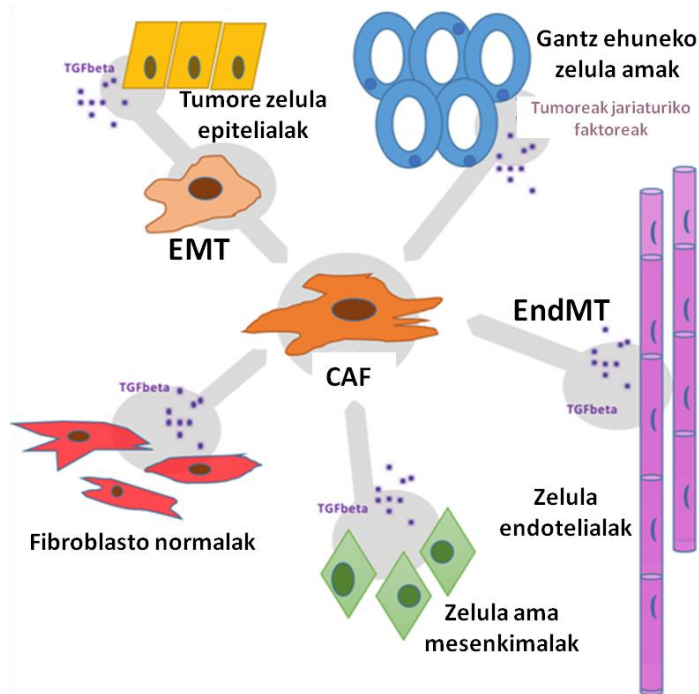
## 1. Sarrera. Introducción

Hori dela eta, tumorearen mikroingurua tratamendurako jomuga potentzial izan daitekeenaren ideia indartzen joan da azken hamarkadetan. Izan ere, estromako zelulak genetikoki egonkorragoak dira tumore-zelulak baino eta ondorioz ez dute hauen erresistentzia garatzeko gaitasunik. Honela, estrategia ezberdinak garatu dira tumorearen baso-sistemaren aurka edo honi atxikitako inflamazioa jomuga dutenak, VEGFren aurkako bevacizumab antigorputza kasu (231). Ez hori bakarrik, mikroinguruko zelula ezberdinak suntsitzeaz gain, hauek tumorearen aurkako akzioak garatu ditzaten birprogramatzea ere proposatu da (227). Zentzu honetan, immunoterapiak, aurrerapen nabarmenak eragin ditu hainbat minbizi motatan eta garatzen jarraitzen du (232,233). Honela, tumore eta estromako zelulen aurkako tratamendu dualek, sistema immune naturalaren estimulazioarekin batera, minbizia tratatu ahal izateko estrategia integrala osatzea espero da (234).

### **Minbiziari atxikitako fibroblastoak (CAF)**

Minbiziari atxikitako fibroblastoak, fibroblasto aktibatuak dira eta tumore-mikroinguruaren osagai nagusienetako bat dira. CAF kontzeptuak, jatorri ezberdineko zelula populazio heterogeneo bat biltzen du (1.16. Irudia). Oro har CAFen jatorri nagusia bertako fibroblastoen aktibazioa den arren, inguruko hainbat endotelio eta epitelio zelulek transformazio mesenkimala jasan dezakete, hurrenez hurren endotelio/epitelio-mesenkima trantsizioa (EndMT/EMT) deritzen prozesuen bidez. Are gehiago, tumore-mikroinguruko beste hainbat zelula mesenkimal, perizito adipozito eta VSMCak kasu, CAFen jatorri izan daitezkeela proposatu da (235).





**1.16. Irudia. Minbiziari atxikitako fibroblastoen (CAF) jatorri ezberdinak.** (\*) Alice Ayresek sortutako *Cancer Associated Fibroblasts* izeneko irudiaren egokitzapena da, eta *Creative Commons*en CC-BY-4.0 lizentziarekin erabil daiteke.

Fibroblastoen aktibazioa ohiko fenomeno da zenbait egoera fisiopatologikotan, esaterako ehunen narriaduraren eraginez. Honen erantzun gisa, fibroblastoen aldaketa fenotipiko bat jasan eta lesioa kokatzen den gunera migratzen dute non beren funtzioak garatzen dituzten. Behin hauek amaituta zelulaz kanpotiko matrizearen degradazioak fibroblasto aktibatuen apoptosia eragiten du (236). Tumoreetan, “sekula ixten ez diren zauriak” izanik, fibroblastoen aktibazioa kroniko bihurtzen da, ikerketa ezberdinen arabera mekanismo epigenetikoek gidatuta, CAFei bide emanez. Hala, beste egoera patologiko batzuetako fibroblasto aktibatuen eta CAFen artean ezberdintasun nabarmenak deskribatu dira (237).

Fibroblastoen aktibazio prozesua tumore motaren arabera diren mekanismo ezberdinen bitartez ematen da. Ezagunena, tumore-zelula epitelialek eta baita estomako beste zelula batzuek jariaturiko zitokina eta hazkuntza faktoreek eragindakoa da (1.17. Irudia) (238). Hauen artean *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF-

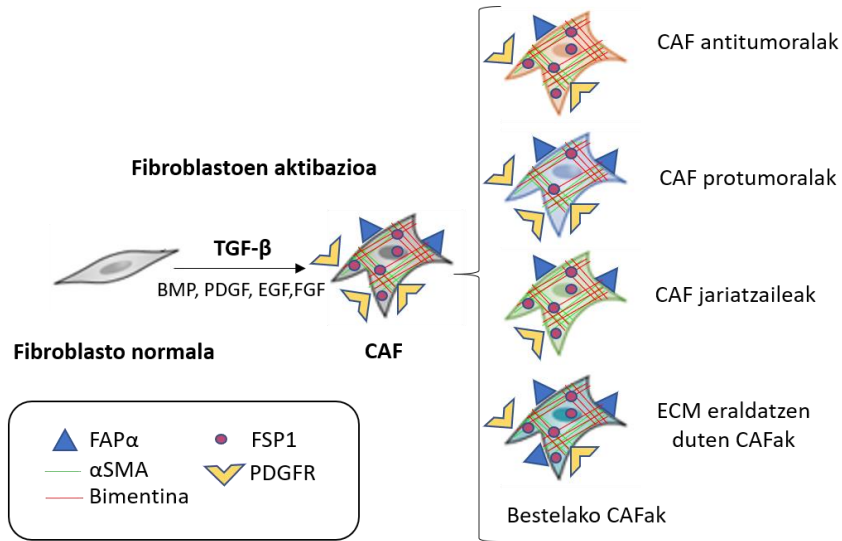
## 1. Sarrera. Introducción

β) bereziki garrantzitsua den arren, beste hainbat ere ezagutzen dira, *bone morphogenic protein* (BMP)ak, *platelet-derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF) and *sonic hedgehog* (SHH) kasu (239). Halaber, zelula-zelula interakzio bidezko aktibazioa ere deskribatu da (240) eta baita microRNA bidezko erregulazioak rol bat duela aktibazio prozesuan (241).

Aktibazio honen eraginez fibroblastoen hainbat aldaketa fenotipiko jasaten dituzte, beren funtzioak garatzeko ezinbestekoak diren ezaugarriak bereganatuz (1.17. Irudia). Honela, CAFen markatzaile bereizgarriena *α smooth muscle actin* (αSMA)ren espresioa da, uzkurdua indarrekin erlazionatu dena. Honekin batera, beste hainbat markatzaile diferentzial ere deskribatu dira, hala nola, bimentina, *fibroblast specific protein 1* (FSP1), S100A4 gisa ere ezaguna, *platelet derived growth factor* (PDGF)ren hartzaileak (PDGFR), desmina eta abar (242). FAPα-ren adierazpena ere mugarri da fibroblastoen aktibazioan. Edonola, markatzaile hauek ez dira CAFen markatzaile espezifikoak, beste hainbat zelulatan ere espresatzen baitira. Are gehiago, fibroblastoen guztiek ez dituzte uneoro markatzaile guztiak espresatzen, egitura eta funtzio ezberdineko zelula populazio zabalari bide emanez (243).

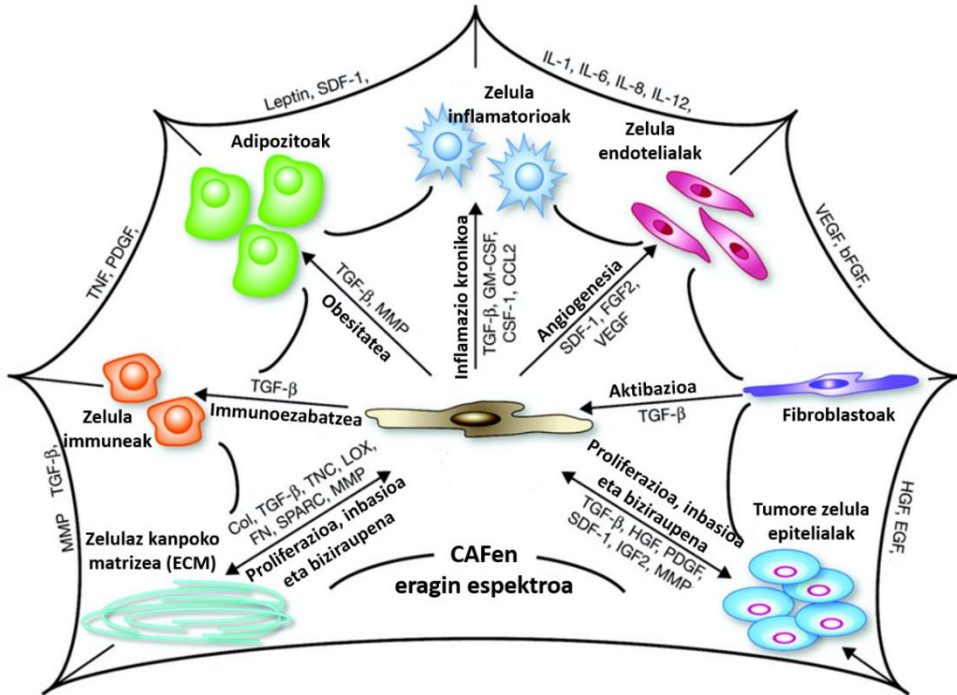
Beraz, CAFek, jatorrizko zelula motaren eta aktibazio prozesuaren eraginez, zelula populazio heterogeneoa eratzen dute. Honek, tumorearen garapenean zehar funtzio ezberdin eta kasu batzuetan kontrajarriak betetzea ahalbideratzen die. Hori dela eta, akzio espezifikodun fibroblastoen azpimota ezberdinen existentzia proposatu da (244). Azpimota hauek ezberdindu eta funtzio espezifikoak erregulatzea minbiziaren tratamendurako mugarri izan daiteke.

## 1. Sarrera. Introducción



**1.17. Irudia. Minbiziari atxikitako fibroblastoen aktibazio prozesuaren laburpena.** Fibroblasto normalek, zitokina eta hazkuntza faktore ezberdinen eraginez, aldaketa fenotipikoa jasaten dute, zenbait markatzaile bereizgarri espresatuz. Jatorrizko zelula eta aktibazio prozesuaren arabera, funtzio espezifikoak garatzen duten CAFak egon litezkelako proposatu da.

Fibroblastoen aktibazioak sinbiosi erlazio bat sortzen du CAF eta minbizi zelulen artean. Honela, CAFek minbiziaren garapenean daukaten rola ikergai izaten jarraitzen du gaur egun. Tumorigenesia eta tumorearen garapena modu aktiboan gida dezaketela deskribatu den arren, tumorearen aurkako funtzioak ere garatu ditzaketela ikusi da (245,246). Hazkuntza faktore eta zitokina ezberdinen jariatzearen bitartez eta zelulaz kanpoko matrizean eraginez, minbiziaren hastapenak, garapena eta metastasi prozesuak erregulatzen dituzte (236). Horretarako, tumorearen hazkuntza, angiogenesia eta ezaugarri inbaditzaileak indutzten dituzte (247–251). Halaber, tumoreen garapeneko fase bakoitzera egokituriko efektu immunoezabatzaileak garatzen dituzte (252). Gainera, CAFek eta minbizi zelulek elkarren metabolismoaren birprogramazioa eragin dezaketela frogatu da (253). Fibroblasto aktibatuen haren beste funtzio garrantzitsu bat tratamenduen aurkako erresistentzia indutztea da (254). Horretarako, hazkuntza faktoreen jariatzea, tumore-zelulekin elkarrekintza eta ECMren birmoldaketa eragiten dituzte (255–258). Horregatik, fibroblastoen minbizian rol integrala garatzen dutela onartzen da (1.18. Irudia).



**1.18. Irudia. Minbiziari atxikitako fibroblastoek minbiziaren garapenean eragiten dute.** Horretarako, zuzenean tumore-zelulen proliferazioa, inbasioa eta biziraupena indutzen dituzte, tumore-zeluletan edo ECMean eraginez. Halaber, zeharka ere sustatu dezakete tumorearen garapena, mikroinguruko gainontzeko zelulengan eraginez. (\*) Brennen EN eta lankideen *Rationale behind targeting FAP $\alpha$  protein expressing CAFs* artikulutik moldatutako irudia(259).

CAFek minbiziaren garapenean daukaten garrantzia kontutan hartuta ez da harrizkoa haiek jomuga dituzten tratamenduak minbizi zelulen aurkako tratamenduekin batera erabiltzea proposatu izana. Zentzu honetan, estrategia ezberdinak proposatu dira. CAFen markatzaileak zuzenean jomuga gisa erabiltzea, FAP $\alpha$  esaterako, edota CAFen seinalizazio parakrinoarengan eragitea, hala nola, PDGF/PDGFR, HGF/Met edota TGF- $\beta$  bidezkoetan (242). Fase prekliniko zein klinikoetan buruturiko entseguek, emaitza itxaropentsuak eman dituzten arren, CAFak jomuga dituzten tratamenduak garapenean daude oraindik (260,261).

Halaber, CAFen aktibazioaren markatzaile diren hainbat proteinaren espresioa,  $\alpha$ SMA, bimentina edo FAP $\alpha$ -rena kasu, minbizi ezberdinen diagnostikorako tresna bezala proposatu dira (262).

### **FAP $\alpha$ eta tumore biologia**

FAP $\alpha$  tumore epitelialetak estromaren %90ean espresatzen da, hain zuzen ere CAFetan. FAP $\alpha$  CAFek betetzen dituzten funtzio ezberdinetan inplikatur dagoela frogatu da eta hauek bezala, tumorearen garapenarekin nahiz tumorearen aurkako efektuekin erlazionatu da (263). Ondorioz, FAP $\alpha$ -ren funtzioa kontestuen arabera izan daitekeela proposatu da, eta espezifikoki elkar-ekintzarako eskuragarri dituen seinalizazio molekulu arabera.

2015ean Fang Liu eta lankideek *Plos One* aldizkarian argitaraturiko meta-analisi batean, tumore ezberdinetan immunohistokimika bidez FAP $\alpha$ -ren adierazpena aztertzen duten 15 ikerketa biltzen dira (264). Espresioa jatorri ezberdineko tumoreen estroman aztertzeaz gain, zenbait tumore-zelulatan ere detektatzen da, obulutegikoan, pankreakoan, esofagokoan, endometriokoan eta osteosarkoman kasu. Bertan frogatzen da FAP $\alpha$  gainespresatzen duten gaixok gongoil linfatikoetarako metastasiak jasateko arrisku handiago dutela FAP $\alpha$  espresio baxua dutenek baino eta ondorioz baita pronostiko gaiztoagoa eta biziraupen laburragoa ere. Are gehiago, pronostiko gaiztoarekin duen korrelazioa sendoagoa da FAP $\alpha$  tumore-zeluletan espresatzen duten gaixotan, estroman espresatzen dutenetan baino. Berriki, antzeko emaitzak deskribatu dira urdaileko minbizian ere (265). Oro har FAP $\alpha$ -ren adierazpena tumoreen izaera agresiboarekin eta pronostiko gaiztoarekin erlazionatu bada ere, badira aurkako emaitzak jasotzen dituzten ikerketak ere. Hala, bularreko hodietako kartzinoma inbaditzailean, biziraupen hobearrekin korrelazionatzen du (266).

Hori dela eta FAP $\alpha$ -ren espresioa, hainbat minbiziren diagnostikorako tresna potentzial gisa proposatu da (265,267). Ez soilik tumore ehunetan, plasmako FAP $\alpha$  mailak ere balio diagnostikoa erakutsi du, non oro har, jaitsi egiten den minbizi pazienteetan pertsona osasuntsuekin alderatuz gero (268,269). Are gehiago, berriki argitaraturiko artikulu batean FAP $\alpha$ -ren aktibitatearekiko sentikorrek diren zundadun nanopartikulak gernuan detektatzeko metodo bat deskribatzen da tumore

## 1. Sarrera. Introducción

solidoen diagnostikorako (270). Halaber, FAP $\alpha$ -k aktibaturiko immunoliposoma fluoreszenteak, era intraoperatiboan tumore eta metastasien detekziorako tresna erabilgarriak direla frogatu da, hauen erauzketa kirurgikoa optimizatzeko erabilgarri izan daitezkelarik (271).

*In vitro* zein *in vivo* ikerketek, FAP $\alpha$ -k tumorearen garapenean eragin integrala daukala frogatu dute, CAFek parte hartzen duten funtzio guztietan parte hartzen baitu. Honela, urdaileko, pankreako edota obulutegiko minbizien modelo ezberdinetan esaterako, FAP $\alpha$ -k minbizi zelulen biziraupena, proliferazioa, migrazioa eta tratamenduekiko erresistentzia bultzatzen dituela frogatu da (272–275). Gainera, modelo ezberdinetan, FAP $\alpha$ -ren espresioa tumoreen izaera inbaditzailearekin estuki erlazionatuta dagoela frogatu da (276–278). Halaber, FAP $\alpha$ -ren inhibizioa zein adierazpenaren murrizketa, estrategia eraginkorrak dira minbiziaren garapena eta metastasien agerpena ekiditeko orduan (279–281).

FAP $\alpha$ -k garaturiko funtzio espezifikoak ezagutu ahala, akzio hauek burutzeko mekanismo molekularren ezagutza ere argituz doa (1.19. Irudia). Hala, bularreko minbiziko bi modelotan, non FAP $\alpha$  tumore-zeluletan espresatzen den, tumore-zelulen hazkuntza, mugikortasuna eta inbaditzeko ahalmena, aktibitate entzimatikorekiko independenteak direla frogatu da mutante katalitikoaren bitartez (282,283). Aldiz, HEK293 zelulekin garaturiko modelo batean aktibitate entzimatikorik gabeko mutante katalitikoak, tumorearen hazkundera moteltzen du (284). Ondorioz, FAP $\alpha$ -ren funtzio biologikoak aktibitate entzimatiaren menpekoak izan daitezke edo ez, kontestuen arabera:

### *Zelulaz kanpoko matrizearen eraldaketa*

FAP $\alpha$ -k tumore-zelulen inbaditzeko gaitasuna areagotzen du ECMean eraginez. Horretarako, aktibitate entzimatiaren menpeko zein independenteak diren funtzioak garatzen ditu. Batetik, koleganasa aktibitatearen bitartez ECMeko proteinen maila eta kolageno eta fibronektina zuntzen organizazioa areagotuz bultzatzen du inbasioa, pankreako minbizian edo melanoman deskribatu den bezala

## 1. Sarrera. Introducción

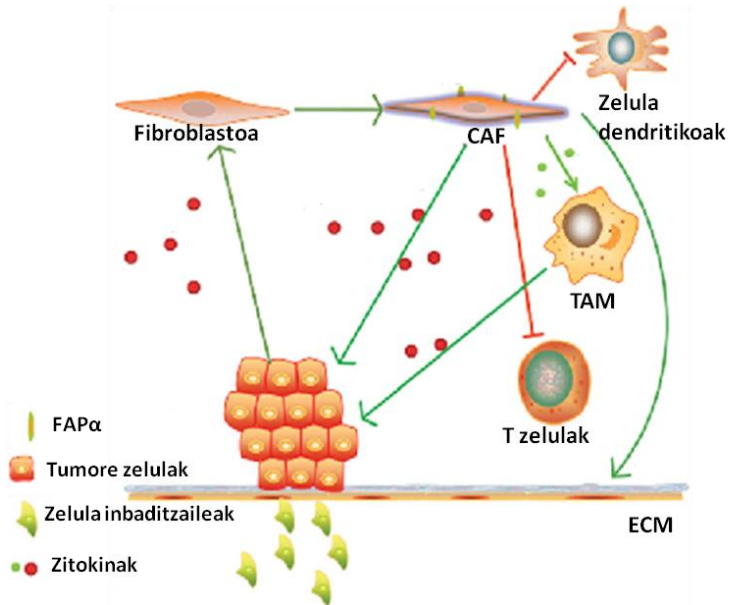
(285,286). Bestalde, proteina ezberdinen interakzioz ere eragiten du, hauekin konplexuak eratuz, modu sinergikoan jardunez (integrinekin esaterako) edota ECMean eragiten duten proteinen espresioa indultuz, MMP-2 eta MMP-9 kasu (207,213,282,287).

### *CAFen sekretomaren erregulazioa*

Berriki argitaraturiko artikuluko batean FAP $\alpha$ -ren adierazpenak CAFek jariaturiko proteinak erregulatzen dituela frogatzen da (288). Bereziki, TGF- $\beta$  seinalizazioarekin, zelulaz kanpoko matrizearekin eta angiogenesiarekin erlazionaturiko proteinak dira asaldatuta ageri direnak. Batetik, emaitza hauek bat datoz, FAP $\alpha$ -k ECMrengan erakutsitako akzioekin. Bestalde, FAP $\alpha$ -ren angiogenesiaren aldeko eragina hainbat ikerketatan deskribatu da. Hala, bere adierazpena, tumoreetako odol-hodi dentsitate handiagoarekin erlazionatu da bularreko minbiziko modelo batean eta VEGF espresioarekin korrelazionatzen du pankreako minbizian (289,290). Gainera, FAP $\alpha$ -ren inhibizio farmakologiko zein adierazpenaren jaitsierak, tumoreetako odol-hodien dentsitatea murrizten du (291). Halaber, ezaguna da TGF- $\beta$ -ren FAP $\alpha$  indultzeko gaitasuna (292,293). Aktibazio erreziprokoak efektu sinergikoak iradokitzen ditu.

### *Substratu fisiologikoen degradazioa*

FAP $\alpha$ -ren substratu fisiologikoen aztergai izaten jarraitzen duten arren, zenbait peptido ezagunen degradazioak tumore biologian rol bat joko dezaketela proposatu da. Hala, Y neuropeptidoa eta bere Y2R hartzailea, urdailean, parenkima/estroma interfaseko minbizi zelulatan gainespresatuta ageri dira, non fibroblastoetako FAP $\alpha$ -rekin elkarrekin dezaketen (294). Halaber, FAP $\alpha$ -ren beste substratu batek, FGF21ak hain zuzen ere, urdaileko minbiziaren aurkako babes funtzioak dituela deskribatu da *in vivo* garaturiko entseguetan (295).



**1.19. Irudia. FAP $\alpha$ -k mekanismo ezberdinen bitartez minbiziaren garapena ahalbideratzen du.** Batetik, ECMrengan eragiteko gaitasuna dauka. Gainera, CAFek jariaturiko zitokina eta beste hainbat faktore erregulatzen ditu. Honela, erantzun immunea ezabatu eta hanturazko ingurunea sortuz. Ondorioz, tumorearen fenotipo agresiboa bultzatzen du.(\*). Fuming Zi eta lankideen *FAP $\alpha$  in tumor microenvironment: recent progression and implications review*-tik moldatutako irudia (296).

### *Immunoiezabatzea*

FAP $\alpha$ -k tumoreen garapena bultzatzeko darabilen mekanismo garrantzitsuenetariko bat bezala deskribatu da tumorearen aurkako erantzun immunearen ezabaketa (297). Hala, berriki, koloneko minbiziari eta gibelego kolangiokartzinomari buruz argitaraturiko bi artikulutan, FAP $\alpha$ -k erantzun immunea ezabatzeko mekanismo berdintsuak deskribatzen dira (298,299). Laburki, FAP $\alpha$ -dun zelulek, hanturazko ingurunearen sorrera bultzatzen dute CCL2ren gainespresio bidez. Honek, zelula mieloideen erakarpina eragiten du eta aldi berean T-zelulen aktibitatea murriztu. Halaber, pankreako minbizian, FAP $\alpha$ -dun zelulak ezabatzeak *checkpoint* immunologikoen tumorearen aurkako efektua berreskuratzen du (300). Hau, CXCL12ren jaitsierarekin zuzenean erlazionaturik dago, zein lehenago ere CAF eta minbizien garapenarekin erlazionatu den (301). Honela, FAP $\alpha$ -dun estromako zelulek, oztopo desmoplasiko bat ezartzeaz haratago, T zelulen aurkako estrategia biokimikoa ere garatzen dute (302,303).



## 1. Sarrera. Introducción

### *Tratamendu ezberdinekiko erresistentziaren indukzioa*

Tumorearen garapena ahalbideratzeko mekanismoez gain, FAP $\alpha$ -k tratamendu ezberdinen aurkako erresistentzian ere eragiten duela deskribatu da. Hala mieloma anizkoitzaren (MM) *in vitro* modelo batean, hezur muineko zelula ama mesenkimaletan (BMMSC) espresaturiko FAP $\alpha$ -ak bortezomibak MM tumorezelulatan eragindako apoptositik babesten du (304). Halaber, obulutegiko kartzinoma epitelialean, estomako zelulen FAP $\alpha$  espresioa, zisplatinoarekiko erresistentziaren markatzaile da eta baita errezidiba bizkorrago baten adierazle ere (305). Gainera, FAP $\alpha$ -ren inhibizioak kimioterapiaren eraginkortasuna areagotu dezakela frogatu da (306).

### **FAP $\alpha$ jomuga duten estrategia terapeutikoak**

FAP $\alpha$ -ren adierazpena batez ere tumoreetako zelula estromaletara mugatuta egoteak eta tumore epitelialen %90ean deskribatu izanak, bere aktibitate entzimatik bereizgarriarekin batera, minbiziaren tratamendurako iturri interesgarri bihurtzen dute. Ondorioz, FAP $\alpha$ -k tumore biologian daukan funtzioa antagonizatzeke estrategia ezberdinak diseinatu dira.

### *FAP $\alpha$ -ren aktibitate entzimatiakoaren inhibitzaileak*

Saiakera ezberdinak burutu dira serina proteasa honen aktibitatearen inhibitzaileak diseinatzen (307). Zentzu honetan, eta FAP $\alpha$ -ren inhibitzaile espezifiko bano dipeptidil peptidasa aktibitatearen inhibitzaile den arren, PT100 edo Talabostat bezala ezagutzen den inhibitzailea izan da erabiliena. Hala, azido borikoan oinarrituriko inhibitzaile honek FAP $\alpha$  eta DPPIV/CD26 inhibitzen ditu eta independenteki, tumorearen aurkako erantzun immunologikoa ere bultzatzen du (308). Konposatu honekin II. faseko entsegu klinikoak garatu dira fase aurreratuko minbizi ezberdinetan, koloneko minbizi metastasikoan, *non small cell lung carcinoman* (NSCLC), IV estadioko melanoman eta leuzemia linfomatikoan (308–311). Zenbait erantzun partzial eta NSCLCren kasuan erantzun total bat ere erregistratu arren, oro har, lorturiko emaitzek ez dute tratamendu klasikoekiko

## 1. Sarrera. Introducción

abantaila handirik erakutsi. Halere, dosia muga lezaken toxizitaterik ezean, *Point Therapeutics* enpresak III. faseko entseguak ere garatu ditu. Hauek, bertan-behera gelditu ziren biriketako minbizidun gaixoetan erakutsitako eraginkortasun ezagatik (259).

Talabostatarekin gertatu bezala, simultaneoki FAP $\alpha$  eta protil oligopeptidasa inhibitzen dituzten inhibitzaileen tumoreen aurkako efektua ere frogatu da (312). Hala ere, FAP $\alpha$ -ren inhibitzaile espezifikoen garapenak erronka izaten jarraitzen du, potentzial terapeutikoz gain, bere rol biologiko espezifikoen ezagutzarako ezinbesteko baita. Hainbat saiakera itxaropentsu burutu diren arren, oraindik ez da hauen emaitza prekliniko edo klinikorik argitaratu (33,307,313).

### *FAP $\alpha$ -ren aurkako antigorputzak*

FAP $\alpha$ -k tumore biologian daukan efektua, bere aktibitate entzimatikotik haratago doa. Hala, beste hainbat estrategia ere erabili dira FAP $\alpha$ -ren aurka. Hauen artean, antigorputzak dira ezagunenak. Hala, Boehringer Ingelheim etxearen sibrotuzumab, FAP $\alpha$ -ren aurkako F19 antigorputzaren bertsio gizatiartuarekin, I eta II faseko entsegu klinikoak garatu dira. Koloneko eta NSCLC-dun gaixoetan tolerantzia ona eta segurtasun maila altua erakutsi arren, ez da tumorearen erantzun esanguratsurik atzeman (314,315). Hemendik abiatuta, FAP $\alpha$ -rekin erlazionaturiko antigorputz ezberdinak garatu dira. Hala, FAP $\alpha$ -ren aurkako antigorputz inhibitzaile berriek honen funtzioak deuseztatzeko gaitasuna erakutsi dute (316). Berriki, FAP $\alpha$  eta beste proteina bat jomuga dituzten antigorputz bi-espezifikoek emaitza itxaropentsuak eman dituzte (317,318). Ondorioz, egun entsegu klinikoak garatzen ari dira hauekin tumore solidodun gaixoetan NCT02558140 eta NCT02627274. Antzera, erradionukleidoekin konjugaturiko FAP $\alpha$  antigorputzek ere emaitza onak eman dituzte fase preklinikoetan (319).

## 1. Sarrera. Introducción

### *FAP $\alpha$ -k aktibaturiko pro-drogak*

FAP $\alpha$  engaiatzen duen minbiziaren aurkako beste estrategia bat, bere aktibitate entzimatiakoaren bidezko pro-droga kaltegabeen aktibazioa da. Izan ere, peptidasa honen espresio selektiboak, droga zitotoxikoaren efektua tumorearen ingurunera mugatzea bermatzen du. Zentzu honetako lehenengo saiakera erle pozoitik abiatuta sintetizaturiko pro-toxina bati, FAP $\alpha$ -k hidrolizatzeko sekuentzia gehituz burutu zen eta bularreko zein prostatako minbiziko *in vivo* modeloetan tumorearen hazkuntzaren inhibizio nabarmena erakutsi zuen (320). Ordutik, doxoerrubizina, tapsigargina, emetina eta beste hainbat konposatu zitotoxikotan oinarrituriko pro-drogekin garaturiko entsegu preklinikoek estrategia seguru eta eraginkorra izan daitezela frogatu dute (321–327). Are gehiago, berriki, FAP $\alpha$ -k ezagutzeko diseinaturiko nanopartikulak, droga terapeutikoak tumore-mikroinguruan modu espezifiko eta seguruan kontzentratzeko estrategia eraginkor gisa frogatu dira (328), eta baita immunoliposomak ere (329).

### *FAP $\alpha$ jomuga daukaten minbiziaren aurkako txertoak*

Minbiziaren aurkako txerto terapeutikoak, pazientearen sistema immunologikoa indartuz tumorearen aurkako erantzuna garatzeko estrategiak dira eta beraz immunoterapiaren barnean kokatzen dira (330). Hala, *in vivo* garaturiko entsegu preklinikoetan emaitza itxaropentsuak lortu dira. 2005ean jada, FAP $\alpha$  jomuga zuen txerto batek, tumore-zelulen aurka diseinaturiko txertoek bezain besteko tumore aurkako efektua zeukala ikusi zen (331). Ordutik, zelula dendritikoetan oinarrituriko zein azido desoxirribonukleiko (DNA) bidezko txerto ezberdinek, tumorearen garapena ekiditeko gaitasuna erakutsi dute (332–335). Are gehiago, berriki, txerto hauek erantzun immunea erregula dezaketen beste zenbait konposaturekin konbinatzeak tumorearen aurkako eraginkortasuna areagotu dezaketela deskribatu da (336–339).

### *FAP $\alpha$ -ren aurka zuzendutako Chimeric Antigen Receptor T Cells*

CAR T-cell terapia deritzona, *adoptive cell transfer* (ACT) immunoterapiaren azpimota bat da. Laburki, gaixoaren T zelulak jaso eta laborategian genetikoki eraldatzen dira, beren mintz zelularrean tumoreetako antigenoak ezagutuko dituzten CARak espresa ditzaten. Zelula hauek hazi eta berriz gaixoari inokulatzen zaizkio, aipaturiko antigenoa espresatzen duten zelulak ezabatzeko. Gainera, T zelula hauek gaixoaren organismoan mantentzen dira, errekurrentzia ekidinez. Berriki onartu du FDAk teknika honetan oinarrituriko lehen tratamendua. Estrategia honetan oinarrituz FAP $\alpha$  jomuga daukaten T zelulak sortu dira, hauekin *in vivo* entseguak garatuz. Hala, hauekin trataturiko saguetan FAP $\alpha$  espresatzen duten estromako zelulen gutxitzea eta ondorioz tumore ezberdinen garapenaren geldotzea frogatu da (340–342). Ondorioz, Zuricheko Unibertsitatea entsegu kliniko baten hastapen faseetan dago eraldatutako T zelulak FAP $\alpha$  espresatzen duen mesotelioma pleurala tratatzeko (NCT01722149).

#### 1.4.4 FAP $\alpha$ ETA GILTZURRUN-ZELULEN KARTZINOMA

FAP $\alpha$ -k minbizi ezberdinen garapenean daukan garrantzia inongo zalantzaz kanpo dagoen arren, giltzurrun-zelulen kartzinoman izan lezaken rola erabat ezezaguna da. Hala ere, tumorearen mikroinguruak RCCaren garapenean duen garrantzia ezaguna da eta minbiziari atxikitako fibroblastoen giltzurruneko minbizi zelulen proliferazioa, migrazioa eta everolimus tratamenduaren aurkako erresistentzia areagotzen dituztela frogatu da (343). Gainera, CCRCC zelulen eta fibroblastoen arteko elkarrekintzak zelulaz kanpoko matrizearen eraldaketa eragin dezakeela ere frogatu da (344).

Honek, FAP $\alpha$  RCCarekin erlazionatuta egon litekela iradokitzen du, batik bat CCRCCarekin. Izan ere, CCRCCan, VHL genearen galerak Hif 1 $\alpha$ -ren metaketa eragiten du. Jakina da hipoxia faktore honek zenbait seinalizazio molekula faktoreren jariatzea erregulatzen duela zeintzuek aldi berean zelula aitzindariak CAF bilakatzea eragiten duten (345–347).

## **1. Sarrera. Introducción**

## **2. HELBURUAK. Objetivos**



## 2. Helburuak. Objetivos

Ikerketa hau, Medikuntza eta Erizaintza Fakultateko Fisiologia Sailean garatu da, Komunikazio Zelularreko ikerketa taldearen baitan, zeinak ibilbide luzea daukan peptidasen ikerkuntzan. Izan ere, talde honek hainbat hamarkada daramatza peptidasek fisiologiaren alor ezberdinetan garaturiko funtzioa aztertzen. Hala, entzima hauek, ugalkortasun, garapen eta zahartze prozesuetan duten eskuhartzea deskribatuz artikulu ezberdinak argitaratu dira.

XXI. mendearen hasieran, peptidasen ikerketa minbiziaren alorrera hedatu zen. Hala, azken hamarkadan, peptidasa ezberdinek giltzurrun-zeluletako, koloneko, tiroideko eta beste hainbat ehunetako minbizietan dauzkaten rola aztertu dira, emaitza esanguratsuak lortuz. Giltzurruna bereziki, peptidasetan oso aberatsa den ehuna da eta hauetako hainbaten aktibitatea asaldatuta deskribatu da prozesu neoplasikoetan. Hori dela eta modelo egokia da tesi honetan ikergai diren peptidasen ikerketarako.

Hain zuzen ere, talde honek, errenina-angiotentsina sistemako zenbait peptidasen aktibitatea asaldatuta deskribatu dute giltzurrun-zelulen minbiziko ehunetatik eratorritako homogenatuetan (179,348). Antzera, DPPIV/CD26 entzimaren aktibitatea ere, FAP $\alpha$ -rekin estuki erlazionatuta dagoena, desorekatuta antzeman da (349).

Hori dela eta, tesi proiektu honen helburua giltzurruneko errenina-angiotentsina sistema peptidikoak eta fibroblastoen aktibazio proteina  $\alpha$  (FAP $\alpha$ ) peptidasak giltzurrun-zelulen kartzinomaren garapenean biomarkatzaile eta tratamendurako iturri gisa izan dezaketen potentziala aztertzea da.

Horretarako, honako helburu espezifikoak diseinatu dira ikerketa proiektuaren garapenaren baitan:



### 2.1 1. KAPITULUA: GILTZURRUNEKO ERRENINA-ANGIOTENTSINA SISTEMAREN (iRAS) IKERKETA GILTZURRUN ZELULEN KARTZINOMAN (RCC)

1. Angiotentsina peptidoak eraldatzeko gaitasuna daukaten ACE, ACE2, NEP/CD10 eta APA peptidasen espresioaren azterketa RCCko lau azpimota histologiko ohikoenez osaturiko 144 laginen seriean. Tresna pronostiko bezala izan lezaketen potentziala ikertzeko, hauen adierazpena parametro kliniko-patologiko ezberdinekin eta gaixoen biziraupenarekin erlazionatuko da.
2. Angiotentsina peptidoak eraldatzeko gaitasuna daukaten ACE, ACE2, NEP/CD10 eta APA entzimen aktibitatearen azterketa giltzurrun-zelulen kartzinoma daukaten gaixoetatik eratorritako serumean. Entzimen aktibitatearen emaitzak gaixoen ezaugarri kliniko-patologikoekin eta pronostikorako erabiltzen diren modeloekin konparatuko dira, gaixotasunaren biomarkatzaile ez inbaditzaile gisa izan dezaketen erabilgarritasuna baloratzeko.
3. Errenina-angiotentsina sistemaren aktibitatearen ondorioz sorturiko peptido nagusiek (Ang II/Ang 1-7) RCCko lerro zelularren proliferazioan eta migrazioan daukaten efektuaren azterketa.

**2.2 2. KAPITULUA: FIBROBLASTOEN AKTIBAZIO PROTEINA  $\alpha$  (FAP $\alpha$ ) ZELULA ARGIEEN GILTZURRUN-ZELULEN KARTZINOMAN (CCRCC)**

1. FAP $\alpha$ -k CCRCCan daukan espresioaren azterketa 208 tumore primarioz osaturiko seriean. Parametro kliniko-patologikoekin eta gaixoen biziraupenarekin daukan erlazioaren azterketa burutuko da FAP $\alpha$ -ren adierazpenaren esanahi klinikoa ulertzeko.
2. FAP $\alpha$ -ren espresioaren analisia CCRCC metastasikoan. Minbizi honetan tresna pronostiko gisa daukan potentzialaren balorazioa parametro kliniko-patologikoen eta epitelio-mesenkima trantsizio (EMT)ko markatzaileekin daukan harremana erlazionatuz.
3. FAP $\alpha$ -k giltzurrun-zelulen kartzinomaren ezaugarri ezberdinetan daukan rolaen analisia CCRCCko eta fibroblasto lerro zelulekin buruturiko *in vitro* entseguen bitartez.



### **3. MATERIALAK ETA METODOAK.**

Materialles y métodos



## 3.1 LAGINA

Ikerketa proiektu honetan erabilitako lagina eta pazienteen informazioa bi instituzio mediko ezberdinetatik bildu ziren. Laginaren zatirik handiena, Ikerketarako Euskal Biobankutik (OEHUN) jaso zen. Instituzio honetan dute jatorria lehenengo kapituluari aztertutako parafinan finkaturiko lagin guztiek, plasma laginek eta baita ehun freskoak ere. Bigarren kapituluari dagokionez, giltzurrun-zelulen kartzinomako tumore primarioen seriea, Nafarroako Unibertsitatetik eratorritako laginekin osatu zen, aztertutako CCRCen lagin kopurua 208ra igoz. FAP $\alpha$ -ren espresioaren ikerketarako erabilitako tumore primario zein metastasikoz osaturiko serieak ordea Ikerketarako Euskal Biobankuan (OEHUN) du jatorria.

Paziente orori jakinarazi zitzaion bere kirurgiatik eratorritako laginen ikerketarako erabilera potentziala eta denek beraien onospena eman zuten Euskal Osasun Zerbitzuko (Osakidetza) Etika eta Ikerkuntzarako batzordeek onetsitako dokumentu bat sinatuz (CEIC 2015/060, CEIC-E PI2015101 eta CEIC 11-51).

Lagin guztiak bi patologok berrikusi zituzten Fuhrman gradua (19) eta tumore primarioaren inbasio lokala berresteko (17).

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### 3.1.1 ANGIOTENTSINEN ENTZIMA BIHURTZAILEEN ESPRESIOA ETA AKTIBITATEA RCC GAIXOETAN

Gurutzetako Unibertsitate Ospitalean 1997 eta 2001 urteen artean artaturiko 144 RCC paziente ezberdinetatik eratorritako formalinaz finkaturiko eta parafinaz beteriko laginetan aztertu zen angiotensina peptidoak eraldatzeko gaitasuna duten entzimen adierazpena. Ikerketaren atzera begirako izaera kontutan izanda, gaixoen jarraipen klinikoak 2015. urteko abenduaren 31n itxi zen, biziraupena aztertu ahal izateko.

Entzimen aktibitatearen neurketarako aldiz Basurtuko Unibertsitate Ospitalean 2012 eta 2016 urteen artean RCCrekin diagnostikaturiko 128 gaixori kirurgia burutu aurretik ateratako odoletik erauzitako seruma erabili zen. Hauekin batera gaixotasun neoplasikoen aurrekaririk ez zuten 40 pertsona osasuntsutatik eratorritako serumean ere neurtu zen aktibitatea kontrol moduan. Gaixo hauen jarraipen klinikoak 5 urteak gainditzen ez zituela kontutan hartuta (32,27 hilabete batez-beste), aktibitatearen potentzial pronostikoa aztertzeko hurrenez-hurren errezidiba eta heriotza arriskuak baloratzen dituzten SSIGN eta UISS modelook erabili ziren (24,25).

Espresio zein aktibitatearen analisisan erabilitako giltzurrun-zelulen kartzinomadun gaixoen ezaugarri kliniko eta histologikoak 3.1. Taulan laburbiltzen dira.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

**3.1. Taula. Angiotentsinen entzima bihurtzaileen espresioa eta aktibitatea ikertzeko erabilitako RCC gaixoen ezaugarri kliniko-patologikoak.** Adierazpena, tumore primarioetako parafina laginetan aztertu zen eta aktibitatea aldiz, gaixoen serumean.

CCRCC	Ehun laginak	Serum laginak
	Batezbestekoa (tartea)	Batezbestekoa (tartea)
<b>Adina</b>	70,69 (39-93)	61,42 (36-82)
<b>Generoa (G/E)</b>	76/26	60/29
<b>Jarraipena (hilabetetan)</b>	110,3 (7-204)	32,27 (1-57)
<b>Biziraupena</b>		
Bizirik	64 (%63)	75 (%84)
Gaixotasunez hilak	38 (%37)	14 (%16)
<b>Diametroa</b>		
≤4 cm	35 (%35)	28 (%31)
>4 to 7cm	33.(%32)	39 (%44)
>7 cm	34 (%33)	22 (%25)
<b>Gradua</b>		
G1	21 (%21)	2 (%2)
G2	45 (%44)	46 (%53)
G3	22 (%21)	30 (%34)
G4	14 (%14)	10 (%11)
<b>pT</b>		
pT1	59 (%58)	59 (%66)
pT2	13 (%13)	12 (%14)
pT3	28 (%27)	16 (%18)
pT4	2 (%2)	2 (%2)
<b>PRCC</b>		
<b>Adina</b>	74,79 (58-89)	54,0 (26-80)
<b>Generoa (G/E)</b>	17/4	17/4
<b>ChRCC</b>		
<b>Adina</b>	73,41 (58-94)	64,625 (47-74)
<b>Generoa (G/E)</b>	11/6	7/1
<b>OR</b>		
<b>Adina</b>	84,25 (74-93)	63,45 (40-84)
<b>Generoa (G/E)</b>	4/0	3/7



### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### 3.1.2 ANGIOTENTSINA II PEPTIDOAREN AT1R ETA AT2R HARTZAILEEN SEMI-KUANTIFIKAZIOA

AT1R eta AT2R hartzaileen kuantifikazio erlatiborako, ehun freskotik eratorritako proteinen homogenatuak erabili ziren. Hain zuzen ere, CCRCCdun 47 gaixoren tumore biopsiak eta hauen inguruko ehun ez neoplasikoa homogeneizatu ziren, 3.3.3 atalean deskribatzen den protokoloa jarraituz. Lagin hauen ezaugarri kliniko eta patologikoak 3.2. Taulan laburtzen dira.

**3.2. Taula. AT1R eta AT2R hartzaileen espresioa aztertzeko erabilitako CCRCC gaixoen ezaugarri kliniko-patologikoak.** Bi hartzaileen adierazpena ehun freskoan aztertu zen, tumore ehunetan eta inguruko ehun ez neoplasikoan.

CCRCC	Ehun laginak
	Batezbestekoa (tartea)
<b>Adina</b>	61,1 (36-80)
<b>Generoa</b>	
Gizonezkoa	34 (%72)
Emakumezkoa	13 (%28)
<b>Diametroa</b>	
≤ 7cm	23 (%49)
> 7cm	24 (%51)
<b>Gradua</b>	
G1	0 (%0)
G2	20 (%43)
G3	19 (%40)
G4	8 (%17)
<b>pT</b>	
pT1	23 (%49)
pT2	10 (%21)
pT3	14 (%30)
pT4	0 (%0)

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### 3.1.3 FAP $\alpha$ -REN ESPRESIOA CCRCC GAIXOETAN

FAP $\alpha$ -ren adierazpena CCRCCko tumoreen bi serie ezberdinetan aztertu zen. Aurrena, CCRCCko 208 tumore primarioz osaturiko serie batean analizatu zen. Hauetatik 179 nefrektomia erradikala jasandako pazienteetatik eratorriak ziren eta aldiz gainontzeko 29ak nefrektomia partziala jasandakoetatik. Biziraupenaren analisirako, 177 pazienteen jarraipen klinikoa 2014ko abenduaren 31n itxi zen. 3.3. Taulak gaixoen ezaugarri kliniko-patologikoak batzen ditu.

#### 3.3. Taula. FAP $\alpha$ -ren espresioa aztertzeko erabilitako CCRCC gaixoen ezaugarri kliniko-patologikoak.

CCRCC	Batezbestekoa (%)
<b>Adina (tartea)</b>	66 (25-93)
<b>Generoa</b>	
Gizonezkoa	157 (%75,5)
Emakumezkoa	51 (%24,5)
<b>Jarraipena (hilabetetan)</b>	89,7 (1-240)
<b>Biziraupena</b>	
Bizirik	97 (%54,8)
Gaixotasunez hilak	80 (%45,2)
<b>Tumore primarioa</b>	
<b>Diametroa</b>	
≤ 4cm	67 (%32,2)
> 4cm	141 (%68,8)
<b>Gradu taldekatua</b>	
Baxua (G1-G2)	134 (%64,4)
Altua (G3-G4)	74 (%35,6)
<b>pT taldekatua</b>	
Baxua (pT1-pT2)	148 (%71,2)
Altua (pT3-pT4)	60 (%28,8)

Bestetik, FAP $\alpha$ -ren espresioaren analisisan sakontzeko helburuarekin, serina peptidasa honen adierazpena CCRCC metastasikoa (mCCRCC) zeukaten 59 gaixoren tumore primario zein metastasietako ehunean aztertu zen. Ehun kantitate mugatuaren ondorioz, soilik 54 gaixoren ehun metastasikoan izan zen posible FAP $\alpha$ -ren azterketa immunohistokimikoa.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

Egoera metastasikoari dagokionez, 14 gaixo metastasi sinkronikoekin diagnostikatu ziren, hau da, tumore primarioa diagnostikatzeko unean bertan metastasiak ere aurkitu ziren. Gainontzeko 45ek aldiz, tumore primarioa ezabatzeke kirurgia burutu ostean garatu zituzten metastasiak. Biziraupena aztertu ahal izateko jarraipen klinikoa 2014ko abenduaren 31n itxi zen. Pazienteen ezaugarri klinikoak eta patologikoak 3.4. Taulan laburtzen dira.

3.4. Taula. FAPα-ren espresioa aztertzeke erabilitako mCCRCC gaixoen ezaugarri kliniko-patologikoak.

CCRCC	n (%)
<b>Adina (tartea)</b>	59 (25-83)
<b>Generoa</b>	
Gizonezkoa	45 (%76)
Emakumezkoa	14 (%24)
<b>Jarraipena (hilabetetan)</b>	65 (1-240)
<b>Biziraupena</b>	
Bizirik	21 (%36)
Gaixotasunez hilak	38 (%64)
<b>Tumore primarioa</b>	<b>n (%)</b>
<b>Diametroa</b>	
≤ 7cm	34 (%58)
> 7cm	25 (%42)
<b>Gradu taldekatua</b>	
Baxua (G1-G2)	24 (%41)
Altua (G3-G4)	35 (%59)
<b>pT taldekatua</b>	
Baxua (pT1-pT2)	32 (%54)
Altua (pT3-pT4)	27 (%46)
<b>Sarkomatoidea</b>	
Ez	55 (%93)
Bai	55 (%93)
<b>Nekrosia</b>	
Ez	29 (%49)
Bai	30 (%51)
<b>Metastasiak</b>	<b>n (%)</b>
Sinkronikoak	14 (%24)
Metakronikoak	45 (%76)
<b>Lokalizazioa</b>	
Guruin linfatikoak	12 (%20)
Ehun epitelialak	31 (%53)
Ehun bigunak/hezur ehunak	16 (%27)

## 3.2 ADIERAZPEN GENOMIKOA AZTERKETZECO TEKNIKAK

3.5. Taula. Tesi proiektu honetan adierazpen genomikoa aztertzeko erabilitako, erreaktibo, material suntsikor eta gailuen laburpena.

<b>Erreaktiboak</b>	<b>Erreferentziak</b>
TRizol erreaktiboa	#15596026, ThermoFisher Scientific
Kloroformoa CHCl <sub>3</sub>	#CL01981000, Scharlau
Biologia Molekularrerako Isopropanola	#A3928, PanReac AppliChem
Analisirako etanol absolutua	#121086, Panreac AppliChem
DEPCrekin trataturiko ur ultrapurua	#750023, ThermoFisher Scientific
iScript cDNA sintetizatzekeo Kita	#1708891, BioRad
iTaq Universal SYBR Green Supermix	#1725121, BioRad
<b>Material suntsikorra</b>	<b>Erreferentziak</b>
96 putzuko polipropileno mikroplakak	#PCR-96M2-HS-C, Axygen
Microseal B, PCR plakak zigilatzekeo filma	#MSB-1001, BioRad
<b>Gailuak</b>	<b>Etxe komertziala</b>
Bortize nahasgailua	2x <sup>3</sup> , VELP scientifica
Heraeus Fresco 21 Zentrifuga	ThermoFisher Scientific
Nanodrop ND1000 espektofotometroa	ThermoFisher Scientific
MyCycler termozikladorea	BioRad
CFX96 Realt Time PCR detekzio sistema	BioRad

### 3.2.1 GENEEN ESPRESIOAREN KUANTIFIKAZIO ERLATIBOA

#### **RNA erauzketa**

Kultibo zeluletatik eratorritako RNA totalaren erauzketa TRizol erreaktiboaren bitartez burutu zen. Zelulak, fosfato eta gatzeko tanpoi (PBS) hotzarekin birritan garbitu ondoren, TRizol erreaktiboaren mililitro (ml) batean homogeneizatu ziren, giro tenperaturan (RT) 10 minutuz inkubatuz. Jarraiki,

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

homogeneizatua 1,5 ml-ko edukiera duten eppendorfetan jaso eta 200 mikrolitro ( $\mu\text{l}$ ) kloroformo gehitu zitzaizkion. Bortize bidez nahastu ondoren, 10 minutuz inkubatu zen RTn. Ondoren, aurretik  $4^{\circ}\text{C}$ -tara girotutako zentrifugan, 12000 g-tara (indar zentrifugo erlatiboa) zentrifugatu zen 10 minutuz, homogeneizatua goiko fase urtsu garden, interfase eta behealdeko fase arrosan banatuz. RNA-dun fase urtsua 1,5 ml-ko eppendorf berri batera transferitu eta 500  $\mu\text{l}$  isopropanolekin nahastu zen. 10 min-z RTn inkubatu ostean, RNA 12000 g-tara 10 minutuz zentrifugatu zen prezipitatu zen. Gainjalkina deuseztatu eta RNA pelleta birritan garbitu zen, %75eko purutasuneko etanolarekin eta 7600 g-ko zentrifugazio bitartez. Etanola deuseztatu, RNA garbia lehortzen utzi eta nukleasarik gabeko uretan disolbatu zen. RNAren kontzentrazioa eta kalitatea Nanodrop espektrofotometroaren bidez neurtu ziren.

#### Alderantzizko transkripzioa

Erauzitako RNA-tik gene adierazpena aztertu ahal izateko cDNA sintetizatzeke BioRad merkataritza etxeko iScript cDNA sintetizatzeke Kita erabili zen. Honek mikrogramo ( $\mu\text{gr}$ ) bat RNA erretrotranskribatzeko gaitasuna dauka 20 mikrolitroko bolumenean. 3.6. Taulak erreakzioa burutzeko mixaren osagaiak jasotzen ditu.

3.6. Taula. Alderantzizko transkripzioa burutzeko erabilitako erreaktiboak eta hauen bolumena.

Erreaktiboa	Erreaktiboaren bolumena $\mu\text{l}$ -tan
5x iScript erreakzio mixa	4
iScript alderantzizko transkriptasa	1
RNA	1 $\mu\text{g}$ -raino iristeko behar adina
Nukleasarik gabeko ura	15 - RNA $\mu\text{l}$ -ak
<b>Bolumen totala</b>	<b>20</b>

Erreakzioa, MyCycler termoziklagailuan burutu zen, etxe komertzialak gomendaturiko protokoloa jarraituz (3.1. Irudia). Amaieran, cDNAren kontzentrazioa 50 ng/ $\mu\text{l}$ -takoa zen.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

		95°C	
		1'	
25°C	46°C		
5'	20'		
			4°C
			∞

#### 3.1. Irudia. Alderantziko transkripzioaren protokoloa temperatura zikloen irudikapena.

#### ***Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)***

Intereseko geneen adierazpena modu semi-kuantitaboa analizatu zen *Real Time Polymerase Chain Reaction* bidez, detekzioarako iTaq Universal SYBR Green Supermix zunda fluoreszentea erabiliz.

#### *Hasleak*

Gene ezberdinen detekzioarako jatorri ezberdineko hasleak erabili ziren. Batetik, Harvardeko Unibertsitateak, Massachusettsko Ospitale Orokorrek (MGH) eta Biologia Konputazional eta Integratiborako Zentroak (CCIB) elkarlanean garaturiko PrimerBank hasle basea kontrastatutako primer iturri gisa erabili zen (350). Bestetik, Primer3 softwarea erabili zen hasle ezberdinen diseinurako (351). Kasu bietan, hautaturiko hasleen sekuentziaren ezaugarriak *Integrated DNA technologies (IDT)* etxearen *OligoAnalyzer Tool*, softwarearekin analizatu ziren, hauen egokitasuna baieztatuz 3.7. Taulak hasleen sekuentziak jasotzen ditu. Gainera, hasleen efizientzia eta espezifikotasuna hurrenez hurren kurba patroiak eta disoziazio kurbak erabiliz analizatu ziren. FAP $\alpha$ -ren espresioaren azterketarako hasle komertzialak erabili ziren (QT00074963, Qiagen).

Hasleak jasotzean (liofilizatuta), spin bitartez zentrifugatu eta 100  $\mu$ M-eko kontzentziora doitzeko nukleasarik gabeko haina uretan disolbatu ziren. Hauetatik abiatuz, lanerako diluzioak prestatu ziren, gene bakoitzaren *Forward* eta *Reverse* stock disoluzioetatik hamarna mikrolitro 180  $\mu$ l nukleasarik gabeko urarekin nahastuz. Stock nahiz lanerako diluzioak hozkailuan mantendu ziren -20°C-tan.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### 3.7. Taula. Gene espresioaren analisisirako erabilitako hasleen sekuentziak.

Genea	Sekuentzia 5'--> 3'
E-cadherina	(f) CGAGAGCTACACGTTACGG (r) GGGTGTGAGGGAAAAATAGG
N-cadherina	(f)AGCCAACCTTAACTGAGGAGT (r) GGCAAGTTGATTGGAGGGATG
$\alpha$ SMA	(f) CTATGAGGGCTATGCCTTGCC (r) GCTCAGCAGTAGTAACGAAGGA
Vimentina	(f) AGTCCACTGAGTACCGGAGAC (r) CATTTCACGCATCTGGCGTTC
Snail	(f) TCGGAAGCCTAACTACAGCGA (r) AGATGAGCATTGGCAGCGAG
Slug	(f) CGAACTGGACACACATACAGTG (r) CTGAGGATCTCTGGTTGTGGT
VEGF	(f) GCAGAAGGAGGAGGGCAGAATG (r) GGGCACACAGGATGGCTTGAAG
HIF1 $\alpha$	(f) ATCCATGTGACCATGAGGAAATG (r) TCGGCTAGTTAGGGTACACTTC
HIF2 $\alpha$	(f) GGACTIONACAGGTGGAGCTA (r) TCTCACGAATCTCCTCATGGT
TGF $\beta$ 1	(f) CTAATGGTGGAAACCCACAACG (r) TATCGCCAGGAATTGTTGCTG
MMP2	(f) AGCTCCCGGAAAAGATTGATG (r) CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT
MMP9	(f) CCTGGAGACCTGAGAACCAATC (r) GATTCGACTCTCCACGCATCT
GAPDH	(f) ACCCACTCCTCCACCTTTGA (r) CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
$\beta$ -actina	(f) GGCACCCAGCACAAATGAAG (r) CCGATCCACACGGAGTACTTG
hTBP	(f) GGATAAGAGAGCCACGAACCAC (r) TTAGCTGGAAAACCCAATTCTG

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### *Erreakzio mixaren prestaketa*

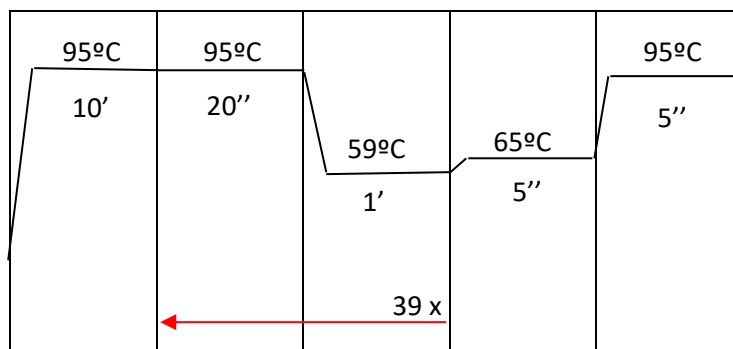
Erreakzio bakoitzaren 3 erreplika burutu ziren, 20 ng cDNAtik abiatuta eta 10 µl-ko bolumen finalean. 3.8. Taulak mixaren osagaiak eta bakoitzaren proportzioa jasotzen ditu.

**3.8. Taula. qPCR erreakzioa burutzeko erabiliko erreaktiboen zerrenda eta bakoitzaren bolumena.**

ERREAKZIO MIXaren osagaia	Bolumena (µl)
iTaq Universal SYBR Green Supermix 2x	5
F&R hasleen lanerako diluzioa	0,17
Nukleasarik gabeko H <sub>2</sub> O	0,83
cDNA (5ng/ µl)	4
<b>Bolumen totala</b>	<b>10</b>

#### *Protokoloa*

qPCR BioRad etxe komertzialeko CFX96 Real Time PCR detekzio sistemarekin gauzatu zen, hasleen ezaugarrietara egokituriko protokoloarekin (3.2. Irudia).



**3.2. Irudia. qPCRren protokoloaren tenperatura zikloen irudikapena.** Azken bi pausoek disoziazio kurba irudikatzen dute.

#### *Emaitzen analisia*

3 erreplikaren batez bestekoa erabili zen emaitzen analisirako. Desbiderapen estandarra 0,2 unitate baino txikiagoa zen kasuetan soilik eman zen ontzat. Gene adierazpenaren kuantifikazio erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoaren bitartez burutu zen (352).



### 3.3 PROTEINEN AZTERKETARAKO TEKNIKAK

#### 3.3.1 PROTEINEN ESPRESIOAREN ANALISIA IHC-P BIDEZ

3.9. Taula. Proteinen immunohistokimika bidezko detekzioan erabilitako, erreaktibo, material suntsikor eta gailuen zerrenda.

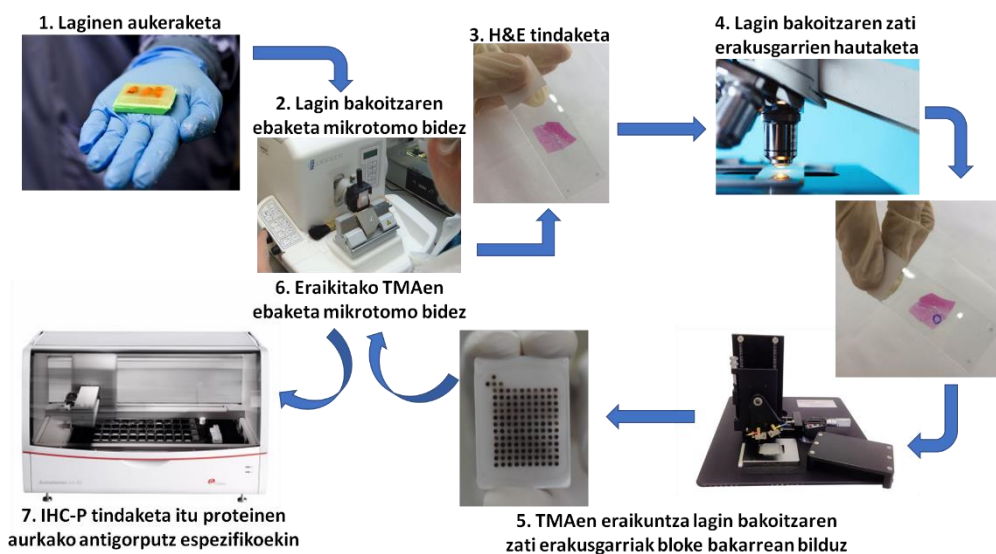
<b>Erreaktiboa</b>	<b>Erreferentzia</b>
Etanola	#121086, Panreac
Xilenoa	#1.0861.1000, Merck
Envision FLEX + bisualizazio sistema	#K8002, Dako Agilent
<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH altuko soluzio antigeno berreskuratzailea</li> <li>• pH altuko soluzio antigeno berreskuratzailea</li> <li>• Erreaktibo peroxidasa blokeatzailea</li> <li>• Antigorputz diluitzailea</li> <li>• FLEX+ Untxitik eratorritako antigorputz sekundarioa</li> <li>• FLEX+ Sagutik eratorritako antigorputz sekundarioa</li> <li>• FLEX/HRP ahuntzetik eratorritako untxi eta saguaren aurkako antigorputza</li> <li>• FLEX DAB+ kromogenoa</li> <li>• FLEX hematoxilina</li> <li>• FLEX garbiketa tanpoia</li> </ul>	#K8004 #K8005 #SM801 #K8006 #K8009 #K8021 #SM802 #DM827 #K8008 #DM831
DPX histologiarako muntaia medioa	#44581, Sigma-Aldrich
<b>Material suntsikorra</b>	<b>Erreferentzia</b>
Mikroskopiorako FLEX portak	#K8020
Beirazko estalkiak	C7931, Sigma-Aldrich
<b>Gailua</b>	<b>Etxe komertziala</b>
Hotcold S Inkubagailu lehorra	Selecta
Mikrotomoa	Shandon Finesse
Varistain Gemini ES porta tindatzaile automatikoa	ThermoFisher Scientific
Manual Tissue Arrayer	MTA-1, Beecher
PT Link tindaketa aurretiko modulua	Dako Agilent
AutoStainer Link 48	Dako Agilent
Nikon Eclipse 80i mikroskopioa	Nikon Instruments

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### Ehun mikroarrayen (TMA) eraikuntza

Ehun mikro arrayek lagin kopuru handien analisia simultaneoki eta kostuen murrizketa nabarmenarekin burutzea ahalbideratzen dute eta ondorioz, tresna eraginkorrak dira ikerketa patologikoan. Tesi proiektu honetan aztergai diren proteinen adierazpena parafinaz beteriko laginetan burutu da, horretarako ehun mikroarrayak eraiki direlarik. 3.3 Irudiak mikroarrayen eraikuntzaren fase ezberdinak jasotzen ditu.

Lehenik eta behin, mikrotomo bidez, lagin bakoitzaren 5 mikrometroko ( $\mu\text{m}$ ) zabalerako ebaketak burutu ziren, hauek portatan jaso eta 16 orduz 37°C-tan lehortu zirelarik. Jarraiki, Thermo Fisher etxe komertzialeko Varistain Gemini ES tindatzaile automatikoarekin hematoxilina-eosina tindaketak burutu ziren. Prestakin hauetan, patologoak tumore bakoitzaren erakusgarri den lagina hautatu zuen.



**3.3 Irudia. Ehun mikroarrayen (TMA) eraikuntzaren infografia parafinaz beteriko ehunetatik abiatu eta tindaketa fasera iritsi arte.**

Patologoak tumore bakoitzean hautaturiko lagin erakusgarriak parafinazko bloke garbi batean elkartuz eraiki ziren ehun mikroarrayak. Horretarako Beecher Instruments etxearen Manual Tissue Arrayer (MTA-1) erabili zen. Hala, 1,5 mm diametroko puntzoiekin lagina jaso eta bloke hartzailera transferitu zen. Tumore

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

bakoitzeko 2 lagin transferitu ziren, eta bloke bakoitzean 42 tumore ezberdinez gain, giltzurruneko ehun osasuntsua eta tindaketetarako kontrol ehunak ere gehitu ziren. Behin mikroarraya osatuta, 37°C-tan 30 minutuz berotu eta porta baten laguntzaz zigilatu zen. Hauetatik, 5 mikrometroko ebaketak burutu ziren tindaketak egiteko.

#### **Immunohistokimika (IHC-P)**

Intereseko proteinaren espresioa automatizaturiko immunohistokimika bidez aztertu zen eta horretarako DAKO Agilent *Pathology Solutions* etxearen AutoStainer Link 48 tindatzailea erabili zen.

Aplikaturiko protokolo estandarra antigorputz bakoitzaren ezaugarri espezifikotara egokitu zen. Honela, TMA ezberdinetatik eratorritako ebaketak, 65°C-tara berotu ziren ordubetez, parafina soberakina ezabatzeko. Hurrena, DAKO Agilent *Pathology Solutions*en PT Link tindaketa-aurretiko moduluan, ehun laginen desparafinazioa, rehidratazioa eta antigeno berreskurapena gauzatu ziren, helburu hori pauso bakarrean egin ahal izateko optimizaturiko tanpoien bitartez. Modulu honetan laginak pH azido (pH = 6) edo basikoko (pH = 9) tanpoietan (antigorputz ezberdinek ezagaturiko epitopoaren arabera) murgildu eta 95°C-ko 20 minutuko zikloa aplikatu zitzairen. Jarraiki, portak PT Link modulutik atera eta garbiketa tanpoian mantendu ziren giro tenperatura berreskuratu bitartean.

Tindaketa prozesua modu erabat automatikoan burutu zen AutoStainer Link 48an. Lehenik eta behin peroxidasa entzimak blokeatu ziren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>rekin 5 min-z inkubatuz, emaitzan interferentziak ekiditeko. Jarraiki, TMA bakoitzaren ebaketak antigorputz primario ezberdinekin inkubatu ziren, 3.10. Taulan jasotzen diren baldintzetan. Hau deuseztatu ostean, antigorputz primarioaren jatorri espeziaren arabeko antigorputz sekundarioarekin inkubatu zen 30 minutuz, beharrezkoa zen kasuetan. Ondoren, porta guztiak HRP entzimadun antigorputzekin inkubatu ziren 20 minutuz eta gero, honen substratu DAB gehitu zitzairen. Entzimaren eraginez, DABk prezipitatu marroi bat sortzen du. Amaitzeko portak hemotaxilinarekin

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

inkubatu ziren, zeinak nukleoaren tindaketa urdinaren bitartez zelulen egiturak ikustea errazten duen. Kontrol negatiborako, antigorputz primarioa beharrean, antigorputz diluitzaile hutsez inkubatu ziren portak.

Behin tindaketa amaituta, portak hurrenez-hurren etanol kontzentrazio gorakorreko soluzioetan (%50/%70/%100) 5 minutuz inkubatuz deshidratatu eta xilenotan inkubatuz finkatu ziren. Amaitzeko DPX muntaia medioa gehitu eta estalkia kokatuz, mikroskopia bidezko analisirako prestatu ziren.

**3.10. Taula. Immunohistokimika bidez aztertutako proteinen detekzioarako erabilitako antigorputzak eta hauen protokolo optimizatuaren ezaugarriak. (\*)AR Antigen Retrieval edo berreskurapena.**

Antigorputza	Jatorrizko espeziea	AR*	Diluzioa	Inkubazio denbora	Ab 2 <sup>º</sup> a
<b>Anti CD10 (SPM118) sc-52994</b>	Sagua (monoklonala)	pH=9	1:100	20'	Ez
<b>Anti ACE2 (AC18Z) sc-73669</b>	Sagua (monoklonala)	pH=6	1:50	30'	Bai
<b>Anti Aminopeptidase A ab109775</b>	Untxia (poliklonala)	pH=6	1:250	50'	Ez
<b>Anti ACE ab11734 (2E2)</b>	Sagua (monoklonala)	pH=6	1:20	30'	Bai
<b>Anti FAP<math>\alpha</math> ab53066</b>	Untxia (poliklonala)	pH=9	1:70	50'	Ez
<b>Anti Vimentin (Vim3B4) #760-2512</b>	Sagua (monoklonala)	pH=9	RTU	20'	Ez
<b>Anti E-cadherin (36) #760-4497</b>	Sagua (monoklonala)	pH=9	RTU	20'	Ez
<b>Anti N-cadherin (D4R1H) #13116S</b>	Untxia (monoklonala)	pH=6	1:100	20'	Ez
<b>Anti Beta-catenin (14) #760-4242</b>	Sagua (monoklonala)	pH=9	RTU	20'	Ez
<b>Anti WT1 (6F-H2) #</b>	Sagua (monoklonala)	pH=9	RTU	20'	Ez

#### Immunohistokimika bidezko tindaketaren analisia

Inmunohistokimika bidez burututako tindaketaren analisia kualitatiboa izan zen. Hau da, RCCko tumoretan aztertutako peptidasen presentzia edo ausentzia ikertu zen modu absolutuan.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### 3.3.2 ANGIOTENTSINA PEPTIDO BIHURTZAILEEN AKTIBITATEAREN NEURKETA

3.11. Taula. Angiotentsinen peptido bihurtzaileen aktibitatearen neurketarako erabilitako erreaktibo, material suntsikor, tanpoi eta gailuen taula.

Erreaktiboa	Erreferentzia
Fosfatozko gatzak	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}</math></li> <li>• <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math></li> </ul>	#106346, Merck Millipore S8076, Sigma-Aldrich
Trizma-base	T1503, Sigma-Aldrich
Behitik eratorritako serumeko albumina (BSA)	A7906, Sigma-Aldrich
H-Glu- $\beta$ -naphtylamina APA substratua	K1265, Bachem
$\beta$ -naphtylamina	N8381, Sigma Aldrich
N-Dansyl-D-Ala-Gly- <i>p</i> -nitro-Phe-Gly NEP substratua	D2155, Sigma-Aldrich
Dansyl Chloride fluoroforoa	D39220, Sigma-Aldrich
Abz-Gly-Pro- <i>p</i> Nitro-Phe-Pro-OH ACE substratua	M-1100, Bachem
Abz-Ser-Pro-3-Nitro-Tyr-OH ACE2 substratua	M-2660, Bachem
Abz-Gly-OH-HCl fluoroforoa	E-2920 ,Bachem
DL-Thiorphan	T-6031, Sigma-Aldrich
1-10 Phenanthroline	131377, Sigma-Aldrich
Captopril	C4042, Sigma-Aldrich
DX600	AS-62337, AnaSpec
Material suntsikorra	Erreferentzia
96 putzuko fluoreszentziarako plaka beltzak	#3915, Corning
Tanpoiak	Osagaiak
Fosfatozko tanpoia	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1M, BSA 1mgr/ml
Tris-tanpoia	Tris 0,1M, BSA 1 mgr/ml
Gailua	Etxe komertziala
FluoStar OPTIMA microplate Reader	BMG Labtech

### 3. **Materialak eta metodoak.** Materiales y métodos

Aktibitatearen neurketa entzimek substratu espezifikoak hidrolizatzean askatzen dituzten molekula fluoreszenteen detekzioan oinarritzen da. Entseguak, plasma lagina substratuaren kontzentrazio aseko disoluzioetan inkubatuz egiten dira entzimen aktibitate maximoa bermatzeko. Produktu fluoroforoaren kontzentrazio gorakorrekin eginiko zuzenek, fluoreszentzia erlatiboaren datuak sorturiko produktuaren pikomolekulara eraldatzea ahalbideratzen dute. Honela, aktibitatearen emaitzak, peptidasa unitateak (UP)/plasma litroko unitatean aurkezten dira, non peptidasa unitate bat, minutuko produktuaren pikomol bat sortzeko behar den entzima kantitatea den. Erreakzio bakoitza hirutan errepikatu zen P96ko plaketan detekziorako FluoStar OPTIMA *microplate Reader* espektrofluorimetroa erabiliz.

#### **NEP/CD10 aktibitatea**

Endopeptidasa neutroaren (NEP/CD10) aktibitatea Florentin eta lankideek diseinaturiko metodoa baliatuz neurtu zen (353). Hala, serum laginaren 30  $\mu\text{l}$  N-dansyl-D-Ala-Gly-pNO<sub>2</sub>-PheGly (DAGNPG, dansyl-aren deribatu bat, Sigma-Aldrich) substratuaren 1 mM Tris tanpoiarekin inkubatu ziren, 100  $\mu\text{l}$ -ko bolumen totalen, 37°C-tan eta 30 min-z. NEP/CD10 aktibitatearen eraginez sorturiko [D]AGk emitituriko fluoreszentzia, 340 nm-ko uhin luzeran kitzikatu eta 560 nm-tan jaso zen. Emaitzak, [D]AGren 0.625–150  $\mu\text{M}$ -eko kontzentrazioen arteko zuzenarekin bihurtu ziren. Erreakzioaren espezifikotasuna inhibizio entsegu bidez baieztatu zen thyorphan konposatuaren 10  $\mu\text{M}$ -eko kontzentrazioan %93ko inhibizio-tasa lortuz.

#### **APA aktibitatea**

Amino-peptidasa A-ren aktibitatea neurtzeko Tobe eta lankideek deskribaturiko metodoaren egokitzapena erabili zen (354). Entsegu fluorometrikoa 10  $\mu\text{l}$  serum Glu- $\beta$ -naphthilamida, APAren substratu espezifikoaren 0,227 mM-eko fosfatozko disoluzioan 30 min-z inkubatuz egin zen, 37°C-tan eta 200  $\mu\text{l}$ -ko bolumenean.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

Askaturiko  $\beta$ -naphthilaminaren seinalea 410 nm-ko uhin luzeran jaso zen 340 nm-tan kitzikatu ostean. Fenantrolinarekin garaturiko inhibizio entseguek %87ko espezifikotasuna erakutsi zuten, inhibitzailearen 1,2 mM-eko kontzentrazioan. Emaizten estrapolaziorako  $\beta$ -naphthilaminaren 1,5 eta 500  $\mu$ M arteko zuzena erabili zen.

#### **ACE eta ACE2 aktibitateak**

ACE zein ACE2ren aktibitate entzimatiakoaren neurketa bakoitzaren aktibitatearen ondorioz sorturiko Abz-Gly-OH fluoroforoaren seinalea neurtuz burutu zen. Horretarako, Tris tanpoian disolbatutako Abz-Gly-Phe(NO<sub>2</sub>)-Pro eta Abz-Ser-Pro-NTyr-OH substrato espezifikoak erabili ziren hurrenez hurren.

ACEren kasuan, *Nature Protocols*en Sentandreu eta Toldrák deskribaturiko metodoa aplikatu zen (355). Hala, 50  $\mu$ l plasmari 250  $\mu$ l substratu disoluzio gehitu zitzaizkion, honen amaierako kontzentrazioa 0,45 mM-ekoa zelarik. 30 minutuz 37°C-tan inkubatu ostean, produktuaren fluoreszentzia 410 nm-tan neurtu zen, 310 nm-ko uhin luzeran kitzikatu ondoren. Captopril 10  $\mu$ M-eko kontzentrazioan eginiko inhibizio entseguek, espezifikotasuna baieztatu zuten.

ACE2rentzat aldiz, Yan ZH eta lankideek 2003. urtean proposaturiko metodoa egokitu zen (356). Kasu honetan 30  $\mu$ l plasmari 0,5 mM-eko substratu disoluzioa gehitu zitzaion 100  $\mu$ l-raino, 37°C-tan 2 orduz inkubatuz. Askaturiko fluoroforoa ACEren erreakzioan askaturiko bera izanik, baldintza berdinetan neurtu zen. Espezifikotasuna, DX600 inhibitzailearen 1  $\mu$ M-ekin berretsi zen. ACE zein ACE2ren kasuan, fluoreszentzia unitate erlatiboetatik produktu kontzentrazioarako konbertsioa, produktuaren 2,5 eta 300  $\mu$ M arteko kurbarekin burutu zen.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### 3.3.3 PROTEINA ADIERAZPENAREN SEMI-KUANTIFIKAZIOA WESTERN BLOT TEKNIKAREN BITARTEZ

3.12. Taula. Proteinen Western Blot bidezko detekziorako erabilitako erreaktibo, tanpoi, material suntsikor eta gailuen zerrenda.

Erreaktiboak	Erreferentzia
RIPA tanpoia	R0278, Sigma-Aldrich
cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	04693159001, Roche
PhosSTOP	04906845001, Roche
Pierce BCA Protein Assay Kit	#23225, Thermo Scientific
Precision Plus Protein Dual Color Standards	#1610374, BioRad
30% Acrylamide/Bis Solution 29:1	#1610156, BioRad
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine TEMED	T9281, Sigma-Aldrich
Amonio persulfatoa PSA	A3678, Sigma-Aldrich
Behitik eratorritako serumeko albumina (BSA)	A7906, Sigma-Aldrich
Trizma Base	T1503, Sigma-Aldrich
SDS	#142363.1209 PanReac, Applichem
Bromofenol urdinaren sodio gatza	B5525, Sigma-Aldrich
Glizina	G8898, Sigma-Aldrich
Glizerola	G7757, Sigma-Aldrich
MetOH	#141091.1214 PanReac, Applichem
NaCl	#31414, Sigma-Aldrich
Tritón X-100	X100, Sigma-Aldrich
Luminola	A8511, Sigma-Aldrich
Azido p-kumarikoa	C9008, Sigma-Aldrich
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H1009, Sigma-Aldrich



### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

<b>Tanpoiak</b>	<b>Osagaiak</b>
Tris 1M pH=8,8	121,4 gr/l H <sub>2</sub> O pH doiketarekin
Tris 0,5M pH=6,8	60,7 gr/l H <sub>2</sub> O pH doiketarekin
SDS %10 p/b	10 gr/100 ml H <sub>2</sub> O
Amonio Persulfatoa (PSA) %10 p/b	10 gr/100 ml H <sub>2</sub> O
Lagin tanpoia 5x	SDS %10 p/b, Tris pH 6,8 %25 b/b, bromofenol urdina %0,025 p/b, glizerola %50 b/b, DTT %5 p/b
Elektroforesi tanpoia 1X	Tris 25mM, SDS %0,1, Glizina 0,2M
Transferentzia tanpoia 1X	Tris 25mM, SDS %0,025, Glizina 0,192M, MetOH %20 b/b
BSA %5 blokeo tanpoia	5 gr BSA/100 ml blotto
Blotto garbiketarako tanpoia	Tris 20mM, NaCl 150mM, Triton X-100 %0,1
Kimiolumineszentzia areagotzeko substratu tanpoia (ECL)	Luminol 1,25mM, azido p-kumarikoa 0,2mM, Tris 0,1M
<b>Material suntsikorra</b>	<b>Erreferentzia</b>
Amersham Hybond P 0,2 µm PVDF	#10600021, GE Healthcare Life Sciences
Whatman papera	FT-2-527-460570N, Sartorius
<b>Gailua</b>	<b>Etxe Komertziala</b>
Heraeus Fresco 21 Zentrifuga	ThermoFisher Scientific
Micra D-1 homogeneizagailua	Micra
Heidolph GIRALT homogeneizagailua	Heidolph
Power Pac HC Power Supply	#1645052, BioRad
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	BioRad
Criterion Blotter	BioRad
Chemidoc XRS+	BioRad

Kultibo zelularretatik nahiz ehun freskotik erauzitako homogeneizatueta proteinen espezifikoen adierazpena neurtzeko Western Blot teknika erabili zen. Hau, antigorputz espezifikoen erabileran oinarritzen da.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### **Proteinen erauzketa**

Erauzketa prozesua proteinen jatorriaren araberakoa da. Kultibo zelularren kasuan, P6 plaketan hazitako zelulak izotzetan kokatu eta PBS tanpoi hotzarekin garbitu ziren, birritan. Jarraiki proteasa eta fosfatasa inhibitzailearekin osaturiko RIPA tanpoiaren 100  $\mu$ l gehitu zitzaizkion. 10 minutuko inkubazioaren ostean, homogeneizatua 1,5 ml-ko eppendorf batera jaso zen, espatula baten laguntzaz. 15 min-z 21000 g-tara zentrifugatu ostean, gainjalkina eppendorf berri batean jaso zen.

Ehun freskoan aldiz honen 50 mg pisatu eta bisturi batekin zatikatu ostean, aipaturiko RIPA eta inhibitzaileez osaturiko tanpoiaren 500  $\mu$ l-tan jaso ziren. Hau, ultraturraxean (Micra D-1) 10000 rpm-tara 10 segunduz eta ondoren potter homogeneizagailuan 800 rpm-tara homogeneizatu zen. Behin homogeneizazioa gauzaturik, 45 min-z inkubatu zen 4°C-tara, proteinen erauzketa bermatzeko. Jarraiki homogeneizatua 1,5 ml-ko eppendorfera transferitu eta 14000 g-tara zentrifugatu zen, 4°C-tara eta 30 minutuz. Gainjalkina jaso, alikuotatu eta -20°C-tan gorde zen.

#### **Proteinen kontzentrazioaren neurketa**

Erauzitako proteina homogeneizatuen kontzentrazioa neurtzeko Smithek 1985ean deskribaturiko azido bizinkoninikoaren (BCA) metodoa erabili zen (357). Hau, peptido loturek soluzioko  $\text{Cu}^{2+}$  ioiak erreduzitzeko duten gaitasunean oinarritzen da, zein  $\text{Cu}^+$  bihurtzean, azido bizinkoninikoaren bi molekularekin lotzen den more koloreko konposatua sortuz. Konposatu honek 562 nm-ko uhin luzeran daukan absorbantziak, proteinen kontzentrazioa neurtzea ahalbideratzen du, proteina kontzentrazio ezaguneko soluzioekin eraikitako zuzenaren bitartez.

Erreakzioa, P96 plaketan burutu zen. Hala, laginaren 12,5  $\mu$ l azido bizinkoniniko/ $\text{CuSO}_4$  50:1 disoluzioaren 100  $\mu$ l-rekin inkubatu ziren 37°C-tan 30 minutuz. Lagin bakoitzarentzat 3 aldiz errepikatu zen erreakzioa. Aldi berean, 0,2 eta 1  $\mu$ g/ $\mu$ l arteko behitik eratorritako seroalbumina (BSA) zuzena ere eraiki zen. Absorbantzia neurtzeko, FluoStar OPTIMA mikroplaka irakurgailua erabili zen. Absorbantzia balioetatik laginen kontzentrazioa kalkulatu zen  $\mu$ g/ $\mu$ l unitatetan.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### Western Blot

Proteina espezifikoen detekziorako metodo hau 80. hamarkadaren amaieran garatu zen Harry Towbinen laborategian, Friedrich Miescher institutuan eta pauso ezberdinez osaturiko prozesua da (358). Lagin bakoitzetik 15 µgr-ko alikuotak hartu, 1,5 µgr/µl-ko kontzentrazioa doitu eta lagin tanpoia 5x gehitu zitzairen. Hauek 100°C-tara 10 minutuz berotuz desnaturalizatu ziren. Jarraiki, pisu molekular ezaguneko estandarrekin batera, akrilamidazko geletan kargatu ziren. Ikergai ziren proteinak 30 eta 70 KDa artekoak izaki, %12 akrilamidadun gelak erabili ziren, hauen konposizioa azpiko taulan laburbiltzen delarik (3.13. Taula). Proteinen tamainaren arabera banaketa gelei 120 V-etako potentzial diferentzia aplikatuz gauzatu zen, BioRad etxeko Mini PROTEAN Tetra elektroforesirako gailuarekin. Energia iturri gisa etxe bereko PowerPac HC *Power Supply* erabili zen.

**3.13. Taula. Elektroforesi bidezko proteinen banaketarako erabilitako gelak egiteko erreaktiboak eta hauen proportzioak.**

Gel banatzailea		Gel kontzentratzailea	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,67 ml	<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,5 ml
<b>Tris 8,8M pH=8,8</b>	1,25 ml	<b>Tris 0,5M pH=6,8</b>	0,625 ml
<b>Bis Akrilamida</b>	2 ml	<b>Bis Akrilamida</b>	330 µl
<b>SDS %10</b>	50 µl	<b>SDS %10</b>	25 µl
<b>PSA %10</b>	25 µl	<b>PSA %10</b>	12,5 µl
<b>Temed</b>	5 µl	<b>Temed</b>	5 µl

Proteinak banatu ostean 0,22 µm-ko porodun PVDFzko mintzera transferitu ziren. Horretarako, transferentzia semi-lehorra deritzona erabili zen Mini Trans Blot Cell unitatea erabiliz. Proteinadun gela, PVDFzko mintzarekin kontaktuan jarri, whatman paperrarekin eta kuxinekin inguratu eta korrante bat aplikatzen zaio transferentziarako tanpoi batean murgilduz. Ondorioz, proteinak geletik mintzera lekualdatzen dira. 100V-eko korrantea ordubetez aplikatu zen, elektroforesirako erabilitako energia iturri beraren bitartez.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

Ordoren, antigorputzen lotura ez espezifikoak ekiditeko helburuarekin, PVDF mintza BSA %5eko disoluzioan blokeatu zen, giro tenperaturan ordubetez inkubatu. Jarraiki, mintza antigorputz primarioarekin inkubatu zen, 4°C-tan *overnight* inkubazio bidez. Erabilitako antigorputzen ezaugarriak eta baldintzak 3.14. Taulan laburbiltzen dira.

**3.14. Taula. Western Blot bidez aztertutako proteinen detekzioarako erabilitako antigorputzak eta erabilitako diluzioak.**

<b>Antigorputza</b>	<b>Etxe komertziala</b>	<b>Jatorrizko espeziea</b>	<b>Diluzioa</b>
<b>Anti AT1 (N10) sc-1173</b>	Santa Cruz	Untxia (poliklonala)	1:500
<b>Anti AGTR2 antibody ab78747</b>	Abcam	Untxia (poliklonala)	1:1000 (1µg/ml)
<b>Anti-Angiotensin-(1-7) Mas Receptor AAR-013</b>	Alomone Labs	Untxia (poliklonala)	1:500
<b>Anti FAPα ab53066</b>	Abcam	Untxia (poliklonala)	1:500
<b>Monoclonal Anti-β-Actin-Peroxidase AC-15 A3854</b>	Sigma-Aldrich	Sagua (monoklonala)	1:25000
<b>Anti-α-Tubulin antibody T8203</b>	Sigma-Aldrich	Sagua (monoklonala)	1:3000
<b>Anti-rabbit IgG-HRP antigorputz sekundarioa sc-2004</b>	Santa Cruz	Ahuntza	1:2000
<b>Anti-mouse IgG-HRP antigorputz sekundarioa sc-2005</b>	Santa Cruz	Ahuntza	1:2000

Antigorputz primarioaren inkubazio ostean, mintzak blotto tanpoiarekin garbitu ziren, elkarren segidako 5 minutuko 3 inkubazioen bitartez. Hurrena, mintzak, antigorputz primario bakoitzari jatorrizko espeziearen arabera dagokion antigorputz sekundarioarekin inkubatu ziren (1:2000), giro tenperaturan ordubetez. Elkarren segidako beste 3 garbiketaren ostean, kimiolumineszentzia bidez errebelatu zen. Horretarako, ECL substratua erabili zen, zeinak antigorputz sekundarioei atxikitako HRP entzimarekin erreakzionatzean, argia emititzen duen. Honen detekzioarako BioRad etxeko Chemidoc XRS+ sistema erabili zen eta *Quantity One* softwarea. Emaitzen kuantifikazio erlatiborako aldiz ImageJ softwarea.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### 3.3.4 IMMUNOFLUORESZENTZIA (IF)

**3.15. Taula. Immunofloreszentzia bidez proteinak detektatzeko erreaktibo, tanpoi, material suntsikor eta gailuen zerrenda.**

<b>Erreaktiboak</b>	<b>Erreferentzia</b>
PBS 10x	BE17-517Q, Lonza
Formaldehidoa %38	#141328, Panreac AppliChem
Tritón X-100	X100, Sigma-Aldrich
Behi fetuetatik eratorritako serum	S0415, Biochrom GmbH
DPX histologiarako muntaia medioa	#44581, Sigma-Aldrich
Hoechst 33258	#861405, Sigma-Aldrich
Fluoromount G	#00-4958-02, Life Technologies
<b>Material suntsikorra</b>	<b>Erreferentzia</b>
Estalki zirkularrak	#12893804, ThermoFisher Scientific
<b>Gailua</b>	<b>Etxe komertziala</b>
Apotome 2 mikroskopioa	Zeiss

Kultibo zeluletatik abiatutako immunofluoreszentzia garatzeko, zelulak etanolez garbitutako estalkietan erein ziren, P24ko plaketan. Behin zelulen entsegua amaituta, zelulak birritan fosfatozko tanpoiarekin garbitu eta %4 paraformaldehido kontzentrazioko soluzioarekin 10 minutuz inkubatuz finkatu ziren. Jarraiki, PBSrekin garbitu ziren, elkarren jarraikako 5 minutuko 3 inkubazioarekin. Ondoren, zelulak %0,1 Triton X-100 detergentedun soluzioarekin inkubatuz iragazkor bihurtarazi ziren. 3 garbiketa ziklo egin ostean, zelulak blokeatzeko %5 behi fetuen serumeko (FBS) soluzioarekin inkubatu ziren, 30 minutuz giro tenperaturan. Hurrena antigorputz primarioarekin inkubatu zen, zein %3 FBS soluzioan prestatu zen espezifikotasuna areagotzeko, gau guztian zehar eta 4°C-tan. Antigorputzen ezaugarriak 3.16. Taulan zehazten dira.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

3.16. Taula. Immunofluoreszentzia bidez aztertutako proteinen detekzioarako erabilitako antigorputzak eta erabilitako diluzioak.

Antigorputza	Etxe komertziala	Jatorrizko espeziea	Diluzioa
<b>Anti FAP<math>\alpha</math> ab53066</b>	Abcam	Untxia (poliklonala)	1:500
<b>Alexa Fluor 488, A21206</b>	Life technologies	Ahuntza	1:1000

Antigorputz primarioa deuseztatu ostean, PBSarekin hirutan garbitu eta Alexa Fluor 488 fluoroforoarekin konjugaturiko antigorputz sekundarioarekin (1:1000) inkubatu zen, ordubetez, giro tenperaturan eta iluntasunean. Jarraian Hoechst 33258 10 lg/ml tindatzailea fluoreszentea gehitu zitzairen, zeinak DNArri lotuz nukleoak markatzen dituen. Amaitzeko, Fluoromount G muntairako medioa erabiliz, zelulak mikroskopia bidezko behaketarako prest utzi ziren. Kontrol negatiborako antigorputz primarioaren inkubazioa PBSzko inkubazioarekin ordezkatu zen.

Mikroskopia bidezko behaketa eta irudiak Euskal Herriko Unibertsitateko EHU/UPV Ikerkuntzarako Zerbitzu Orokorretako (SGIker) mikroskopia unitatean burutu ziren.

### 3.4 ZELULEN KULTIBORAKO TEKNIKAK

3.17. Taula. Zelulen kultibo teknikak garatu ahal izateko erabilitako errektibo, material suntsikor eta gailuen zerrenda.

<b>Erreaktiboa</b>	<b>Erreferentzia</b>
PBS 10x	BE17-517Q, Lonza
Trypsin-Versene (EDTA) Mixture 1x	BE17-161F, Lonza
Kultibo medioak	Lonza
Behi fetuetatik eratorritako serum (FBS)	S0415, Biochrom GmbH
Penizilina/estreptomizina antibiotikoa	P4333, Sigma-Aldrich
L-glutamina	G7513, Sigma-Aldrich
Aminoazido ez esentzialak (NEAA)	M7145, Sigma-Aldrich
Sodio pirubatoa	S8636, Sigma-Aldrich
Angiotentsina II peptidoa	A9525, Sigma-Aldrich
Angiotentsina 1-7 peptidoa	A9202, Sigma-Aldrich
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	M5655, Sigma-Aldrich
DMSO	D8418, Sigma-Aldrich
<b>Material suntsikorra</b>	<b>Erreferentzia</b>
75 cm <sup>2</sup> -ko kultiborako plakak	#430641, Corning
6 putzuko zelulen kultiborako plakak	#3506, Corning
24 putzuko zelulen kultiborako plakak	#3524, Corning
96 putzuko zelulen kultiborako plakak	#3596, Corning
24mm-ko 0,4 µm-dun <i>insertak</i>	#3412, Corning
Kriotuboak	#368632, Nunc
<b>Gailua</b>	<b>Etxe komertziala</b>
Fluxu laminar bertikaleko Bio48 Kanpaia	F72700350, Faster
Zelulen hazkuntzarako CO <sub>2</sub> inkubagailua	MCO-15AC, Sanyo
Bainu termostatiko analogikoa	TBN-06/100, ICT SL
Errotore baskulanteke zentrifuga	Heraeus MegaFuge 40R, Thermo
Mikroskopia alderantzikatua	Eclipse TS100, Nikon
Mikroskopiaari atxikitako kamera	D07739, Jenoptik
MrFrosty zelulak izozteko ontzia	ThermoFisher Scientific
Nitrogeno likidorako tankea	GT-40, Air Liquide

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### 3.4.1 LERRO ZELULARRAK

Ikerketa proiektu honen garapenean giltzurrun-zelulen kartzinomatik eratorritako zelula lerro komertzial ezberdinak erabili dira. Hauetaz gain, fibroblastoen lerro bat ere erabili zen. Aurrenekoak *Cell line service* (CLS) konpainian erosi ziren eta fibroblastoak aldiz Genovako *Banca Biologica e Cell Factory-IRCCS AOU San Martino-IST*en bitartez eskuratu genituen. Bakoitzaren ezaugarriak eta erabilitako kultibo medioak 3.18. Taulan laburbiltzen dira.

**3.18. Taula. In vitro entseguetarako erabilitako lerro zelularren zerrenda. Bakoitzaren jatorriaz eta hazkuntzarako beharrezko medioa ere batzen ditu.**

Lerro zelularra	Ezaugarriak	Kultibo medioa
RC124	RCCdun gaixo baten giltzurruneko ehun ez neopasikotik eratorritako zelula epitelialak.	McCoy's 5A #12-668F
786O	CCRCCdun 58 urteko gizonezko batetik eratorritako tumore-zelula epitelialak.	RPMI #BE12-702F
Caki-1	Azaleko metastasi batetik eratorritako CCRCCdun gaixo batetik eratorritako morfologia epitelialeko zelulak.	MEM #H3BE12-611F
A498	Giltzurrun-zelulen kartzinomadun 52 urteko emakume batetik eratorritako morfologia epitelialeko zelulak.	MEM #H3BE12-611F
GM06114	20 asteko giza fetu osasuntsu baten biriketatik eratorritako fibroblastoen lerro zelularra.	DMEM H3BE12-741F

Zelulak, %10 FBS, %1 Penizilina-estreptomizina antibiotiko eta %1 L-glutaminarekin osaturiko kultibo medioetan hazi ziren, 37°C-ko temperatura eta %5eko CO<sub>2</sub>dun atmosfera mantentzen dituen inkubagailuan. Gainera, Caki-1 eta A498 lerroen medioari aminoazido ez esentzialak eta sodio pirubatoa ere gehitu zitzaizkion. Baldintza esterilak mantentzeko, zelulen hazkuntzarako filtrodun poliestirenozko T75 plakak erabili ziren.

Zelulen mantentzea, konfluentzia %90era iristean 1/6 eta 1/8 arteko diluzioak aplikatuz burutu zen, horretarako zelulak tripsinarekin altxatu zirelarik. Esperimentuetarako 20 pase baino gutxiagoko zelulak erabili ziren.



### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### 3.4.2 ZELULEN BIDERAGARRITASUN ENTSEGUAK

Konposatu ezberdinek zelulen bideragarritasunean duten eragina aztertzeko MTT entseguak erabili ziren. Entsegu hau, zelulen mitokondriek 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromida edo MTT konposatua formazan gatz disolbaezinean bihurtzeko gaitasunean oinarritzen da. Sorturiko gatz kopuruak zelula bideragarrien kopurua islatzen du eta DMSOn disolbatu eta 570nm-ko uhin luzeran duten absorbantzia neurtuz kalkulatu da.

Entseguak 96 putzuko plaketan garatu ziren. Giltzurruneko minbiziko zelulak 3000 zel/putzuko dentsitatean erein ziren, 100 µl-ko bolumenean. Gau oso batez gainazalean atxikitzeke denbora eman ostean, zelulak Ang II eta Ang 1-7 peptidoen kontzentrazio gorakorrekin tratatu ziren, %1 FBSdun disoluzioetan. Kontzentrazio bakoitzeko 3 erreplika egin ziren. 72 orduz inkubatu ostean, putzu bakoitzean 15 µl MTT gatz gehitu ziren, honen amaierako kontzentrazioa 1,5 mgr/ml-koa zelarik. 4 orduz inkubatu ondoren, zelulen media deuseztatu eta sorturiko gatzak 100 µl DMSOtan disolbatu eta absorbantzia neurtu zen Fluostar OPTIMA espektrofluorimetroan.

Entsegu bakoitza hiru esperimentu independentetan burutu zen eta lan honetan erakusten diren emaitzak hiru horien batez-bestekotik kalkulatu dira.

#### 3.4.3 WOUND HEALING EDO ZAURI ENTSEGUAK

Konposatu ezberdinek zelulen migrazioan daukaten eragina aztertzeko *Wound Healing* edo *Scratch assay* deritzon teknika erabili zen. Zelulek gainazal konfluente baten eginiko zauria ixteko duten gaitasunaren neurketan oinarritzen da.

24 putzuko plaketan gauzatu ziren entseguak. A498 eta 7860 lerroak erabili ziren, putzu bakoitzean  $2 \cdot 10^5$  zelula erein zirelarik. Zelulei gainazalari atxikitzeke denbora eman zitzaion, *overnight* inkubazioz. Jarraiki, kultibo media deuseztatu eta zelulak PBSarekin garbitu ziren, birritan. Ondoren, FBSrik gabeko medio garbia gehitu

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

zitzaien. Hala mantendu ziren 24 orduz, zelulen sinkronizazioa ahalbideratuz. Ondoren, 200 µl-ko punta hori bat erabiliz, zelulen gainazalean goitik behera zeharkatzen duen zauri bat egin zen. Zelulak PBSarekin birritan garbitu ostean, tratamenduak gehitu zitzaizkien, FBSrik gabeko medioan. Puntu honetan t=0 puntuko argazkiak hartu ziren eta era berean 6, 12, 24 eta 48 ordura ere atera ziren. Amaitzeko, zauriaren azalera denboran zehar jasandako aldaketa neurtu zen ImageJ softwarearen MRI *Wound Healing Tool* tresnaren bitartez. Entsegu bakoitza hirutan errepikatu zen eta emaitzak hauen batezbestekotik aterata daude.

#### 3.4.4 MAPK/ERK SEINALIZAZIO BIDEAREN AKTIBAZIO ENTSEGUAK

Angiotentsina II (Ang II) peptido bioaktiboak aktibaturiko seinalizazioaren transdukzio bideetako bat MAPK/ERKena da. Honen aktibazioa neurtzeko moduetako bat MAPK 42/44 edo Erk 1/2 kinasen fosforilazio egoeraren azterketa da.

Horretarako, giltzurrun-zelulen kartzinoma lerroetako  $1,5 \cdot 10^6$  zelula P6 plaketan erein ziren. 24 orduz gainazalari atxikitze denbora eman ostean, kultibo medioa deuseztatu, PBSrekin garbitu eta FBSrik gabeko medio garbia gehitu zitzaien. Hala mantendu ziren beste 24 orduz, zelulak egoera geldian ("*quiescent*") sinkronizatuz. Jarraiki, Ang II kontzentrazio ezberdineko disoluzioak gehitu zitzaizkien FBSrik gabeko medioan, 1,5, 10, 50 eta 100 µM-ekoak hain zuzen ere eta 5, 10, 20 eta 30 minutuz inkubatu ziren. Inkubazio denborak betetzean, zelula plakak izotzetara transferitu ziren, PBS hotzarekin birritan garbitu eta proteinen erauzketa burutu zen 3.3.3 atalean deskribatzen den moduan. Ang II-ren seinalea AT1R hartzailaren bitartez zuzentzen zela ziurtatzeko, zelulak honen Candesartan inhibitzailearekin (10 µM 20 min) tratatu ziren.

Erauzitako proteina homogeneousatuak 3.3.3 atalean deskribatzen den moduan kuantifikatu eta Western Blot bidez aztertu ziren, horretarako *Cell Signalling* etxeko Phospho-p42/44 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) antigorputza erabili zen 1:1000 diluzioan.

### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### 3.4.5 MEDIO BALDINTZATUAREKIN BURUTURIKO ENTSEGUAK

Medio baldintzatua (CM) zelulekin kontaktuan egon den FBSrik gabeko medioa da eta ondorioz hauek jariaturiko zitokina, hazkuntza faktore eta beste hainbat konposaturekin aberastua dago.

Giltzurruneko minbiziko zeluletatik zein fibroblastoen lerrotik eratorritako medio baldintzatua prestatzeko, zelulak %80-90eko konfluentziaraino hazten utzi ziren. Hauek PBSarekin garbitu eta FBSrik gabeko medio garbia gehitu zitzairen. 24 orduko inkubazioaren ostean, medioa jaso eta 4000 rpm-tara zentrifugatu zen 5 minutuz. Lorturiko gainjalkina -20°C-tan gorde zen. Medio baldintzatua, hau medio garbiarekin 1:1 proportzioan nahastuz osatu zen.

Medio baldintzatuarekin entsegu ezberdinak garatu ziren. Batetik, RCCko zelula lerroek fibroblastoetan FAP $\alpha$ -ren espresio indultzeko gaitasuna aztertu zen, hauek RCC lerroetatik eratorritako medio baldintzatuarekin tratatuz. Hala, P6 batean  $2 \cdot 10^5$  GM06114 zelula erein ziren eta 24 ordu beranduago, A498 eta Caki-1 zeluletatik eratorritako medio baldintzatuarekin tratatu ziren 24 orduz. Zelulak PBS hotzarekin garbitu ostean, RNA erauzi eta FAP $\alpha$ -ren gene adierazpena analizatzeko qPCRa burutu zen 3.2.1 atalean deskribatzen den eran. Halaber,  $5 \cdot 10^4$  GM06114 zelula, P24 batean kokaturiko estalki batean erein ziren eta P6an ereindako zelulekin erabilitako protokolo bera aplikatu zitzairen. Kasu honetan, tratamenduaren ostean, zelulak garbitu eta 3.3.4 atalean azalduko protokoloarekin IF garatu zen, FAP $\alpha$ -ren proteina espresioa behatzeko.

Alderantziz, fibroblasto zelulek giltzurruneko kartzinomako zelulengan daukaten efektua aztertzeko, GM06114 zeluletatik abiatuz medio baldintzatua sortu zen. Honekin, 3.4.3 ataletan deskribaturiko *Wound Healing* entseguak burutu ziren. Entsegu bakoitza hirutan errepikatu zen eta lorturiko emaitzak hauen batezbestekotik aterata daude.

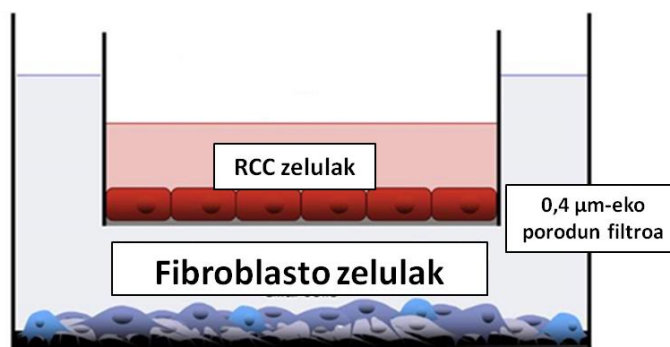
### 3. Materialak eta metodoak. Materiales y métodos

#### 3.4.6 FIBROBLASTO ETA RCC LERROEN ARTEKO KO-KULTIBOAK

Fibroblasto eta giltzurrun-zelulen kartzinoma lerroen arteko interakzioak tumoreen biologian garrantzitsuak diren zenbait generen adierazpenean duten eragina aztertzeko zeharkako ko-kultibo metodoa erabili zen (3.4. Irudia).

Metodo honetan bi zelula populazioen artean ez dago kontaktu fisikorik. Izan ere, mintz porotsu batek banatuta hazten dira eta ondorioz, mediora jariaturiko molekulen bitartez soilik elkarrekiten dute. Kultibo mota honek, entsegu amaieran lerro bakoitza modu independentean analizatzea ahalbidertzen du.

Entseguetarako,  $0,4\ \mu\text{m}$ -ko diametroko poroak zituzten *insertak* erabili ziren. Hala, GM06114 lerroko  $2 \cdot 10^5$  zelula erein ziren P6 plaketan eta beste horrenbeste A498 lerroko zelula *insertetan*. *Overnight* inkubazioz gainazalari atxikitzeko denbora eman ostean, minbizi zeluladun *insertak* fibroblastodun putzuetara lekualdatu ziren. Honela, 24, 48, 72 eta 96 orduz inkubatu ziren. FAP $\alpha$ -k ko-kultiboan daukan eragin espezifikoa ikertzeko, fibroblastoak Talabostat inhibitzailearekin inkubatu ziren  $10\ \mu\text{M}$ -eko kontzentrazioan. Inkubazioa amaitzean, zelulak birritan PBSarekin garbitu eta RNA erauzketa eta intereseko geneen kuantifikazio erlatiboa burutu ziren 3.2.1 atalean azaltzen den bezala.



3.4. Irudia. RCC zelulen eta fibroblasto zelulen arteko ko-kultiboaren irudikapena.

## 3.5 ANALISI ESTATISTIKOA

Analisi estatistikorako R eta SPSS 22.0 softwareak erabili ziren. Emaitzen distribuzioa aztertzeko, normalitate testa aplikatu zitzairen Kolomogorov-Smirnov estatistikoaren bitartez. Distribuzioa normala zen kasuetan test parametrikokoak erabili ziren, t-student testa bi talde zeuden kasuetan eta ANOVA testa bi talde baino gehiagokoetan, Tukeyren post-hoc frogekin bi talde espezifikoaren aldeak aztertzeko. Aldiz emaitzen distribuzioa normala ez zenetan, Mann-Whitneyren U testa aplikatu zen bi talderentzat eta Kruskal-Wallisren H testa bi talde baino gehiago zeudenetan.

Aldagai kategorikoen konparaketarako (adib. entzimen adierazpen kategorikoa vs RCC azpimota histologikoak edo parametro kliniko-patologikoak) Chi-karratu estatistikoa aplikatu zen. Aldiz entzimen adierazpenak eta aktibitateak gaixoen adina eta sexuarekin zuen erlazioa aztertzeko Spearmanen Rho testa erabili zen. Korrelazio ezberdinetarako Pearsonen testa ere erabili zen.

Biziraupenen analisirako ordea, Kaplan-Meyer kurbak baliatu ziren. Adierazpenaren kasuan, analisia kategorikoa izanik, presentzia vs absentzia konparatu zen. Aldiz, aktibitatearen kasuan, peptidasekin argitaraturiko beste lan batzuetan oinarrituta, aktibitate entzimatikokoaren balioen ebakidura puntuak sortu ziren entzimen aktibitatearen medianak erreferentziatzat hartuta (268). Biziraupen kurben konparaketarako log-rank testa erabili zen eta parametro kliniko-patologiko bakoitzak biziraupenean daukan efektua independentea baloratzeko, Cox analisi unibariante eta multibarianteak.

p balioa 0,05 baino txikiagoa zen kasuetan ( $p < 0,05$ ), emaitzak estatistikoki esanguratsuak zirela kontsideratu zen.

## **4. RESULTADOS. Emaidzak**



## 4.1 CAPÍTULO 1: ESTUDIO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRARRENAL (iRAS) EN EL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES

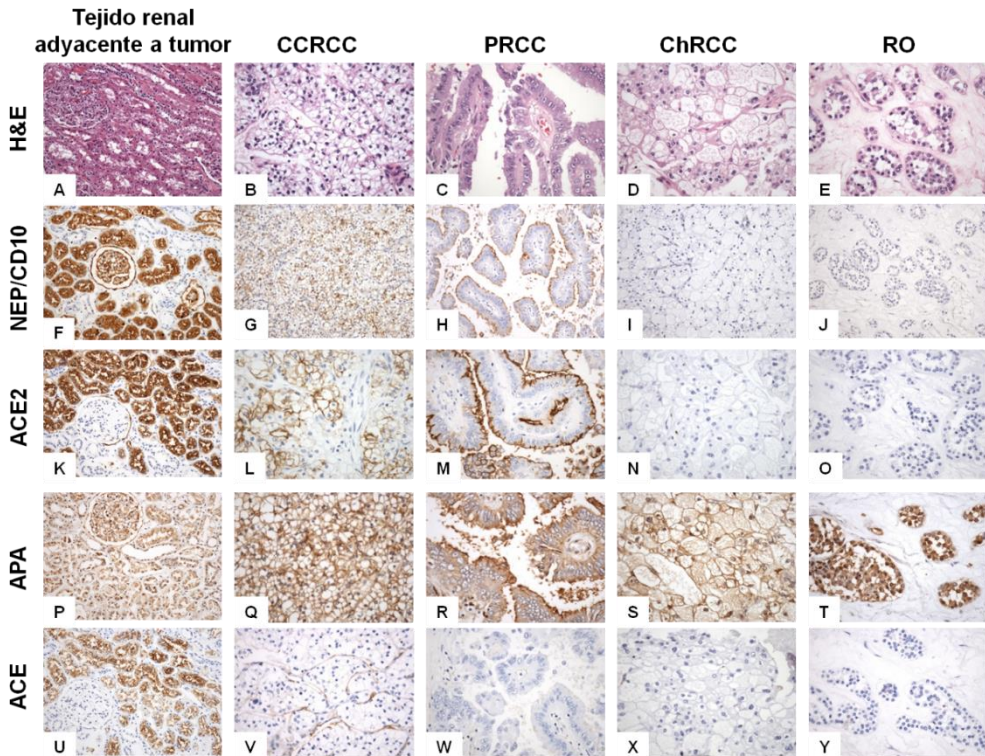
Para lograr los objetivos propuestos en esta tesis, se combinaron análisis descriptivos en muestras provenientes de pacientes con carcinoma de células renales (RCC) con estudios *in vitro* realizados en cultivos celulares. A continuación, se detallan los resultados más significativos obtenidos.

### 4.1.1 EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE RCC Y EN TEJIDO RENAL NO NEOPLÁSICO ADYACENTE

El análisis inmunohistoquímico de las enzimas convertidoras de angiotensinas se realizó de forma retrospectiva, con muestra proveniente de pacientes intervenidos entre los años 1997 y 2001. La expresión de las enzimas se analizó tanto en los tumores renales como en el tejido no tumoral adyacente (Figura 4.1). Se compararon los porcentajes de tumores positivos para cada enzima en los diferentes subtipos histológicos mediante el test estadístico de chi cuadrado  $\chi^2$  (Tabla 4.1).

La NEP/CD10 se detectó en los glomérulos, la cápsula de Bowman y en los túbulos contorneados proximales (F). En cuanto al tejido tumoral, se comparó su expresión en 4 subtipos histológicos, detectándose diferencias estadísticamente significativas al analizarlas en conjunto (test chi cuadrado  $\chi^2$   $p=0,006$ ) y también al compararlas una a una. Así, cerca de la mitad de los CCRCCs (G) y de PRCCs (H) expresaron esta enzima en su membrana apical, mientras que un 94,1% de los ChRCC (I) y el total de los RO (J) fueron negativos. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre los CCRCCs y los ChRCCs (test chi cuadrado  $\chi^2$   $p=0,002$ ) y los PRCCs y los ROs ( $\chi^2$   $p=0,01$ ) y casi significativas entre CCRCCs y ROs ( $p=0,07$ ).





**Figura 4.1. Tinción hematoxilina-eosina (A-E) e inmunohistoquímica (F-Y) de las enzimas del iRAS en los subtipos histológicos de RCC y en tejido renal adyacente al tumor.** El análisis de la expresión se efectuó en una serie de 144 pacientes con RCC de forma cualitativa; presencia vs ausencia. (Aumento original, x20 para tejido renal adyacente al tumor y x400 para tumores).

La expresión de la ACE2 también fue detectada en los túbulos contorneados proximales del tejido renal adyacente al tumor (K). Alrededor de dos tercios de los CCRCCs (L) y PRCCs (M) fueron positivos (tinción de membrana) mientras que un 40% de los ChRCCs (N) y ningún RO (O) fueron positivos. El análisis conjunto fue significativo ( $p=0,006$ ) y también las diferencias entre CCRCCs y ChRCCs y ROs ( $p=0,021$  y  $p=0,003$  respectivamente) y entre PRCCs y ROs ( $p=0,023$ ).

En lo que se refiere a la aminopeptidasa A o APA, se detectó una señal difusa tanto en los túbulos como en los glomérulos (P). En conjunto, más del 75% de los RCC fueron positivos para APA. A pesar de que no se observaron diferencias en el porcentaje de tumores positivos entre los diferentes subtipos histológicos, el patrón de tinción a nivel celular sí variaba. En el CCRCC (Q) y el PRCC (R), la expresión de

#### 4. Resultados. Emaitzak

APA se detectó únicamente en la membrana. En el ChRCC (S) se localizó tanto en la membrana como en el citoplasma y en el RO (T) la tinción pasaba a ser exclusivamente citoplasmática.

La ACE, de forma similar a su homóloga ACE2, fue detectada en los túbulos contorneados proximales del tejido renal no neoplásico (U). En el RCC, no se detectó su expresión en las células tumorales de ningún subtipo histológico. Sin embargo, la expresión de esta enzima fue detectada en los vasos sanguíneos de prácticamente la mitad de los CCRCC (V) y en menor porcentaje, también en los de PRCCs (W) y ChRCCs (X). En cambio, todos los oncocitomas renales (Y) fueron negativos. Las diferencias fueron estadísticamente significativas al analizar los diferentes subtipos histológicos en conjunto ( $p=0,002$ ) y también al comparar el CCRCC con el PRCC ( $p=0,002$ ) y con el ChRCC ( $p=0,017$ ).

**Tabla 4.1. Expresión de las enzimas de iRAS en función del subtipo histológico.** Porcentajes de tumores positivos y negativos para NEP/CD10, ACE2 y APA en células tumorales y para ACE en vasos sanguíneos. Las diferencias de expresión entre los diferentes subtipos histológicos en conjunto se analizaron mediante el test estadístico chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), al igual que las diferencias una a una entre dos subtipos histológicos en concreto (reflejadas en el texto). Los resultados estadísticamente significativos se subrayan en **negrita**.

Subtipo histológico	n	NEP/CD10		ACE2		APA		n	ACE	
		Neg (%)	Pos (%)	Neg (%)	Pos (%)	Neg (%)	Pos (%)		Neg (%)	Pos (%)
CCRCC	102	54,4	45,6	30,1	69,9	20,6	79,4	99	57,4	42,6
PRCC	21	57,1	42,9	38,1	61,9	14,3	85,7	19	94,7	5,3
ChRCC	17	94,1	5,9	58,8	41,2	17,6	82,4	17	88,2	11,8
RO	4	100,0	0,0	100,0	0,0	25,0	75,0	3	100,0	0,0
Valor P		<b>0.006</b>		<b>0.006</b>		0.334			<b>0.002</b>	

### 4.1.2 EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS DEL iRAS EN FUNCIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE PACIENTES CON CCRCC

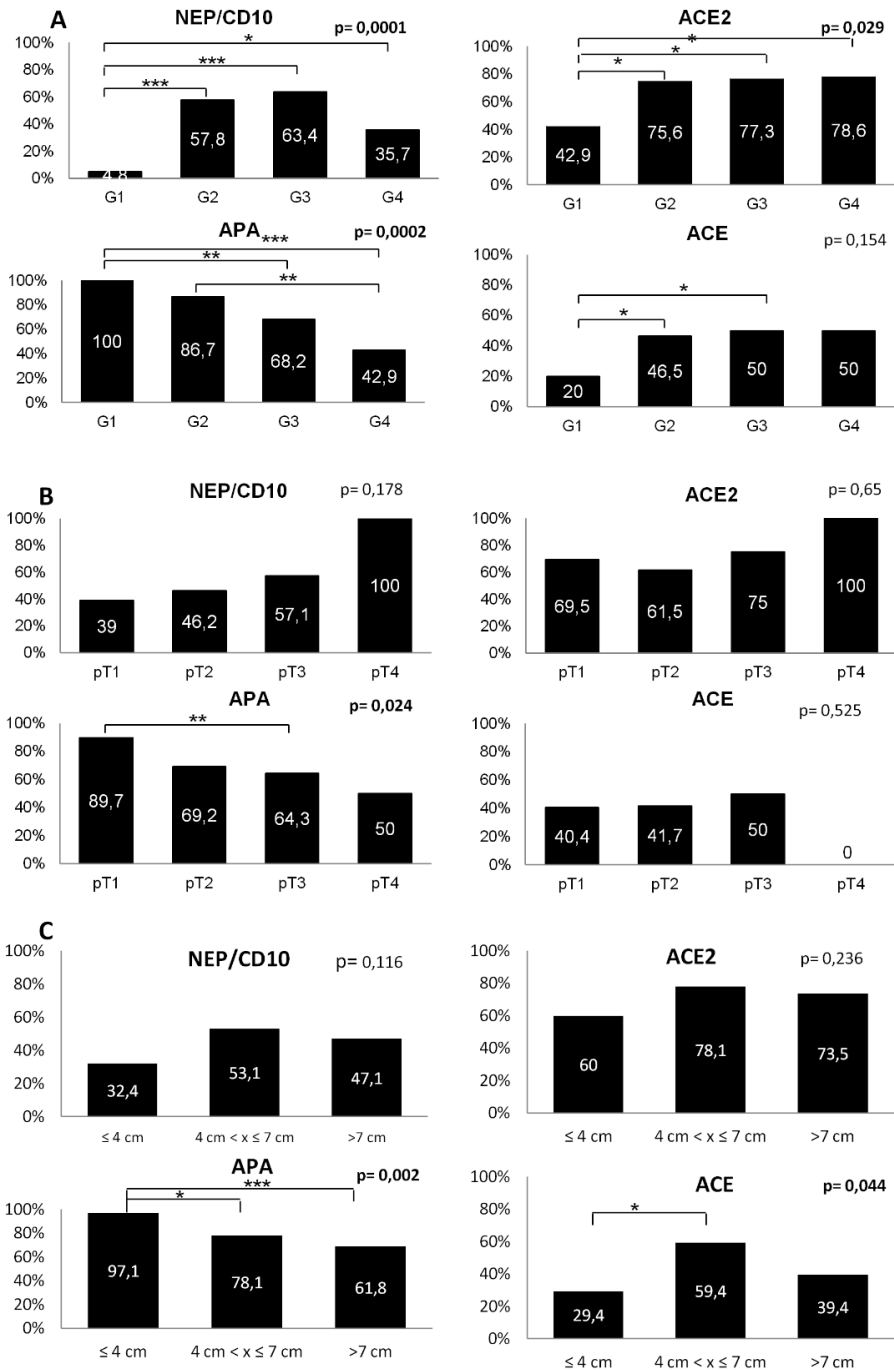
El número de casos de CCRCC en la serie, que ascendía a un total de 102, permitió el análisis de la expresión de las enzimas del iRAS en función de diferentes variables clínico-patológicas empleadas de forma rutinaria en la práctica clínica.

No se observó correlación alguna entre la expresión de los diferentes enzimas con capacidad de convertir péptidos de angiotensina y el sexo y la edad de los pacientes con CCRCC (test Rho de Spearman  $p > 0,05$  en todos los casos). En cambio, la expresión de las enzimas del iRAS correlacionó de forma estadísticamente significativa con diferentes parámetros patológicos estudiados como el grado, la pT o el tamaño del tumor (Figura 4.2).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de tumores NEP/CD10 positivos entre los diferentes grados histológicos al analizarlos en conjunto (test chi cuadrado  $\chi^2$   $p = 0,0001$ ). El porcentaje de tumores positivos con G1 era menor que el del resto de grados, alcanzando valores estadísticamente significativos al analizarlos de uno en uno (G1 vs G2  $p = 0,000062$ ; G1 vs G3  $p = 0,000051$ ; G1 vs G4  $p = 0,01$ ). También se observó un aumento gradual de la expresión según aumentaba la invasión local (pT), aunque estas diferencias no alcanzaron relevancia estadística ( $p = 0,178$ ). Asimismo, la proporción de tumores NEP/CD10 positivos no variaba de forma significativa entre tumores de diferente tamaño ( $p = 0,116$ ).

De forma similar, la expresión de ACE2 únicamente correlacionó con el grado de Fuhrman ( $p = 0,029$ ). Además, tal y como se observó para NEP/CD10, el porcentaje de tumores positivos era significativamente menor en el grado más bajo (G1) que en el resto. Así, al comparar los grupos de uno en uno se observaron cambios estadísticamente significativos (G1 vs G2  $p = 0,011$ ; G1 vs G3  $p = 0,021$ ; G1 vs G4  $p = 0,036$ ).

#### 4. Resultados. Emaitzak



**Figura 4.2.** Expresión de las enzimas del iRAS en función del grado de Fuhrman (A), la invasión local (pT) (B) y el diámetro tumoral (C). Cada una de las barras de las figuras representa el porcentaje de tumores positivos. Las diferencias de expresión globales entre los grupos de grado histológico (G1-G4), invasión local (pT1-pT4) y diámetro tumoral (≤4cm/4cm<x<7cm/>7cm) fueron analizadas mediante el test estadístico chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). El mismo test fue empleado para analizar diferencias entre dos grupos específicos ( $\chi^2$  p<0,05 (\*); p<0,01 (\*\*); p=0,005 (\*\*\*)).

#### 4. Resultados. Emaitzak

Al estudiar la expresión de APA en función de los diferentes parámetros clínico-patológicos se observaron correlaciones estadísticamente significativas con todos ellos. Además, la tendencia era opuesta a la observada tanto para NEP/CD10 como para ACE2, ya que el porcentaje de tumores APA positivos disminuía al aumentar la agresividad tumoral. En el grado histológico, el porcentaje de tumores positivos disminuía gradualmente desde el 100% de los G1 al 42,9% de los G4 ( $p=0,0002$ ). Analizados los diferentes grados histológicos uno por uno, se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar tumores G1 con tumores G3 y G4 ( $p = 0,006$ ; y  $p = 0,00011$  respectivamente) y entre tumores G2 y G4 ( $p = 0,001$ ). De forma similar, el porcentaje de tumores que expresan APA disminuye significativamente desde el 89,7% de los pT1 al 50% de los pT4 ( $\chi^2 p=0,024$ ). El análisis individual detectó diferencias significativas únicamente entre tumores pT1 y pT3 ( $\chi^2 p=0,005$ ), aunque la comparación entre los pT1 y pT2 y entre los pT1 y pT4 estuvo cerca de la significación ( $p=0,06$  y  $p = 0,09$  respectivamente). Con una distribución parecida, también se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre tumores de diferente tamaño ( $p=0,002$ ). Se detectó la expresión de APA en el 97,1% de los tumores inferiores a los 4 cm, en el 78,1% de los que medían entre los 4 y los 7 cm y en el 61,8% de los mayores de 7 cm-s. Analizados uno por uno, las diferencias fueron estadísticamente significativas entre los tumores menores de 4 cm, y los otros dos de grupos con un valor de  $p=0,019$  y  $p=0,0003$  respectivamente.

La expresión de ACE no se detectó en las células tumorales de ninguno de los subtipos histológicos estudiados. En cambio, se detectó en los vasos sanguíneos de la mitad de los CCRCCs. Analizando los grados uno por uno, el porcentaje de tumores que expresan ACE en los vasos sanguíneos es significativamente menor en tumores G1 en comparación con tumores G2 y G3 (G1 vs G2  $p=0,044$ ; G1 vs G3  $p=0,043$ ). En cambio, estudiados conjuntamente, las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas ( $p=0,154$ ). Tampoco se observaron cambios relevantes en función de la invasión local (pT), a pesar de que ningún tumor pT4

#### 4. Resultados. Emaitzak

expresaba ACE mientras que en el resto de los pTs lo hacían alrededor de la mitad de los tumores. En cambio, sí se hallaron diferencias estadísticamente significativas en tumores de diferente tamaño ( $p=0,044$ ). El porcentaje de tumores en los que los vasos expresaban ACE se duplicó de un 29,4% en tumores menores de 4 cm a un 59,4% en tumores de 4 a 7 cm-s ( $p=0,014$ ). En tumores mayores de 7 cm-s, el porcentaje de tumores ACE positivos volvía a disminuir a un 39,4%, aunque las diferencias con los dos grupos anteriores no fueron significativas ( $p>0,05$ ).

##### 4.1.3 ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS DEL IRAS CON LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON CCRCC

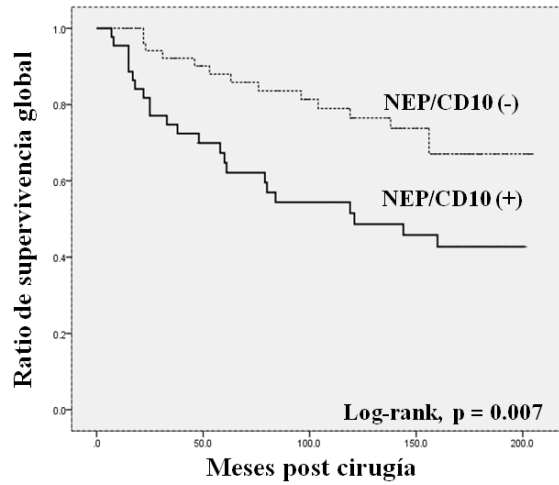
El estudio del impacto de la expresión de las enzimas convertidoras de péptidos de angiotensina en la supervivencia de pacientes de CCRCC se realizó mediante curvas de Kaplan-Meier. El seguimiento medio fue de 110,3 meses, extendiéndose desde los 4 meses hasta los 220 en los casos con seguimiento más largo. Así, la supervivencia se estudió a 5, 10 y 15 años (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2. Valores de la P del test Log-Rank del análisis de supervivencia de expresión de las enzimas convertidoras de péptidos de angiotensinas para pacientes con CCRCC.** La supervivencia se estudió a 5, 10 y 15 años. Los resultados estadísticamente significativos se subrayan en **negrita**.

	<b>NEP/CD10</b>	<b>APA</b>	<b>ACE2</b>	<b>ACE</b>
<b>5 años</b>	<b>0,011</b>	<b>0,00023</b>	0,533	0,109
<b>10 años</b>	<b>0,011</b>	<b>0,000077</b>	0,550	0,294
<b>15 años</b>	<b>0,007</b>	<b>0,001</b>	0,177	0,219

Los resultados obtenidos eran diferentes para cada una de las enzimas. Mientras que la expresión de NEP/CD10 correlacionó con una peor supervivencia en pacientes con CCRCC tanto a 5, 10 como a 15 años, la expresión de APA lo hizo con una mejor supervivencia (Figura 4.3). La siguiente figura representa las curvas de supervivencia para ambas enzimas con un seguimiento de 15 años. En cambio, no se detectaron diferencias en la supervivencia de los pacientes de CCRCC en función de la expresión de las enzimas ACE y ACE2.

**A Expresión de NEP/CD10 en CCRCC**



**B Expresión de APA en CCRCC**

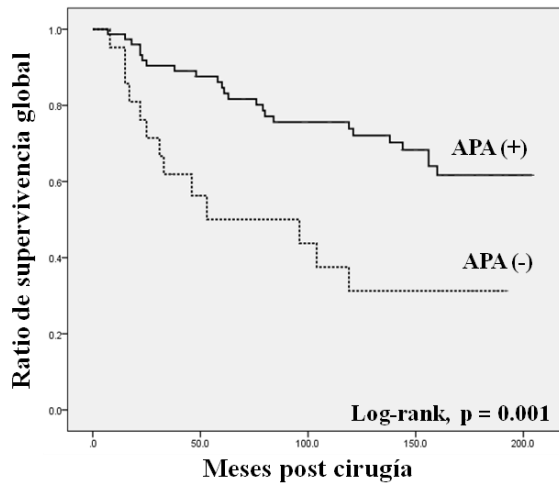


Figura 4.3. Curvas de Kaplan Meyer para el análisis de la supervivencia en pacientes con CCRCC en función de la expresión de NEP/CD10 (A) y APA (B). La valoración de la expresión fue categórica (presencia vs ausencia). Las curvas muestran la supervivencia a 15 años.

Mediante el análisis univariante se observaron correlaciones positivas entre la supervivencia de los pacientes y el diámetro, el grado, la pT y las expresiones de NEP/CD10 y APA (Tabla 4.3). Todas estas variables fueron empleadas para realizar el análisis multivariante de Cox mediante el cual se dedujo que tanto la invasión local (pT) como la expresión de NEP/CD10 son factores pronósticos independientes para la predicción de la supervivencia en pacientes con CCRCC. A su vez, la expresión de APA estuvo cerca de serlo ( $p=0,063$ ) (Tabla 4.3).

#### 4. Resultados. Emaitzak

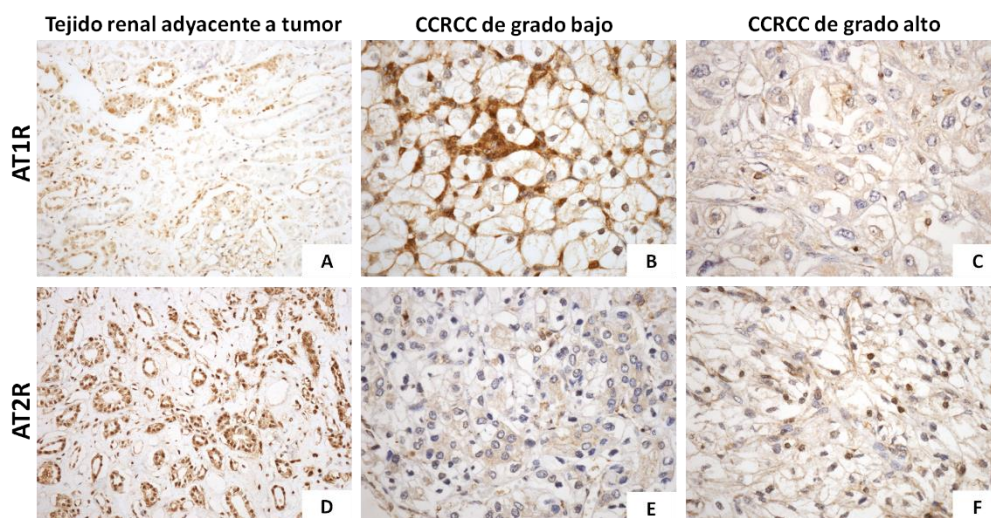
Tabla 4.3. Análisis univariante y multivariante (modelo de Regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas con capacidad predictiva de la supervivencia en pacientes con CCRCC junto con la expresión de NEP/CD10 y APA. Los resultados estadísticamente significativos se subrayan en **negrita**.

Variables	Análisis univariante		Análisis multivariante para NEP/CD10		Análisis multivariante para APA	
	p =	OR	p =	OR	p =	OR
<b>Sexo</b>	0,911	1,042	-	-	-	-
<b>Edad</b>	0,064	1,026	-	-	-	-
<b>Diámetro</b>						
≤4 cm	<b>0,00001</b>	2,83	0,327	1,335	0,863	1,054
>4 a 7cm						
>7 cm						
<b>Grado</b>						
G1						
G2	<b>0,000019</b>	2,047	0,421	1,194	0,533	1,144
G3						
G4						
<b>Invasión local</b>						
pT1						
pT2	<b>5,24·10<sup>-10</sup></b>	3,395	<b>0,001</b>	2,534	<b>0,00014</b>	1,054
pT3						
pT4						
<b>Expresión de NEP/CD10</b>						
Positivo	<b>0,003</b>	2,886	<b>0,047</b>	2,001	-	-
Negativo						
<b>Expresión de APA</b>						
Positivo	<b>0,001</b>	0,295	-	-	0,063	0,473
Negativo						



### 4.1.4 EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES AT1R Y AT2R EN EL CCRCC Y EN EL TEJIDO ADYACENTE NO NEOPLÁSICO

El estudio mediante inmunohistoquímica de los principales receptores del iRAS confirmó la presencia de éstos en los diferentes subtipos histológicos del RCC. En el tejido renal adyacente al tumor se detectó la expresión de AT1R en el citoplasma de las células que componen el glomérulo y también en las células tubulares (Figura 4.4). En el CCRCC, la tinción fue detectada en la membrana de las células tumorales. El AT2R se detectó en las células que conforman los túbulos en el riñón no tumoral (Figura 4.4). En cambio, en el CCRCC solamente se pudo observar una tinción difusa y citoplasmática en tumores tanto de bajo grado como de grado alto (Figura 4.4 E y F respectivamente).



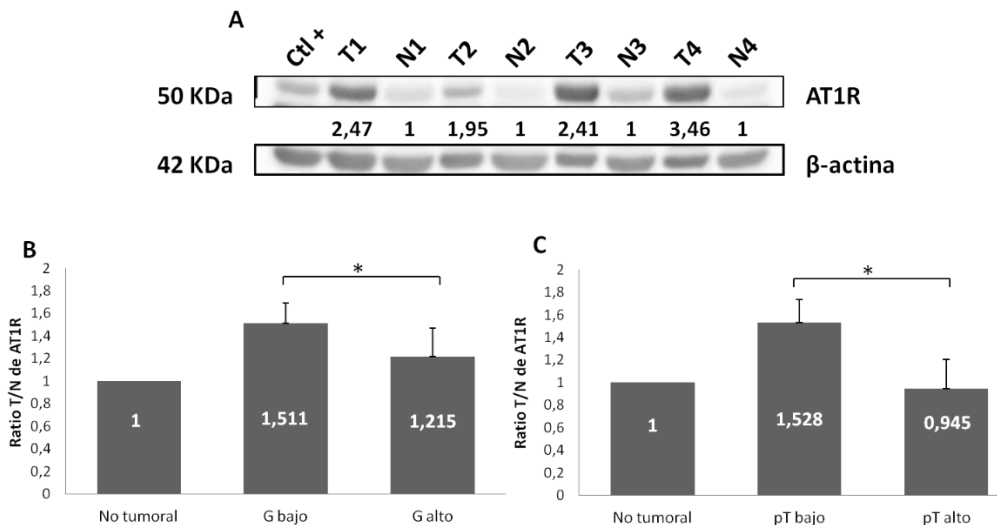
**Figura 4.4** Expresión inmunohistoquímica de los receptores de AT1R (A-C) y AT2R (D-F) en tejido renal adyacente al tumor (A/D) y en CCRCCs de grado bajo (B/E) y alto (C/F).. (Aumento original, x20 para tejido renal adyacente al tumor y x400 para tumores).

La expresión de ambos receptores se detectó en la totalidad de los 144 tumores que componían la serie. El carácter cualitativo del análisis de los resultados obtenidos mediante IHC-P (+/-), impidió el análisis en función de las variables clínico-patológicas. En su lugar, se llevó a cabo un análisis semicuantitativo de la expresión de AT1R y AT2R en el tejido tumoral y el adyacente de 47 pacientes con CCRCC mediante WB.

#### 4. Resultados. Emaitzak

Se observaron alteraciones de la expresión de ambos receptores en el tejido neoplásico en comparación con el tejido adyacente no tumoral. En el caso del AT1R, hubo casos en los que el WB mostró una marcada sobreexpresión en el tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente no tumoral (representados en la Figura 4.5A), sin embargo, en otros no se vieron estas diferencias (test U de Mann-Whitney  $p=0,8$ ).

Debido a esta variabilidad en las diferencias entre tumor (T) y tejido no tumoral (N), el análisis de los resultados de expresión de AT1R en función de variables patológicas se llevó a cabo mediante el cálculo de la ratio de expresión (T/N). Dicha ratio fue estadísticamente más alta en los CCRCCs con grado y pT bajo (test U de Mann-Whitney  $p=0,041$  y  $p=0,011$  respectivamente, Figura 4.5 B y C). En cambio, al analizar las ratios en función del tamaño no se observaron diferencias significativas.

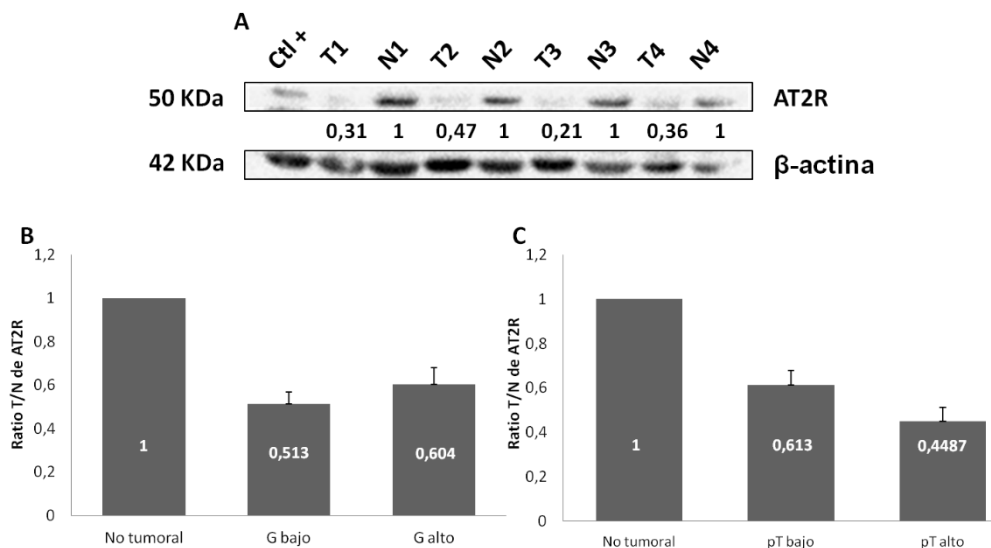


**Figura 4.5. Estudio semicuantitativo de la expresión de AT1R en homogenados de CCRCCs y en tejido adyacente no neoplásico.** La detección se llevó a cabo mediante Western Blot en tejido tumoral (T) y el adyacente no tumoral (N) de 47 pacientes con RCC y empleando  $\beta$ -actina como control de carga (A). Para el análisis en función del grado de Fuhrman (B) y la invasión local (pT) (C) se calcularon las ratios de expresión T/N para cada paciente. El software Image J fue empleado para las cuantificaciones. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante el test U de Mann-Whitney  $p<0.05$  (\*).

En cuanto al AT2R, el 90% de los CCRCCs expresaron menos receptor que el tejido no tumoral adyacente (test U de Mann-Whitney  $p < 6,76 \cdot 10^{-15}$ , Figura 4.6A).

## 4. Resultados. Emaitzak

Al analizar la ratio T/N de la expresión AT2R en función de las variables patológicas, esta se redujo en CCRCCs con pT alta respecto a los pTs bajas. Un resultado que se mantuvo cerca de la significación estadística (test U de Mann-Whitney  $p=0,081$ , Figura 4.6C).



**Figura 4.6. Estudio semicuantitativo de la expresión de AT2R en homogenados de CCRCCs y en tejido adyacente no neoplásico.** La detección se llevó a cabo mediante Western Blot en tejido tumoral (T) y el adyacente no tumoral (N) de 47 pacientes con RCC y empleando  $\beta$ -actina como control de carga (A). Para el análisis en función del grado de Fuhrman (B) y la invasión local (pT) (C) se calcularon las ratios de expresión T/N para cada paciente. El software Image J fue empleado para las cuantificaciones. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante el test U de Mann-Whitney  $p<0.05$  (\*).

### 4.1.5 ESTUDIOS *IN VITRO* CON LÍNEAS CELULARES DE RCC

#### Caracterización de las líneas celulares

Previo al estudio del efecto de los principales péptidos bioactivos del RAS en las líneas de RCC, se estudió la expresión de los receptores sobre los que actúan dichos péptidos para confirmar la validez del modelo seleccionado. Se analizó la expresión de los receptores AT1R y AT2R, receptores del principal péptido bioactivo del sistema, la Ang II, y del receptor Mas1, cuyo ligando endógeno principal es la Ang 1-7 (Figura 4.7). Una vez caracterizadas las cuatro líneas celulares y teniendo en cuenta que la expresión de los receptores era similar en todos ellos, los estudios funcionales se centraron en las líneas de RCCs primarios 786O y A498.

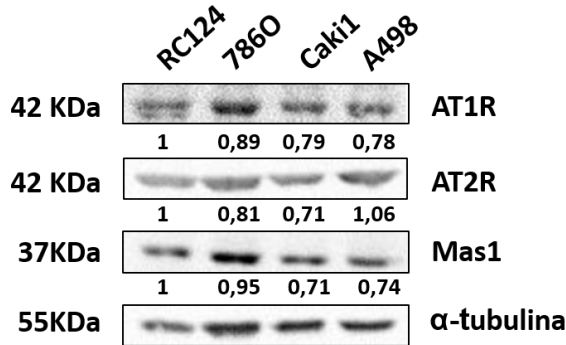


Figura 4.7. Expresión de los receptores del iRAS AT1R, AT2R y Mas1 en líneas celulares de RCC y una línea de células renales epiteliales. La expresión se analizó en una línea de células epiteliales renales no tumorales (RC124), en dos líneas provenientes de RCCs primarios (786O y A498) y una línea de RCC metastásico (Caki-1) mediante Western Blot. La detección de la  $\alpha$ -tubulina fue utilizada como control de carga.

### Efecto de la angiotensina II en la activación de la vía de señalización de MAPK/ERK

La señalización mediante AT1R se da mediante mecanismos dependientes e independientes de proteínas G. En consecuencia, se activan diferentes vías de transducción de señales como la de las MAPK, PI3K o JAK-STAT (93). Al tratar las líneas primarias de RCC con Ang II 10  $\mu$ M, se observó una fosforilación de la enzima MAPK 44/42 (Erk 1/2) a los 10 minutos de incubación. Dicha fosforilación se veía disminuida al tratar previamente las células con candesartán, inhibidor específico del receptor AT1R durante 20 minutos (Figura 4.8).

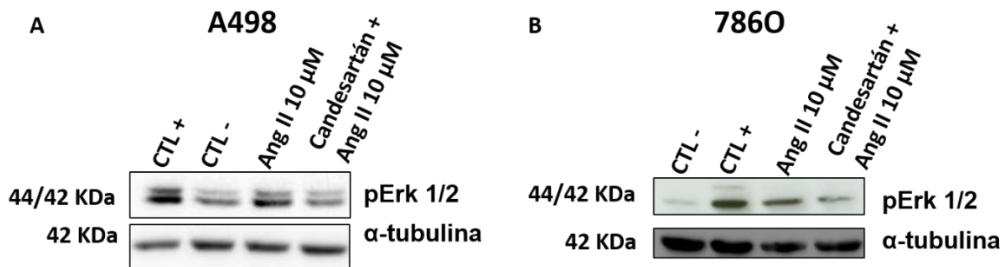
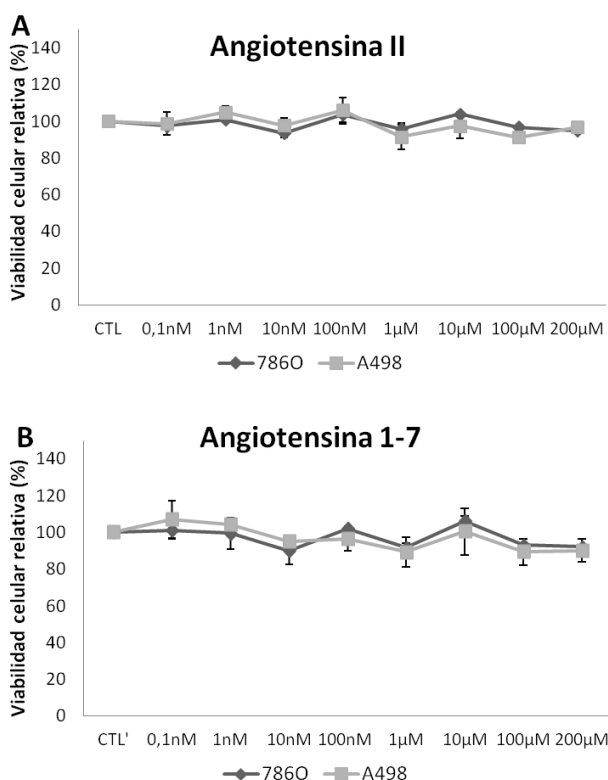


Figura 4.8. Análisis de la fosforilación de MAPK 44/42 (Erk 1/2) en respuesta al tratamiento con angiotensina II en líneas de RCC primarias A498 y 786O. La fosforilación se analizó mediante Western Blot con anticuerpos específicos para la proteína fosforilada. Células sin tratar fueron empleadas como control negativo y como positivo, células tratadas con suero bovino fetal (FBS). La detección de la  $\alpha$ -tubulina fue utilizada como control de carga. Imágenes representativas de 3 ensayos independientes.

### Efecto de la angiotensina II y la angiotensina 1-7 en la proliferación de las células de RCC

El efecto de los principales péptidos bioactivos en la proliferación celular se estudió mediante el análisis de la viabilidad con MTT. No se observó ningún cambio significativo en la viabilidad de las líneas celulares de cáncer renal primario al tratarlas con un amplio rango de concentraciones de los dos péptidos bioactivos principales del iRAS, la Ang II y la Ang 1-7 (test ANOVA  $p > 0,05$  para ambos péptidos en las dos líneas, Figura 4.9).



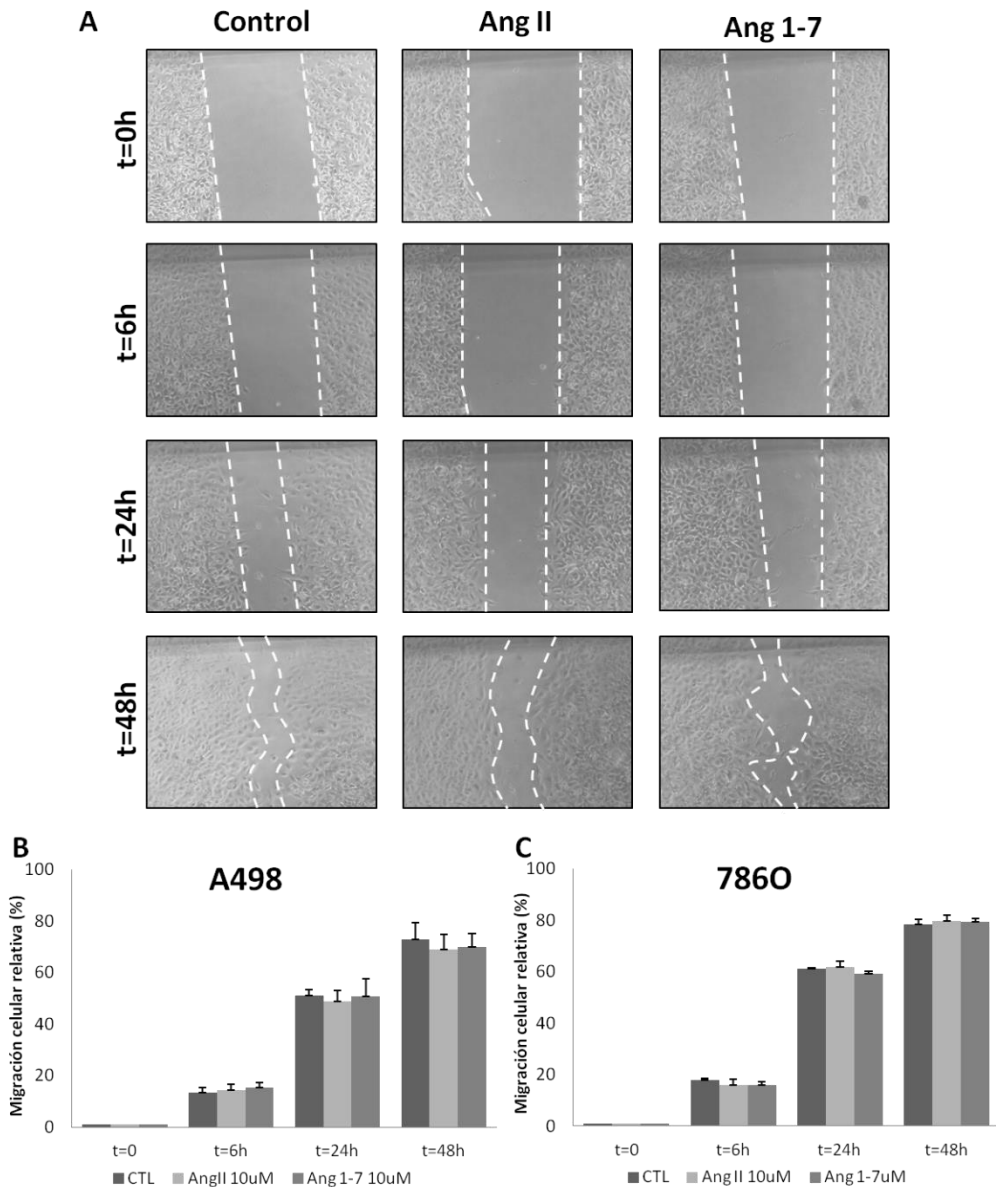
**Figura 4.9. Efecto de los péptidos angiotensina II (A) y angiotensina 1-7 en la viabilidad de células de RCC primario.** La viabilidad fue estudiada mediante ensayos de MTT. Las diferencias entre la viabilidad de las líneas A498 y 786O a diferentes concentraciones de los principales péptidos bioactivos se analizaron mediante el test ANOVA. Las gráficas recogen los resultados de 3 ensayos independientes.

### Efecto de la angiotensina II y la angiotensina 1-7 en la migración de las células de RCC

El efecto de Ang II y Ang 1-7 en la migración de las líneas A498 y 786O se estudió mediante técnicas *in vitro*. Los ensayos de *Wound Healing* (Figura 4.10)

#### 4. Resultados. Emaitzak

realizados no mostraron cambio alguno en la migración de las células de RCC en las condiciones estudiadas (test ANOVA  $p > 0,05$  para ambos péptidos en las dos líneas, Figura 4.10). La concentración de los péptidos osciló entre los 0,1 y 100  $\mu\text{M}$ .



**Figura 4.10. Efecto de los péptidos angiotensina II y angiotensina 1-7 (10  $\mu\text{M}$ ) en la migración de células de RCC primario.** Para el análisis de la migración celular se emplearon ensayos de *Wound Healing* (A) en los que la migración relativa es calculada a partir de la reducción del área de la herida mediante el Wound Healing Tool de ImageJ. Las diferencias entre diferentes grupos se analizaron mediante el test estadístico ANOVA (B y C). Imágenes representativas de 3 ensayos independientes. (\*) La figura A corresponde a la línea A498.

### 4.1.6 COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS ENZIMAS DEL RAS EN EL SUERO DE PACIENTES CON RCC Y CONTROLES SANOS

Con el objetivo de conocer si la alteración en la expresión de las peptidasas del RAS intrarrenal (iRAS) tiene algún reflejo a nivel sérico, se estudió la actividad de las enzimas convertidoras de péptidos de angiotensina en el suero de pacientes con RCC. Para ello, se comparó la actividad sérica de estas enzimas en sujetos control con la de pacientes con RCC.

En general, al comparar la actividad sérica de pacientes con RCC con la de sujetos control, se observó un aumento de la actividad NEP/CD10, ACE2 y APA.

Al analizar la actividad en cada subtipo histológico respecto a sueros control, se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4.4). Así, la NEP/CD10 aumentó su actividad sérica en pacientes con CCRCC respecto a los sujetos control (test U de Mann-Whitney  $p=0,027$ ). En el caso de la APA, el aumento de la actividad sérica fue estadísticamente significativo para pacientes con CCRCC, PRCC y RO ( $p=0,00011$ ,  $p=0,001$  y  $p=0,03$  respectivamente) y en el de la ACE2 para los 4 subtipos histológicos (CCRCC  $p=1,18 \cdot 10^{-7}$ , PRCC  $p=0,00034$ , ChRCC  $p=0,026$  y RO  $p=0,009$ ). Finalmente, los cambios de actividad sérica de ACE no mostraron significación estadística en ningún caso, a pesar de que se detectó un aumento de la actividad en pacientes con tumores que proceden de células del túbulo proximal (CCRCC y PRCC) y un descenso en los que padecían tumores originarios de las células intercaladas de la nefrona distal (ChRCC y RO).

## 4. Resultados. Emaitzak

**Tabla 4.4. Actividad sérica de las enzimas del RAS en pacientes con diferentes subtipos histológicos de RCC y sujetos control.** Los valores son medias  $\pm$  desviación estándar de UP/L. Se empleó el test U de Mann-Whitney para comparar la actividad entre cada subtipo tumoral y el grupo control. Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en **negrita**;  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

	Control	CCRCC	PRCC	ChRCC	RO
<b>NEP/CD10</b>	7183 $\pm$ 605	<b>7453 <math>\pm</math> 733*</b>	7028 $\pm$ 1085	7402 $\pm$ 519	7516 $\pm$ 422
<b>APA</b>	2087 $\pm$ 401	<b>2486 <math>\pm</math> 656***</b>	<b>2562 <math>\pm</math> 596**</b>	2408 $\pm$ 573	<b>2528 <math>\pm</math> 633*</b>
<b>ACE2</b>	549 $\pm$ 206	<b>767 <math>\pm</math> 304***</b>	<b>875 <math>\pm</math> 520***</b>	<b>666 <math>\pm</math> 160*</b>	<b>662 <math>\pm</math> 112**</b>
<b>ACE</b>	619 $\pm$ 238	679 $\pm$ 192	659 $\pm$ 195	513 $\pm$ 124,	562 $\pm$ 147

### 4.1.7 ACTIVIDAD SÉRICA DE LAS ENZIMAS DEL RAS EN FUNCIÓN DE VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE PACIENTES CON CCRCC

La actividad de las enzimas del RAS en el suero de pacientes con CCRCC no correlacionó con el sexo y la edad de los pacientes de CCRCC (test Rho de Spearman  $p > 0,05$ ). Tampoco se observaron cambios significativos en la actividad sérica de las enzimas del RAS al estratificarlos en función del tamaño tumoral (test H de Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ ).

La Tabla 4.5 resume las diferencias de la actividad de las enzimas del RAS en función de variables clínico-patológicas como el grado, la invasión local (pT) y la presencia de metástasis y necrosis. Los resultados fueron significativos únicamente para la ACE. Así, la actividad media de esta enzima disminuyó en el suero de pacientes con CCRCC grado alto (G3/G4) en comparación a los de grado bajo (G1/G2) (test U de Mann-Whitney  $p = 0,029$ ). De forma similar, la actividad de esta enzima en el suero de pacientes con tumores metastásicos era significativamente inferior a la de aquellos con tumores localizados ( $p = 0,009$ ).



#### 4. Resultados. Emaitzak

**Tabla 4.5. Actividad sérica de las enzimas del RAS en pacientes con CCRCC en función de diferentes variables clínico-patológicas.** Los valores son medias  $\pm$  desviación estándar de UP/L. Los resultados estadísticamente significativos están resaltados en **negrita** (test U de Mann-Whitney  $p < 0,05$  (\*) y  $p < 0,01$  (\*\*)).

	n	NEP/CD10	APA	ACE2	ACE
<b>Grado</b>					
Bajo (G1/G2)	48	7494 $\pm$ 743	2460 $\pm$ 635	752 $\pm$ 244	<b>717 <math>\pm</math> 187*</b>
Alto (G3/G4)	40	7402 $\pm$ 737	2515 $\pm$ 696	787 $\pm$ 369	<b>634 <math>\pm</math> 192</b>
<b>Invasión local</b>					
Bajo (pT1/pT2)	71	7532 $\pm$ 689	2520 $\pm$ 688	777 $\pm$ 317	661 $\pm$ 181
Alto (pT3/pT4)	18	7138 $\pm$ 836	2351 $\pm$ 507	729 $\pm$ 250	750 $\pm$ 222
<b>Metástasis</b>					
No	72	7510 $\pm$ 709	2535 $\pm$ 699	787 $\pm$ 325	<b>706 <math>\pm</math> 192**</b>
Sí	17	7210 $\pm$ 806	2279 $\pm$ 382	684 $\pm$ 172	<b>565 <math>\pm</math> 147</b>
<b>Sincronicidad</b>					
Sincrónico	10	6998 $\pm$ 911	2210 $\pm$ 378	731 $\pm$ 177	596 $\pm$ 147
Metacrónico	7	7512 $\pm$ 555	2378 $\pm$ 395	618 $\pm$ 151	521 $\pm$ 145
<b>Necrosis</b>					
No	63	7497 $\pm$ 731	2546 $\pm$ 716	780 $\pm$ 332	669 $\pm$ 190
Sí	25	7304 $\pm$ 726	2335 $\pm$ 469	742 $\pm$ 229	702 $\pm$ 203

A diferencia del estudio inmunohistoquímico, el análisis de la actividad sérica de enzimas convertidoras de péptidos del RAS se realizó de forma prospectiva y, en consecuencia, el seguimiento medio de los pacientes se redujo a 32 meses. Por ello, para estudiar el valor predictivo de la actividad de las enzimas del RAS se realizaron correlaciones con modelos predictivos validados como el SSIGN y el UISS (Tabla 4.6).

Solamente la actividad sérica de la NEP/CD10 mostró valor predictivo al correlacionarlo con los diferentes grupos de ambos modelos. En el SSIGN, la actividad era más baja en los grupos de pacientes con riesgo intermedio (=1) y riesgo alto (=2) de progresión de la enfermedad en comparación con los de riesgo bajo (=0) (test H de Kruskal-Wallis  $p = 0,03$ , Figura 4.11A). Al analizar los tres grupos uno por uno, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de riesgo bajo y el de riesgo alto (test U de Mann-Whitney  $p=0,014$ ).

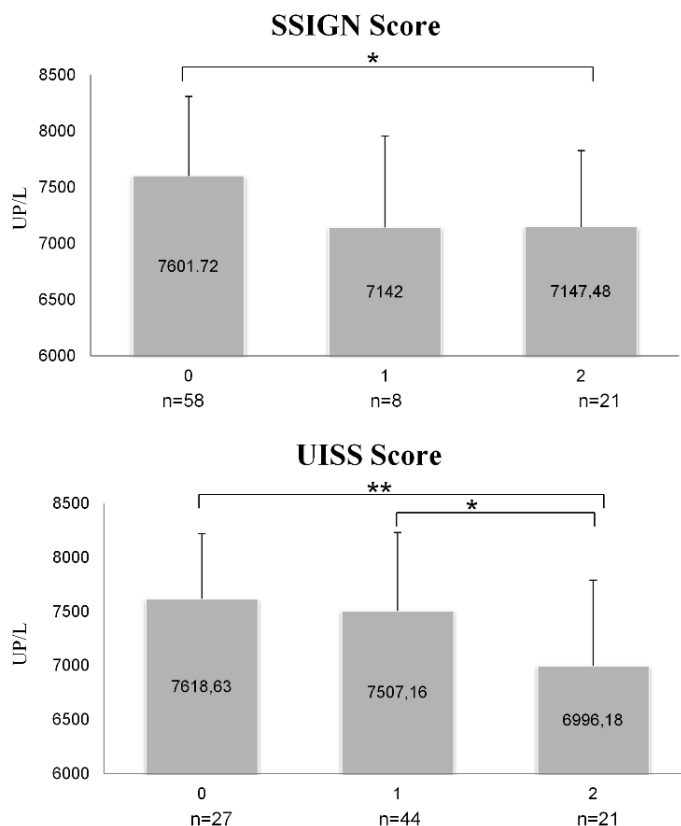
#### 4. Resultados. Emaitzak

**Tabla 4.6. Actividad sérica de las enzimas del RAS en pacientes con CCRCC en función de los modelos pronósticos SSIGN y UISS.** Los valores son medias  $\pm$  desviación estándar de UP/L. Los resultados estadísticamente significativos están resaltados en **negrita** (test H de Kruskal-Wallis).

	Score	n	NEP/CD10	APA	ACE2	ACE
SSIGN	0	58	7601 $\pm$ 705	2539 $\pm$ 688	817 $\pm$ 355	657 $\pm$ 187
	1	8	7142 $\pm$ 811	2292 $\pm$ 658	586 $\pm$ 56	703 $\pm$ 176
	2	21	7147 $\pm$ 676	2473 $\pm$ 546	703 $\pm$ 143	722 $\pm$ 216
	<b>p =</b>		<b>0,03</b>	0,255	<b>0,007</b>	0,669
UISS	0	27	7618 $\pm$ 601	2441 $\pm$ 686	728 $\pm$ 208	652 $\pm$ 151
	1	44	7507 $\pm$ 725	2533 $\pm$ 714	822 $\pm$ 376	695 $\pm$ 194
	2	17	6996 $\pm$ 794	2437 $\pm$ 470	698 $\pm$ 203	677 $\pm$ 250
	<b>p =</b>		<b>0,027</b>	0,842	0,252	0,725

De forma similar, al estratificar los resultados en función de los diferentes grupos del modelo UISS, se observó un descenso de la actividad NEP/CD10 en el grupo de pacientes con CCRCC con mayor riesgo de mortalidad (=2) (test H de Kruskal-Wallis  $p = 0,027$ , Figura 4.11B). Las diferencias en la actividad fueron significativas al comparar el grupo con riesgo bajo y el de riesgo intermedio con el de riesgo alto (test U de Mann-Whitney  $p=0,008$  y  $p=0,022$  respectivamente).

La actividad sérica de ACE2 también mostró valor predictivo al correlacionarlo con los diferentes grupos del modelo SSIGN (Tabla 4.6). De forma similar a la NEP/CD10, la actividad disminuyó en los grupos de pacientes con riesgo intermedio (=1) y riesgo alto (=2) de progresión de la enfermedad en comparación con los de riesgo bajo (=0) (test H de Kruskal-Wallis  $p = 0,03$ ). Este descenso, además, era más marcado en el grupo de riesgo intermedio que en el de riesgo alto. Así, al analizarlos uno por uno las diferencias fueron estadísticamente significativas entre el grupo de riesgo intermedio y los de riesgo bajo y alto (test U de Mann-Whitney  $p=0,003$  y  $p=0,036$  respectivamente).



**Figura 4.11. Actividad sérica de NEP/CD10 en función de los modelos pronósticos SSIGN y UISS.** Los valores son medias de UP/L. Para el análisis global entre grupos con diferente riesgo se empleó el test estadístico H de Kruskal-Wallis. Para el análisis uno a uno dentro de cada modelo se empleó el test U de Mann-Whitney  $p < 0,05$  (\*) y  $p < 0,01$  (\*\*).

#### 4.1.8 RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD SÉRICA DE LAS ENZIMAS DEL RAS CON LA SUPERVIVENCIA DE PACIENTES CON CCRCC

Teniendo en cuenta el valor predictivo de la actividad sérica de NEP/CD10 en pacientes con CCRCC, se decidió estudiar el impacto de la actividad sérica de las diferentes enzimas del RAS en la supervivencia de los pacientes, a pesar de que debido al carácter prospectivo del estudio el seguimiento medio se reducía a los 32 meses. Para ello, se establecieron puntos de corte para la actividad de cada enzima teniendo en cuenta la mediana de la actividad sérica del conjunto de los pacientes (Tabla 4.7).

#### 4. Resultados. Emaitzak

Tabla 4.7. Puntos de corte y valores log-rank para la actividad de las enzimas del RAS en la predicción de supervivencia de pacientes con CCRCC. El punto de corte se estableció en la mediana de la actividad de cada enzima. Los resultados estadísticamente significativos están resaltados en **negrita**.

Actividad enzimática	Valor de corte	Log-rank p=
NEP/CD10	7350	<b>0,007</b>
ACE2	730	0,518
APA	2350	0,52
ACE	650	0,206

Coincidiendo con lo observado con los modelos pronósticos SSIGN y UISS, únicamente la actividad sérica de NEP/CD10 obtuvo valores estadísticamente significativos (Tabla 4.7). Así, una actividad inferior a los 7350 UP/L correlacionó con una peor supervivencia (log-rank  $p = 0,007$ ) (Figura 4.12). Un resultado opuesto al observado con la expresión en el tejido tumoral, donde la expresión de NEP/CD10 en el CCRCC era un marcador de peor pronóstico.

#### Actividad sérica de NEP/CD10 en pacientes de CCRCC

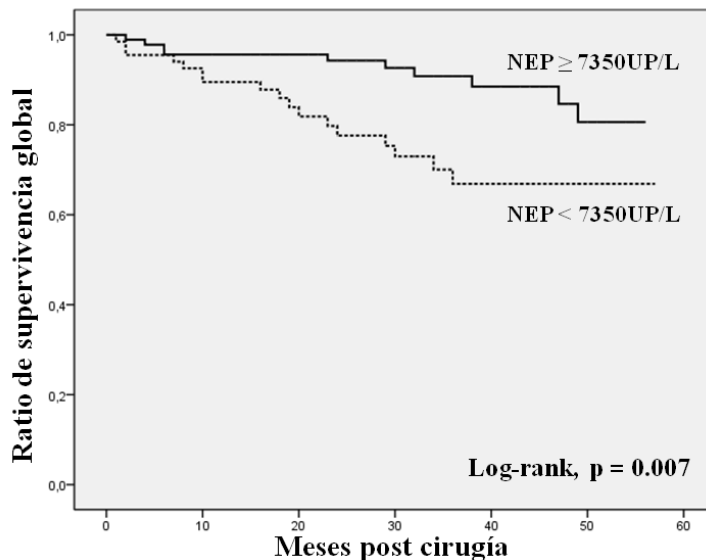


Figura 4.12. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con CCRCC en función de la actividad sérica de NEP/CD10. El punto de corte se estableció en la mediana de la actividad, a 7350 UP/L. El seguimiento medio se redujo a los 32,27 meses. .

#### 4. Resultados. Emaitzak

El análisis univariante demostró que diferentes variables clínico-patológicas como el diámetro del tumor, el grado, pT, la presencia de metástasis, los modelos UISS y SSIGN y también la actividad NEP/CD10 estaban relacionados con la supervivencia del paciente. Incluso la edad de los pacientes estuvo cerca de asociarse significativamente. Con estas variables se realizó un análisis multivariante de Cox con método condicionado hacia atrás (Tabla 4.8). Éste indicó que las variables que mejor predecían la supervivencia de pacientes con CCRCC eran los modelos UISS ( $p=0,001$ ) y SSIGN ( $p=0,09$ ) aunque este último no llegó a ser estadísticamente significativo.

**Tabla 4.8. Análisis univariante y multivariante (modelo de Regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas con capacidad predictiva de supervivencia en el CCRCC y la actividad NEP/CD10. (\*)** Probabilidad (p) y Odds ratio (OR) en el último paso del método condicionado hacia atrás. Los resultados estadísticamente significativos están resaltados en **negrita**.

Variables	Análisis univariante		Análisis multivariante	
	p =	OR	p =	OR
<b>Sexo</b>	0,189	0,544		
<b>Edad</b>	0,06	1,03	0,81	1,007
<b>Diámetro</b>				
≤7cm	<b>0,00003</b>	5,258	0,409	0,357
>7 cm				
<b>Grado</b>				
Bajo (G1-G2)	<b>0,001</b>	4,469	0,331	0,282
Alto (G3-G4)				
<b>Invasión local</b>				
Bajo (pT1-pT2)	<b>0,000052</b>	5,17	0,440	1,779
Alto (pT3-pT4)				
<b>Metástasis</b>				
No	<b>8,65·10<sup>-11</sup></b>	18,04	0,179	4,628
Sí				
<b>UISS Score</b>				
Bajo (0)	<b>0,000003</b>	7,744	0,095	7,046
Intermedio (1)			<b>0,001(*)</b>	6,052(*)
Alto (2)				
<b>SSIGN Score</b>				
Bajo (0)	<b>0,004</b>	2,324	0,24	1,536
Intermedio (1)			0,09(*)	1,73(*)
Alto (2)				
<b>Actividad NEP/CD10</b>				
≥7350 UP/L	<b>0,01</b>	0,359	0,378	0,523
<7350 UP/L				

## 4.2 CAPÍTULO 2: PROTEÍNA DE ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS $\alpha$ (FAP $\alpha$ ) EN EL CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (CCRCC)

### 4.2.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA EXPRESIÓN DE FAP $\alpha$ EN EL CCRCC

La expresión de FAP $\alpha$  en el CCRCC se detectó exclusivamente en los fibroblastos del estroma adyacente a las células tumorales epiteliales, con un patrón de tinción citoplasmático. En cambio, las células tumorales estudiadas no mostraron expresión de FAP $\alpha$  (Figura 4.13).

Así, en función de la arquitectura neoplásica del CCRCC se distinguían dos patrones de expresión de FAP $\alpha$  (Figura 4.13). Por un lado, en aquellos tumores con un patrón de crecimiento en nidos (A), la expresión de FAP $\alpha$  se detectó en los fibroblastos asociados a tumores (CAFs) que rodeaban los nichos tumorales con un patrón similar al *zellballen* de los paragangliomas (B). Por otro, en los tumores con un patrón de crecimiento difuso y no organoideo (C), se observaron fibroblastos FAP $\alpha$  positivos entremezclados con células epiteliales neoplásicas sin ningún patrón de distinción identificativos (D). Estos dos patrones dependen exclusivamente de la arquitectura tumoral y no de otros parámetros clínicos como el grado de Fuhrman u otra característica de células tumorales.

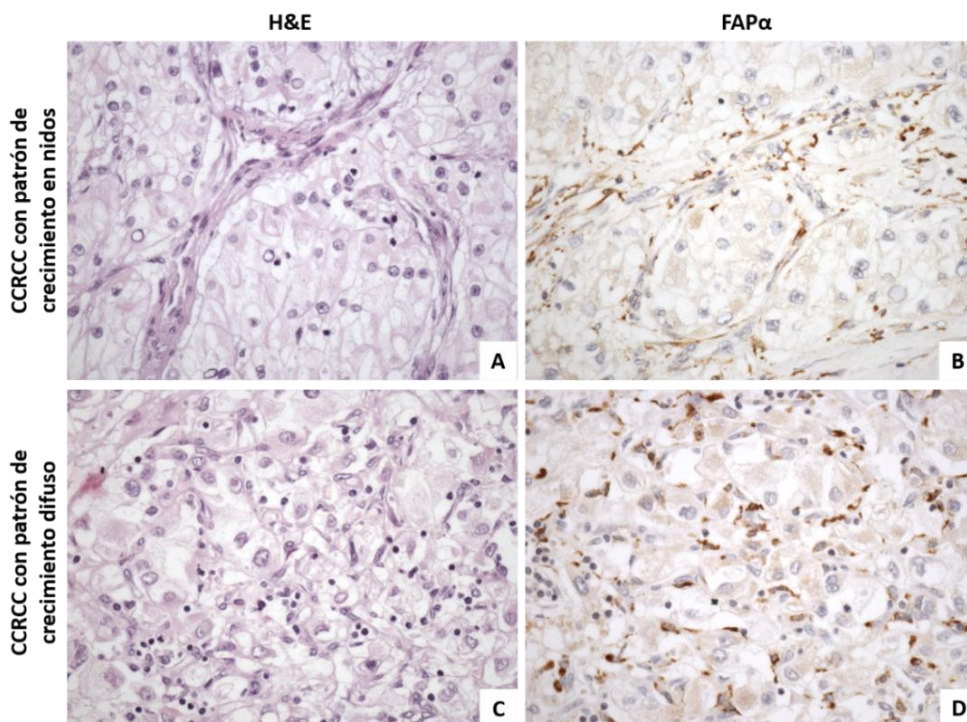


Figura 4.13. Tinción H&E e inmunohistoquímica de FAP $\alpha$  en CCRCCs con patrón de crecimiento en nidos o difuso. La tinción de FAP $\alpha$  se detectó exclusivamente en CAFs y su análisis se efectuó de forma cualitativa, presencia vs ausencia. (Aumento original, x400 para tumores).

#### 4.2.2 LA EXPRESIÓN DE FAP $\alpha$ EN FUNCIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE PACIENTES CON CCRCC

La expresión de FAP $\alpha$  correlacionó de forma estadísticamente significativa con parámetros de agresividad en el CCRCC al analizarlos con el test estadístico chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) (Tabla 4.9). Al estratificar los resultados en función del grado histológico, solo el 16,8% de lo CCRCCs de grado bajo eran positivos para FAP $\alpha$ , frente al 41,1% de los de grado alto ( $p=0,000135$ ). De forma similar, sólo en 1 de cada 5 CCRCCs localizados (pT1 y pT2) se detectó la expresión de FAP $\alpha$ , mientras que la cifra prácticamente se duplicaba, hasta un 38%, en tumores con invasión local pT3 y pT4 ( $p=0,01$ ). Se detectó la misma tendencia al analizar tumores en función del tamaño, observándose mayor número de positivos en tumores mayores de 7cm respecto a los menores ( $p=0,019$ ). El test de Rho de Spearman también mostró una correlación positiva entre expresión de FAP $\alpha$  y el diámetro tumoral ( $p= 0,008$ ).

#### 4. Resultados. Emaitzak

**Tabla 4.9. Expresión de FAP $\alpha$  en función de variables clínico-patológicas en CCRCCs primarios.** El grado de Fuhrman y la invasión tisular se analizaron de forma agrupada. Para el diámetro el punto de corte se estableció en 7 cm-s. El test estadístico chi-cuadrado fue empleado para analizar las diferencias en la expresión en función de las diferentes variables ( $\chi^2$ ). Los resultados estadísticamente significativos están resaltados en **negrita**.

<b>Variables</b>	<b>Negativo (%)</b>	<b>Positivo (%)</b>	<b>Total (n)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Diámetro</b>				
≤ 7cm	79,8	20,2	129	<b>0,019</b>
> 7cm	64,9	35,1	74	
<b>Grado agrupado</b>				
Bajo (G1-G2)	83,2	16,8	131	<b>0,00135</b>
Alto (G3-G4)	58,9	41,1	73	
<b>pT agrupada</b>				
Baja (pT1-pT2)	79,5	20,5	146	<b>0,01</b>
Alta (pT3-pT4)	62,1	37,9	58	

#### 4.2.3 ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FAP $\alpha$ CON LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON CCRCC

La expresión de FAP $\alpha$  se asocia a una peor supervivencia a los 5, 10 y 15 años (Tabla 4.10). Diferencias significativas son detectables en fases tan tempranas como los 20 meses. Los pacientes con tumores FAP $\alpha$  positivos tienen una probabilidad de un 76% de fallecer antes que aquellos con FAP $\alpha$  negativos. La Figura 4.14 muestra la curva Kaplan Meyer para la supervivencia a 10 años.

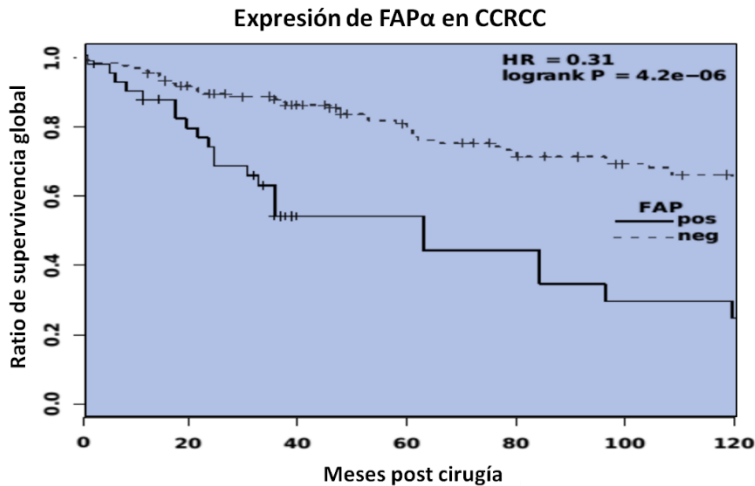
**Tabla 4.10. Valores de la P del test Log-Rank del análisis de supervivencia de las variables clínico-patológicas y la expresión de FAP $\alpha$  para pacientes con CCRCC.** La supervivencia se estudió a 5, 10 y 15 años.

	<b>Grado</b>	<b>pT</b>	<b>Diámetro</b>	<b>FAP<math>\alpha</math></b>
<b>5 años</b>	0,0000087	0,00000000085	0,0000001	0,00015
<b>10 años</b>	0,00000025	0,000000031	0,000013	0,0000042
<b>15 años</b>	0,000000083	0,000000001	0,0000082	0,000043



#### 4. Resultados. Emaitzak

El grado histológico, la invasión tisular (pT) y el diámetro tumoral también mostraron esta asociación (Tabla 4.10). En cambio, el sexo de los pacientes no supuso diferencia alguna en cuanto a la supervivencia (log-rank  $p > 0,05$ ).



**Figura 4.14.** Curvas de Kaplan Meyer para el análisis de la supervivencia en pacientes con CCRCC en función de la expresión de FAP $\alpha$ . El análisis de la supervivencia se llevó a cabo en 177 pacientes. La valoración de la expresión fue categórica (presencia vs ausencia). La curva muestra la supervivencia a 10 años.

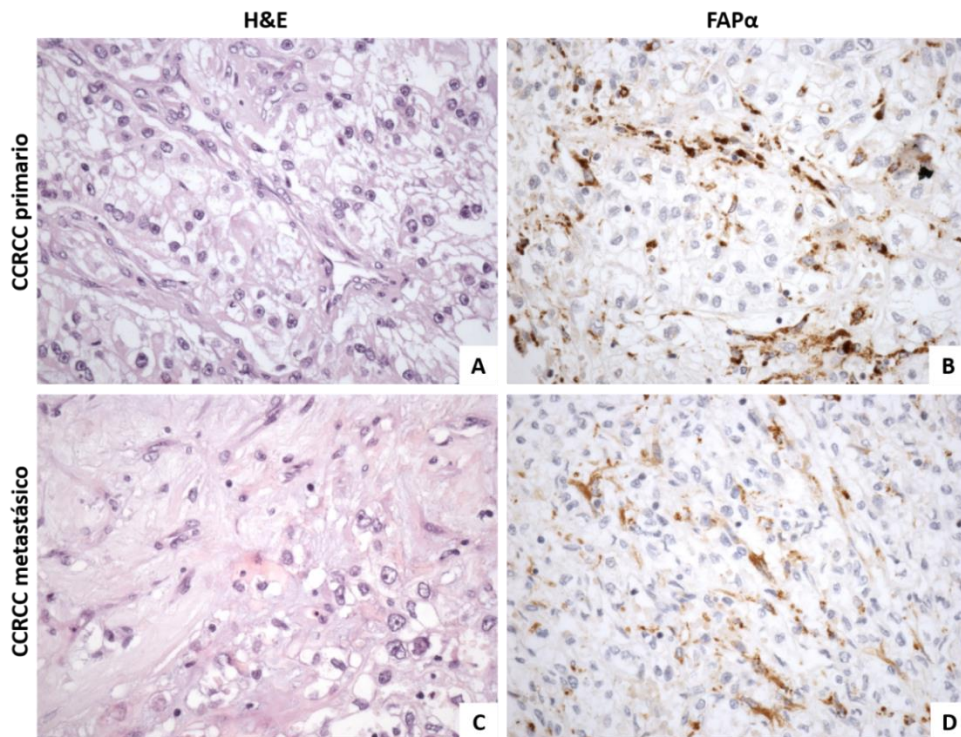
El análisis univariante mostró la asociación del grado, la pT y el diámetro del tumor y la expresión de FAP $\alpha$  con la supervivencia a 10 años (Tabla 4.11). Además, el análisis multivariante (Regresión de Cox) destacó la expresión de FAP $\alpha$  como la variable con mayor potencial pronóstico entre las estudiadas. También se obtuvieron resultados significativos para el grado y la invasión local (Tabla 4.11).

**Tabla 4.11.** Análisis univariante y multivariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas con capacidad predictiva de supervivencia en el CCRCC junto con la expresión de FAP $\alpha$ . Los resultados estadísticamente significativos se subrayan en **negrita**.

Variables	Análisis univariante	Análisis multivariante
	<b>p =</b>	<b>p =</b>
<b>Diámetro</b>	<b>0,000028</b>	0,64408
<b>Grado</b>	<b>0,00000124</b>	<b>0,04162</b>
<b>Invasión local (pT)</b>	<b>6,66·10<sup>-10</sup></b>	<b>0,02106</b>
<b>Expresión de FAP<math>\alpha</math></b>	<b>7,64·10<sup>-7</sup></b>	<b>0,00117</b>

#### 4.2.4 EXPRESIÓN DE FAP $\alpha$ EN EL CCRCC METASTÁSICO (mCCRCC) Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

La expresión de FAP $\alpha$  se estudió en 59 mCCRCCs. El análisis en el tejido metastásico sólo se pudo llevar a cabo en 54 de ellos, debido a lo limitado de la muestra. Su expresión se detectó en el 36% y el 44% de los tumores primarios y metastásicos estudiados, respectivamente, con un patrón de tinción idéntico al observado en la primera serie analizada (Figura 4.15). En CCRCCs primarios con patrón de crecimiento en nichos (A), la expresión de FAP $\alpha$  se detectó en los CAFs que definían los lóbulos (B). En los que tenían un crecimiento difuso sin estructura reconocible, como la metástasis de nodo linfático de la imagen (C), los CAFs FAP $\alpha$  positivos se entremezclaban con células tumorales (D). Además, se observó una correlación positiva entre la expresión de FAP $\alpha$  en los tumores primarios y sus metástasis (test rho de Spearman  $r = 0,51$ ;  $p = 0,0001$ ).



**Figura 4.15. Tinción H&E e inmunohistoquímica de FAP $\alpha$  en CCRCC primario y metastásico.** La tinción de FAP $\alpha$  se detectó exclusivamente en CAFs y su análisis se efectuó de forma cualitativa, presencia vs ausencia. (Aumento original, x400 para tumores).

#### 4. Resultados. Emaitzak

La expresión de FAP $\alpha$  tanto en el tumor primario como en el metastásico correlacionó de forma estadísticamente significativa con diferentes parámetros patológicos de agresividad (Tabla 4.12 y Tabla 4.13 respectivamente). Así, la expresión era significativamente mayor en tumores primarios con grado y pT alto, también en los que mostraban diferenciación sarcomatoide y en los tumores primarios necróticos (Tabla 4.12).

**Tabla 4.12. Expresión de FAP $\alpha$  en función de variables clínicas y patológicas en CCRCs primarios.** El grado de Fuhrman y la invasión tisular se analizaron de forma agrupada. El test estadístico chi-cuadrado fue empleado para analizar las diferencias en la expresión en función de las diferentes variables ( $\chi^2$ ). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en **negrita**.

<b>Variables</b>	<b>Negativo (%)</b>	<b>Positivo (%)</b>	<b>Total (n)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Diámetro</b>				
≤ 7cm	74	26	34	0,088
> 7cm	52	48	25	
<b>Grado agrupado</b>				
Bajo (G1-G2)	88	12	24	<b>0,002</b>
Alto (G3-G4)	49	51	35	
<b>pT agrupada</b>				
Baja (pT1-pT2)	81	19	32	<b>0,003</b>
Alta (pT3-pT4)	44	56	27	
<b>Sarcomatoide</b>				
No	69	31	55	<b>0,005</b>
Si	0	100	4	
<b>Necrosis</b>				
No	86	14	29	<b>0,001</b>
Si	43	57	30	
<b>Metástasis</b>				
Sincrónicas	14	86	14	<b>0,0001</b>
Metacrónicas	80	20	45	
<b>Localización</b>				
Nodos linfáticos	25	75	12	<b>0,005<sup>(a)</sup></b>
Tejidos epiteliales	77	23	31	
Tejidos blandos y óseo	69	31	16	

(a) La expresión de FAP $\alpha$  fue significativamente más alta en tumores primarios con metástasis a nodos linfáticos que en los que metastatizaron a tejidos epiteliales, blandos u óseos.

#### 4. Resultados. Emaitzak

En las metástasis, FAP $\alpha$  correlacionó con todas las variables patológicas excepto el grado histológico (Tabla 4.13).

Otro resultado relevante fue que la expresión de FAP $\alpha$  correlacionó positivamente con la detección temporal de las metástasis (Tabla 4.13). En aquellos pacientes que presentaron metástasis sincrónicas se detectó la presencia de FAP $\alpha$  en el 86% de los tumores primarios y en el 83% de las metástasis. En cambio, de aquellos pacientes que desarrollaron las metástasis meses o años después del diagnóstico, solamente un 20% de los tumores primarios y un 33% de los metastásicos fueron FAP $\alpha$  positivos.

**Tabla 4.13. Expresión de FAP $\alpha$  en función de variables clínicas y patológicas en tejido metastásico.** El grado de Fuhrman y la invasión tisular se analizaron de forma agrupada. El test estadístico chi-cuadrado fue empleado para analizar las diferencias en la expresión en función de las diferentes variables ( $\chi^2$ ). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en **negrita**.

Variables	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (n)	Valor P
<b>Diámetro</b>				
≤ 7cm	70	30	30	<b>0,017</b>
> 7cm	37	73	24	
<b>Grado agrupado</b>				
Bajo (G1-G2)	65	35	23	0,22
Alto (G3-G4)	48	52	31	
<b>pT agrupada</b>				
Baja (pT1-pT2)	72	28	29	<b>0,007</b>
Alta (pT3-pT4)	36	64	25	
<b>Sarcomatoide</b>				
No	59	41	51	<b>0,046</b>
Si	0	100	3	
<b>Necrosis</b>				
No	78	22	27	<b>0,001</b>
Si	33	67	27	
<b>Metástasis</b>				
Sincrónicas	17	83	12	<b>0,002</b>
Metacrónicas	67	33	42	
<b>Localización</b>				
Nodos linfáticos	31	69	13	<b>0,021<sup>(a)</sup></b>
Tejidos epiteliales	69	31	29	
Tejidos blandos y óseo	50	50	12	

(a) La expresión de FAP $\alpha$  fue significativamente más alta en metástasis a nodos linfáticos que en los de tejidos epiteliales.

#### 4. Resultados. Emaitzak

Atendiendo a su localización, la mitad de las metástasis sincrónicas se detectaron en nodos linfáticos, mientras que la otra mitad se repartía con un 29% en tejidos epiteliales y el 21% restante en tejidos blandos y en el hueso. Esta distribución cambiaba radicalmente para las metástasis metacrónicas, de las cuales la gran mayoría, un 59%, se detectaron en tejidos epiteliales. Un 28% se detectaron en tejidos blandos o en huesos y solamente un 13% fueron metástasis linfáticas. Las diferencias temporales y topográficas observadas fueron estadísticamente significativas (test Chi-cuadrado  $\chi^2$ ;  $p=0,002$  y  $p=0,012$  respectivamente).

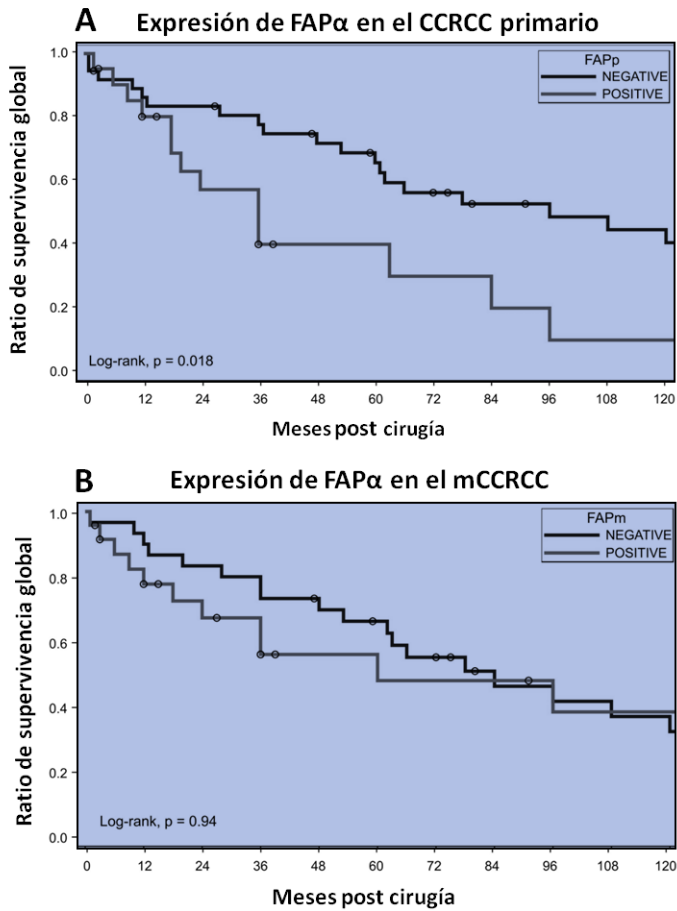
En cuanto a la expresión de FAP $\alpha$ , el 75% de los tumores primarios que metastatizaron a nodos linfáticos fueron positivos. Este porcentaje disminuía hasta un 31% en los tumores primarios que metastatizaron a tejidos blandos u óseos y más aún, hasta un 23%, en los que lo hicieron a tejidos epiteliales. El patrón era similar al estudiar el tejido metastásico, en el que se observó una expresión de FAP $\alpha$  significativamente superior en metástasis linfáticas que en tejidos epiteliales.

No se detectó asociación alguna entre el sexo y la edad de los pacientes con mCCRCC y la expresión de FAP $\alpha$  (test rho de Spearman  $p > 0,05$ ).

##### 4.2.5 IMPACTO DE LA EXPRESIÓN DE FAP $\alpha$ EN LA SUPERVIVENCIA A 10 AÑOS DE PACIENTES CON mCCRCC

Las curvas de Kaplan Meyer mostraron que la expresión de FAP $\alpha$  en los tumores primarios de pacientes con mCCRCC se asoció con una peor supervivencia a los 10 años (log-rank  $p=0,018$ ). En cambio, su expresión en el tejido metastásico no mostró valor pronóstico (log-rank  $p=0,94$ ) (Figura 4.16).

#### 4. Resultados. Emaitzak



**Figura 4.16. Curvas de Kaplan Meyer para el análisis de la supervivencia en pacientes con CCRC primario (A) y metastásico (B) en función de la expresión de FAP $\alpha$ . La valoración de la expresión fue categórica (presencia vs ausencia). Las curvas muestran la supervivencia a 10 años.**

La expresión de FAP $\alpha$  en el tumor primario, la necrosis tumoral y la sincronidad en la detección de metástasis alcanzaron valores estadísticamente significativos mediante análisis univariante (Tabla 4.14). De hecho, esta última variable fue la única en alcanzar valores estadísticamente significativos como factor pronóstico independiente en el análisis multivariante mediante regresión de Cox ( $p=0,0007$ ). Excluyendo esta variable del modelo, la expresión de FAP $\alpha$  en el tumor primario ( $p = 0,0608$ ) y la localización metastásica en los nodos linfáticos ( $p = 0,139$ ) fueron los factores que mejor se definían como factores pronósticos del mCCRC, pese a que no se alcanzó significación estadística (Tabla 4.14).

#### 4. Resultados. Emaitzak

Tabla 4.14. Análisis univariante y multivariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas con capacidad predictiva de supervivencia en el CCRCC junto con la expresión de FAP $\alpha$  en tumores primarios y metastásicos. Los resultados estadísticamente significativos se subrayan en negrita.

ANÁLISIS UNIVARIANTE					
Variable	Descripción	Odds ratio	Intervalo de confianza		Valor P Log-rank
Diámetro	$\leq 7\text{cm}$ vs $> 7\text{cm}$	1,18	1,63	0,44	0,61
Grado agrupado	Bajo (G1-G2) vs Alto (G3-G4)	1,19	0,62	2,28	0,59
pT agrupada	Baja (pT1-pT2) vs Alta (pT3-pT4)	1,01	0,53	1,93	0,97
Sarcomatoide	No/Sí	2,66	0,61	11,63	0,17
Necrosis	No/Sí	2,17	1,11	4,25	<b>0,02</b>
Sincronicidad	Sincrónico vs Metacrónico	6,29	2,44	16,13	<b>&lt;0,0001</b>
Localización	Nodos linfáticos vs tejidos epiteliales	1,78	1,3	0,24	0,39
	Nodos linfáticos vs tejidos blandos y óseos	1,53	1,67	0,26	
	Tejido epitelial vs tejidos blandos y óseos	0,86	2,45	0,56	
	Nodos linfáticos vs resto	1,69	1,31	0,26	
FAPp	Negativo vs positivo	2,27	1,12	4,57	<b>0,018</b>
FAPm	Negativo vs positivo	1,03	0,51	2,08	0,94
ANÁLISIS MULTIVARIANTE					
Variable	Descripción	Odds ratio	Intervalo de confianza		Valor P Cox
Sincronicidad	Sincrónico vs Metacrónico	6,29	2,44	16,13	<b>0,0007</b>
ANÁLISIS MULTIVARIANTE (excluyendo sincronicidad)					
Variable	Descripción	Odds ratio	Intervalo de confianza		Valor P Cox
FAPp	Negativo vs positivo	1,94	0,79	4,75	0,06
Localización	Nodos linfáticos vs resto	1,9	0,88	4,1	0,14

##### 4.2.6 CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FAP $\alpha$ CON MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (EMT)

La expresión de FAP $\alpha$  correlaciona con parámetros clínico-patológicos como el grado, la invasión local y el diámetro en el CCRCC y es además un marcador de mal pronóstico, ya que pacientes con tumores FAP $\alpha$  positivos tienen peor supervivencia. Además, en el mCCRCC, su expresión correlaciona con diferentes parámetros de agresividad tumoral, como la sincronidad de las metástasis, la diferenciación sarcomatoide o la presencia de necrosis.

En conjunto, estos resultados sugieren la implicación de FAP $\alpha$  en el desarrollo de metástasis. Para estudiar la relación de FAP $\alpha$  con este aspecto del avance tumoral, se estudió la correlación de la expresión de FAP $\alpha$  con la de marcadores de transición epitelio-mesénquima (EMT).

Así, se observó una correlación positiva estadísticamente significativa entre la expresión de FAP $\alpha$  y la de la vimentina, tanto en tumores primarios como en los metastáticos (test Rho de Spearman  $p=0,003$  y  $p=0,02$  respectivamente). En cambio, no se observaron correlaciones con el resto de los marcadores analizados (Tabla 4.15).

La asociación entre la expresión de FAP $\alpha$  y la de la vimentina en tejido de tumores primarios y metastáticos se analizó mediante el test chi cuadrado de Pearson  $\chi^2$ . Por un lado, de los 18 tumores primarios vimentina positivos, un 61,1% (11), también expresó FAP $\alpha$ . En cambio, de entre los 38 CCRCCs vimentina negativos, solamente 8 fueron FAP $\alpha$  positivos, el 21,1% ( $\chi^2 p=0,003$ ). De forma similar, en el tejido metastático, 19 de las 36 metástasis vimentina positivas también marcaron FAP $\alpha$  (52,8%). En cambio, solamente 3 metástasis fueron FAP $\alpha$  positivas entre las 16 que eran vimentina negativas ( $\chi^2 p=0,022$ ).



#### 4. Resultados. Emaitzak

Tabla 4.15. Correlaciones entre la expresión de FAP $\alpha$  y marcadores de transición epitelio-mesénquima en tejido de CCRCC primario (FAPp) y metastásico (FAPm). Las correlaciones se analizaron mediante el test estadístico Rho de Pearson. Las diferencias estadísticamente significativas se subrayan en **negrita**.

		Vimentina	$\beta$ -catenina	E-cadherina	N-cadherina	WT-1
<b>FAPp</b>	$r^2$	0,395	0,215	-0,070	0,118	0,188
	p=	<b>0,003</b>	0,112	0,611	0,388	0,165
		mVimentina	m $\beta$ -catenina	mE-cadherina	mN-cadherina	mWT-1
<b>FAPm</b>	$r^2$	0,318	0,161	0,100	0,226	0,219
	p=	<b>0,022</b>	0,249	0,472	0,103	0,111

#### 4.2.7 EFECTO DEL SECRETOMA DE LAS LÍNEAS DE RCC EN LA EXPRESIÓN DE FAP $\alpha$

El medio condicionado (CM) generado mediante incubación tanto con células de RCC primarias (A498) como metastásicas (Caki-1) mostró potencial para la inducción de la expresión de FAP $\alpha$  en la línea de fibroblastos GM06114 (Figura 4.17). Así, su expresión génica aumentó 2,5 y 3 veces de media para medios condicionados generados a partir de la línea de RCC primario y metastásico respectivamente (test U de Mann-Whitney p=0,037 para ambas líneas).

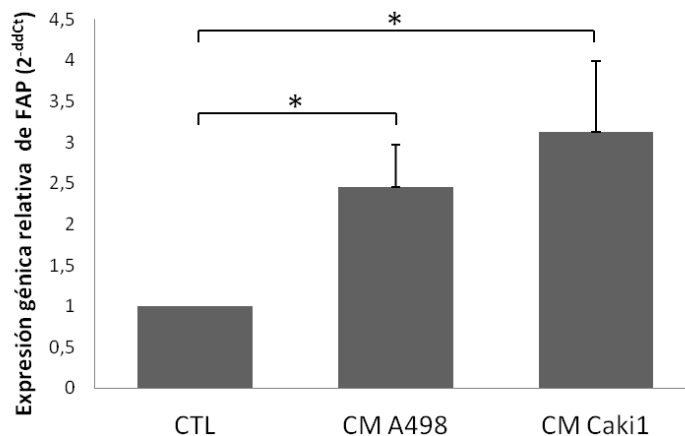


Figura 4.17. Expresión génica relativa de FAP $\alpha$  en la línea de fibroblastos GM06114. La expresión se analizó mediante qPCR tras 24 horas de incubación con medios condicionados provenientes de líneas de RCC primario y metastásico. Las diferencias se estudiaron mediante el test estadístico U de Mann-Whitney (\*) p < 0,05.

#### 4. Resultados. Emaitzak

La inducción de la expresión de FAP $\alpha$  mediante medios condicionados de líneas de RCC se analizó también a nivel proteico. La detección mediante inmunofluorescencia mostró el aumento de expresión de FAP $\alpha$  tras 48 horas de incubación con medios originados en ambas líneas de RCC a pesar de que la línea expresaba FAP $\alpha$  en su estado basal (Figura 4.18).

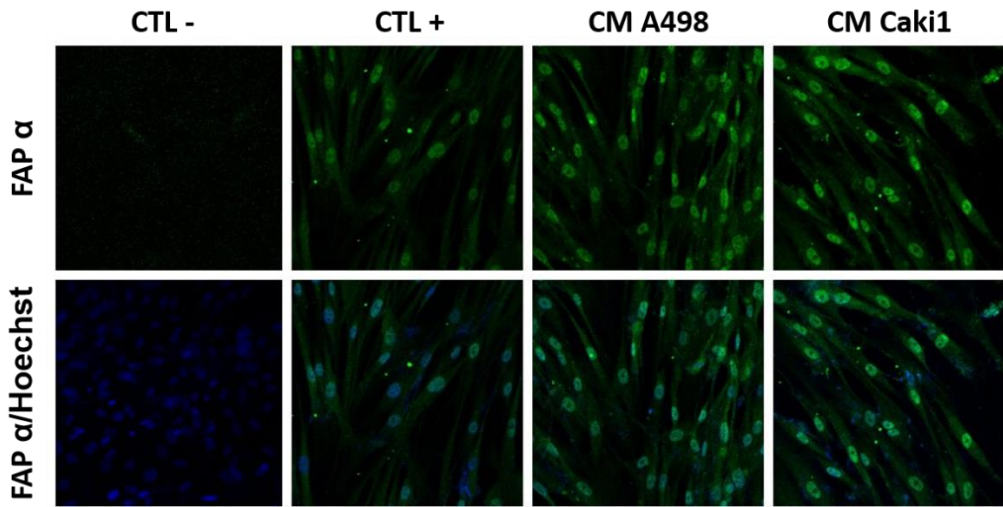
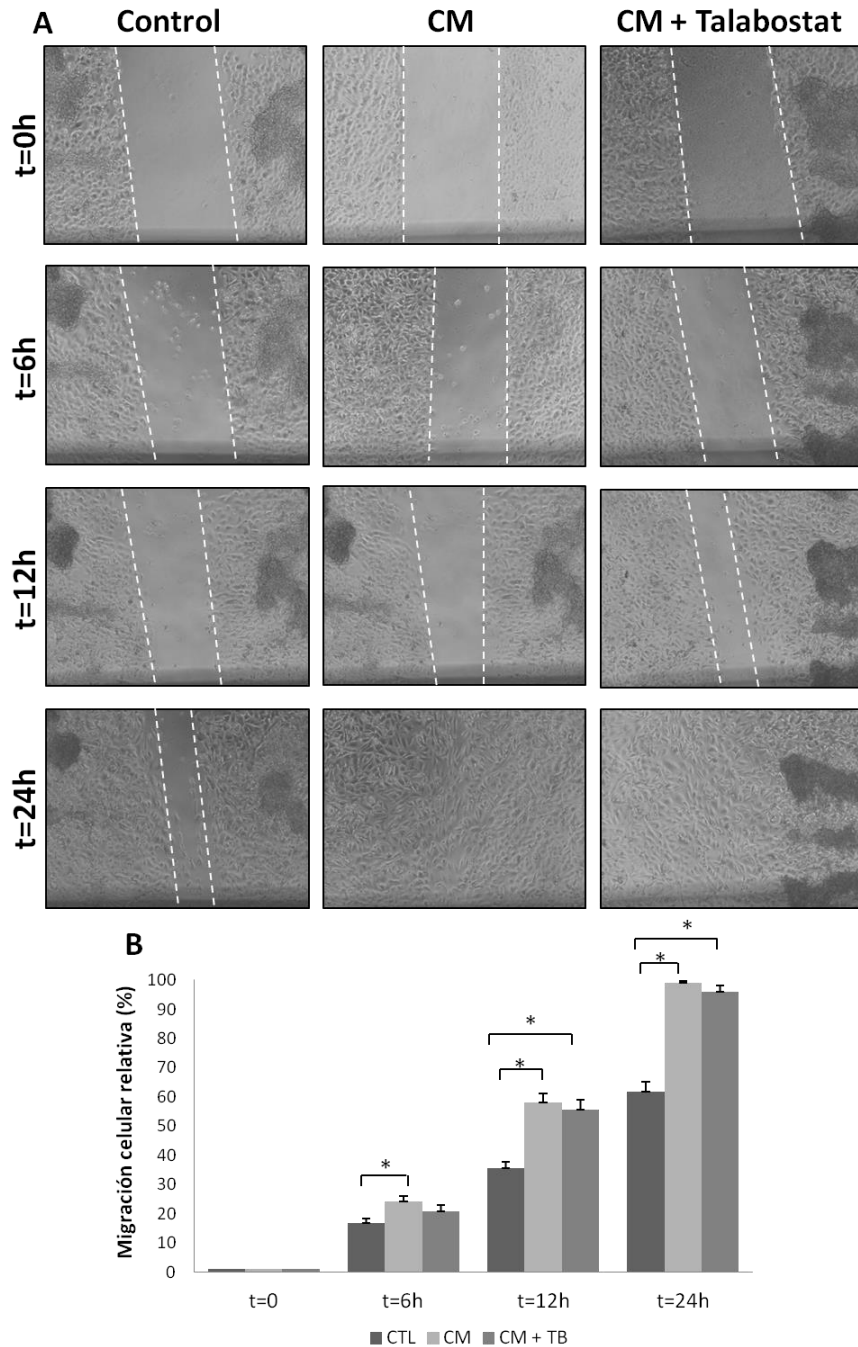


Figura 4.18. Análisis de la expresión proteica de FAP $\alpha$  en la línea GM06114 mediante inmunofluorescencia. La expresión se analizó mediante inmunofluorescencia tras 48 horas de incubación con medio condicionado. Para el control negativo, la incubación con el anticuerpo primario se sustituyó por una incubación con tampón fosfato salino (PBS). (Aumento original,x20)

#### 4.2.8 EFECTO DEL SECRETOMA DE LOS FIBROBLASTOS EN LA MIGRACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE RCC PRIMARIAS

Los ensayos *Wound Healing* demostraron un aumento estadísticamente significativo de la migración de células de RCC provenientes de tumores primarios al tratarlos con el medio condicionado generado a partir de células de fibroblasto (Figura 4.19 y Figura 4.20). Así, en ambas líneas de RCC primarias la migración celular aumentó de forma significativa en las células tratadas con CM, a partir de las 6 horas de incubación.

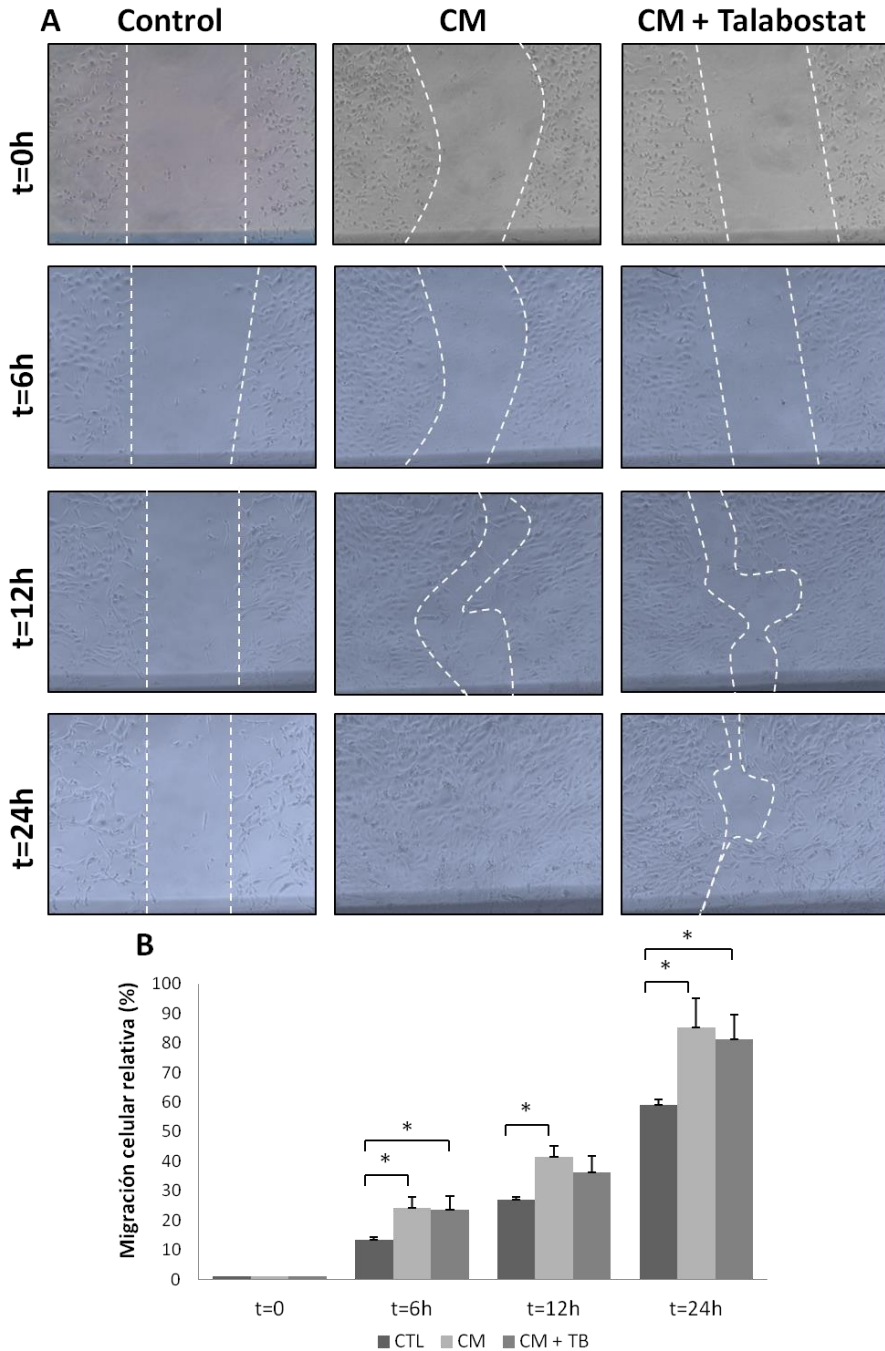


**Figura 4.19.** Efecto del medio condicionado proveniente de células de fibroblasto en la migración de la línea de RCC primario A498. Para el análisis de la migración celular se emplearon ensayos de *Wound Healing* (A) en los que la migración relativa fue calculada a partir de la reducción del área de la herida mediante el Wound Healing Tool de ImageJ. Las diferencias globales entre diferentes grupos se analizaron mediante el test estadístico ANOVA y para las de dos grupos concretos se empleó la prueba post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ). (B). Imágenes representativas de 3 ensayos independientes.

#### 4. Resultados. Emaitzak

La FAP $\alpha$  es una serina peptidasa que se expresa en la membrana de fibroblastos activos, pero también puede ser secretada al medio extracelular y detectarse en fluidos biológicos (199). Con objeto de estudiar si el medio condicionado generado a partir de la línea de fibroblastos GM06114 contiene FAP $\alpha$  soluble y está implicada en el aumento de la migración, se añadió a dicho medio el Talabostat, un inhibidor de la actividad serina proteasa de FAP $\alpha$ . Sin embargo, no se observaron cambios significativos al añadir este inhibidor al medio condicionado, ya que la migración de estas células fue la misma que la observada para las células tratadas con CM sin inhibidor (Figura 4.19).

En la línea 786O, de forma similar a lo observado en la A498, se observaron cambios estadísticamente significativos entre la migración de las células tratadas con CM y sus respectivos controles en cada punto de incubación (Figura 4.20). El hecho de añadir Talabostat a este medio condicionado no inhibía el proceso.



**Figura 4.20.** Efecto del medio condicionado proveniente de células de fibroblasto en la migración de la línea de RCC primario 786O. Para el análisis de la migración celular se emplearon ensayos de *Wound Healing* (A) en los que la migración relativa fue calculada a partir de la reducción del área de la herida mediante el Wound Healing Tool de ImageJ. Las diferencias globales entre diferentes grupos se analizaron mediante el test estadístico ANOVA y para las de dos grupos concretos se empleó la prueba post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ). (B). Imágenes representativas de 3 ensayos independientes.

### 4.2.9 EFECTO DEL CO-CULTIVO CELULAR ENTRE LÍNEAS DE RCC PRIMARIAS Y FIBROBLASTOS

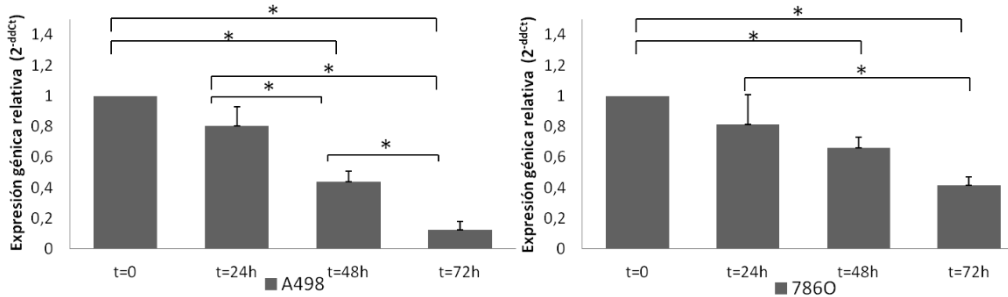
Con el objeto de estudiar el efecto de la interacción entre líneas celulares primarias de RCC y células de fibroblasto se llevaron a cabo co-cultivos indirectos entre las líneas de cáncer renal 786O y A498 y la línea de fibroblastos GM06114. Posteriormente se realizó el análisis de la expresión de diferentes genes claves en el desarrollo del cáncer.

Así, se analizó la expresión de genes implicados en la migración, angiogénesis o el ciclo celular de las células tumorales tras 24, 48 y 72 horas de co-cultivo. Para el análisis global de la expresión de cada gen en los diferentes tiempos de co-cultivo se empleó el test estadístico ANOVA, seguido del test post-hoc de Tukey para ver puntos concretos en los que las diferencias eran estadísticamente significativas.

Entre los genes implicados en la migración y la invasión de las células tumorales, se analizó la expresión de marcadores de la transición epitelio-mesénquima (EMT) como  $\alpha$ SMA, vimentina, N-cadherina, Snail y Slug junto con el de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9). La expresión de  $\alpha$ SMA, vimentina, Snail y metaloproteinasas 2 y 9 no cambió de forma significativa debido al co-cultivo en ninguna de las líneas celulares (test ANOVA  $p > 0,05$ ).

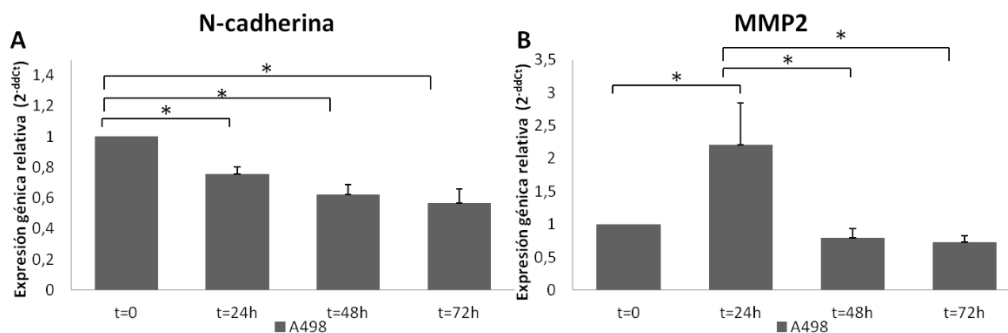
En cambio, se observó una reducción de la expresión del factor de transcripción Slug (Figura 4.21). Este descenso de la expresión fue progresivo en función del tiempo de co-cultivo en ambas líneas de RCC (test ANOVA  $p = 0,00003$  y  $p = 0,008$  para A498 y 786O respectivamente). Además, fue más marcado en la línea A498, ya que a las 48 horas, la expresión ya era inferior a la mitad del control, umbral considerado límite en la relevancia de la expresión génica (352). En la línea 786O, esta condición únicamente se cumplía a las 72 horas de incubación. También se observó una reducción de la expresión del factor de transcripción Snail en ambas líneas celulares, el cual se mantuvo entorno al 50% en los diferentes tiempos de incubación, pero este resultado no obtuvo significación estadística.

## 4. Resultados. Emaitzak



**Figura 4.21. Expresión génica relativa del factor de transcripción Slug en líneas de RCC primario en función del tiempo de co-cultivo con la línea de fibroblastos GM06114.** El análisis de la expresión se llevó a cabo mediante qPCR. Para estudiarla de forma global se empleó el estadístico ANOVA. En la figura se observan las diferencias significativas entre tiempos de co-cultivo específicos según el test post-hoc de Tukey (\*)  $p < 0,05$ . Los resultados son medias de 3 experimentos independientes.

Además del de Slug, pero en este caso únicamente en la línea A498, la expresión de N-cadherina y MMP2 también mostraron cambios estadísticamente significativos (Figura 4.22). Así, la expresión de la N-cadherina disminuyó paulatinamente hasta el 56% en comparación con el control tras 72 horas de co-cultivo. A pesar de la significación estadística la reducción no llegó a pasar el umbral del 50%. La metaloproteinas 2 o MMP2 mostró un aumento de la expresión a las 24 horas de co-cultivo entre la línea A498 y la GM06114 en comparación tanto con el control como con el resto de los tiempos de co-cultivo, en los que la expresión volvía a recuperar niveles cercanos a los basales a las 48 y 72h.

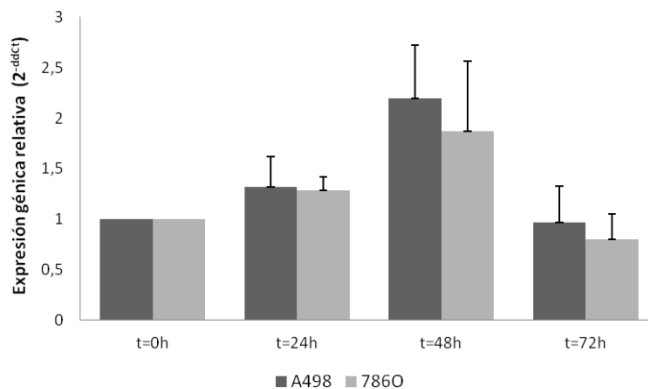


**Figura 4.22. Expresión génica relativa de N-cadherina y MMP2 en la línea A498 en función del tiempo de co-cultivo con la línea de fibroblastos GM06114.** El análisis de la expresión se llevó a cabo mediante qPCR. Para estudiarla de forma global se empleó el estadístico ANOVA. En la figura se observan las diferencias significativas entre los diferentes tiempos de co-cultivo según el test post-hoc de Tukey. Los resultados son medias de 3 experimentos independientes.

#### 4. Resultados. Emaitzak

Al contrario, genes relacionados con la angiogénesis como VEGF, HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  y relacionados con la proliferación como la ciclina D1 no mostraron cambios en su expresión a consecuencia del co-cultivo con la línea de fibroblastos GM06114.

Además, se estudió el efecto del co-cultivo en la expresión de FAP $\alpha$  en la línea de fibroblastos GM06114. A pesar de que se observó un aumento de la expresión a las 48 horas de co-cultivo con ambas líneas de RCC, los cambios no fueron estadísticamente significativos (test ANOVA  $p > 0,05$ , Figura 4.23).



**Figura 4.23. Análisis de la expresión génica relativa de FAP $\alpha$  en la línea GM06114 a 24, 48 y 72 horas de co-cultivo indirecto con líneas de RCC primario.** Para el análisis estadístico de los cambios de expresión en el tiempo se empleó el test estadístico ANOVA. Los resultados son medias de 3 experimentos independientes.





## **5. DISCUSIÓN. Eztabaida**



## **5.1 CAPÍTULO 1: ESTUDIO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRARRENAL (iRAS) EN EL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES**

En su concepto clásico, el sistema renina-angiotensina (RAS) es un sistema hormonal circulante fundamental en la homeostasis cardiocirculatoria y renal. Sin embargo, estudios básicos en cultivos celulares, modelos animales y tejidos humanos han demostrado la existencia de RAS locales (iRAS), los cuales regulan el crecimiento y la diferenciación celular a medio y largo plazo en diferentes tejidos. Además, estos sistemas locales se han visto alterados en diversos procesos proliferativos, lo que sugiere que desempeñan un papel relevante en su desarrollo (93,103).

El riñón no sólo contiene todos los componentes para desarrollar una señalización mediante péptidos de angiotensina completa, sino que se ha demostrado que este RAS intrarrenal (iRAS) está involucrado en el desarrollo de diversas patologías de carácter fibrótico y proliferativo no neoplásico. Tanto es así que los inhibidores de ACE (iACE) y los bloqueadores del receptor AT1R (ARBs) son empleados en el tratamiento de enfermedades renales crónicas (CKD) como la nefropatía diabética debido a su efecto protector renal (106,359). Además, investigaciones de diversa naturaleza como estudios epidemiológicos, ensayos *in vitro*, estudios *in vivo* en modelos murinos y análisis desarrollados en tejido proveniente de pacientes con RCC sugieren un rol importante del iRAS en el desarrollo de procesos carcinogénicos en el riñón (158,174–176,182,360–362).

El conocimiento generado durante las últimas décadas ha descrito el RAS como una estructura compleja compuesta por diferentes ejes. Es el equilibrio entre estos lo que permite la correcta regulación de diferentes funciones celulares y por tanto la alteración de éstos o de sus componentes podría generar una ventaja para el desarrollo de tumores.

## 5. **Discusión.** Eztabaida

Así, se han ido acumulando evidencias que postulan que un desequilibrio que incrementa la señalización del eje ACE/Ang II/AT1R favorece la tumorigénesis. Por ejemplo, se ha visto que la expresión de los receptores AT1R y AT2R correlaciona positivamente con el grado histológico y una peor supervivencia en pacientes con CCRCC (117). Además, en modelos murinos de xenoinjertos de RCC humano, el bloqueo de este eje mediante iACEs y ARBs ha demostrado capacidad de disminuir el diámetro tumoral, la vascularización y el potencial metastásico, además de incrementar el efecto de tratamientos antiangiogénicos como el sunitinib (182,360). De hecho, varios estudios relacionan la hiperactivación de este eje con la angiogénesis dependiente de VEGF (93,103,363). Es más, estudios retrospectivos y ensayos clínicos han demostrado que la inhibición de este eje del RAS aumenta la supervivencia de pacientes con CCRCC que reciben tratamientos antiangiogénicos (175,177,187).

Los resultados obtenidos del análisis de la expresión de ACE, enzima del eje citado y principal productor de Ang II del RAS, en 144 RCCs muestran resultados coherentes con lo descrito en la bibliografía. Por un lado, se ha observado que la expresión de ACE se limita exclusivamente a los vasos y no a las células tumorales de RCC, fenómeno previamente descrito y que sugiere un rol de este en la angiogénesis (179). Por otro, su expresión era manifiestamente mayor en el CCRCC y en concreto en los grados más altos, lo que sugiere un rol protumoral de esta enzima. Además, estos resultados coinciden con los descritos para su actividad en homogenados de tumores renales, en los que se detectó una mayor actividad en tumores de grado alto que en tumores de grado bajo (179). Este eje del RAS señala mediante el receptor AT1R. Dolley-Hitze y cols. describieron una correlación positiva entre la expresión de AT1R y el grado histológico en el CCRCC. Además los pacientes con tumores en los que más de un 12,5% de las células expresaban AT1R tuvieron peor supervivencia (117). En conjunto, los resultados sugieren que el eje ACE/Ang II/AT1R aumenta su expresión con el desarrollo tumoral y su señalización parece estar ligada a los efectos protumorales del RAS en el RCC (Figura 5.1).

## 5. **Discusión.** Eztabaida

Recientemente, el eje constituido por APA/Ang III/AT2R, se ha postulado como uno de los ejes protectores del RAS, entendiendo como protector el antagonismo respecto al eje ACE/Ang II/AT1R (92). Este eje, además de disminuir la cantidad del péptido Ang II, genera una señalización vía AT2R que revierte los efectos producidos por ésta mediante AT1R (364).

En la serie de CCRCCs analizada en este estudio se observó una clara reducción del porcentaje de tumores que expresaban APA según aumentaba el grado y la invasión local (pT). La proporción de tumores APA positivos también era menor al aumentar el tamaño de éstos. Además, la ausencia de expresión proteica de esta enzima correlacionó con una peor supervivencia de los pacientes con esta patología. En conjunto estos resultados sugieren una acción supresora de tumores de la APA en el CCRCC. Sin embargo, el rol que desempeña esta enzima en el desarrollo tumoral es un tema controvertido. En un artículo publicado recientemente en cáncer colorrectal, la sobreexpresión de APA correlacionaba con una mayor migración e invasión mediante TWIST, un factor de transcripción clave en la transición epitelio-mesénquima (EMT), y era marcador de pTs avanzados de la enfermedad y por tanto de mal pronóstico (365). En el cáncer cervical también, Fujimura y cols. describen un aumento de la expresión de APA con la progresión de la enfermedad tanto en neoplasias intraepiteliales cervicales como en carcinomas escamosos invasivos (366). Sin embargo, relacionan dicha sobreexpresión con un descenso del potencial invasivo de las células, mediante la regulación negativa del efecto de Ang II vía AT1R, y en consecuencia atribuyen a la APA un rol protector frente al desarrollo tumoral.

La principal función de APA es la conversión de Ang II en Ang III, el cual señala preferente mediante AT2R para antagonizar los efectos de Ang II vía AT1R (367). En el riñón en concreto, se ha demostrado que la Ang III es el agonista principal de AT2R (368). En el RCC, sugieren un rol prooncogénico de este receptor en el cáncer renal basados en la correlación de su expresión con una peor supervivencia

## 5. Discusión. Eztabaida

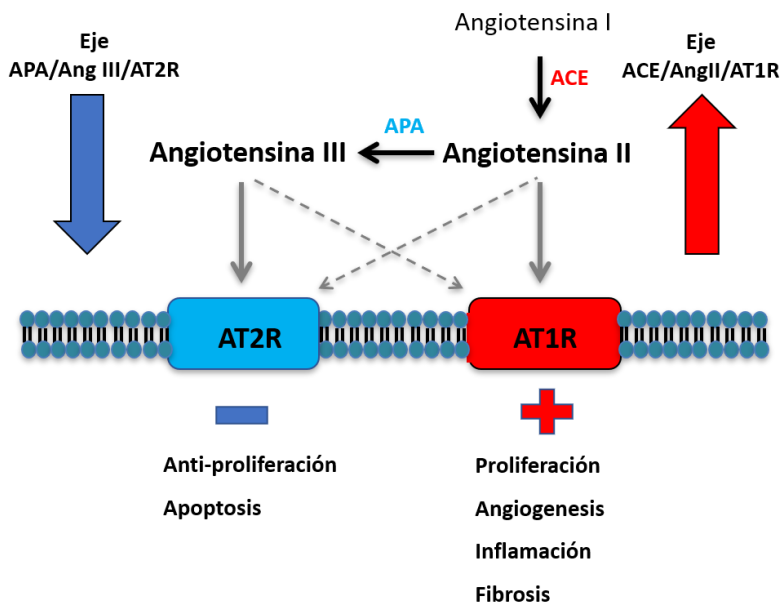
(93,117). En cambio, en la serie de tumores estudiada en este proyecto observamos un descenso de la expresión de AT2R en comparación con el tejido adyacente no tumoral mediante WB. En conjunto, los perfiles de expresión de APA y AT2R sugieren una regulación negativa de este eje del iRAS en el CCRCC y señalan un potencial rol protector (Figura 5.1).

Son varios los estudios que apuntan en esta dirección. Por ejemplo, un estudio realizado en el carcinoma ductal de páncreas demostró una correlación positiva entre la expresión génica de AT2R y la supervivencia de los pacientes. Además constataron el efecto antitumoral de un agonista de AT2R tanto en cultivos celulares como *in vivo*, en un modelo murino (369). De forma similar, estudios realizados en la vejiga y en la próstata han demostrado que la señalización vía AT2R inhibe el desarrollo tumoral (135,370). En conjunto, estos resultados sugieren que la función del eje APA/Ang III/AT2R podría ser específica de cada tejido o tumor.

Los controvertidos efectos en el desarrollo tumoral de los componentes del eje APA/Ang III/AT2R ponen de manifiesto la necesidad de profundizar en su investigación (371). Hasta el momento, la escasa disponibilidad de agonistas específicos para este receptor ha dificultado el avance de la investigación de este eje del RAS. Actualmente, Vicore Pharma, una empresa biotecnológica originaria de las Universidades de Uppsala y Göteborg en Suecia, ha desarrollado una colección de pequeños agonistas no peptídicos para AT2. Entre ellas, Compound 21 o C21 ha demostrado un gran potencial en modelos preclínicos de diferentes enfermedades. En el riñón en concreto, se han descrito sus efectos renoprotectores, principalmente en relación con la nefropatía diabética (372). Pese a que la investigación de esta empresa se centra en otras enfermedades, este agonista de AT2R y otros nuevos compuestos podrían ser herramientas útiles en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluido el CCRCC. Más aún teniendo en cuenta que ya ha demostrado ser seguro en un ensayo clínico de fase I con personas sanas (373).

## 5. Discusión. Eztabaida

En conjunto, el análisis de la expresión de los componentes de los ejes de AT1R y AT2R en el CCRCC sugiere el fortalecimiento de la señalización a través del primero (Figura 5.1). El aumento de la expresión de ACE en los vasos sanguíneos en fases avanzadas de la enfermedad junto con el descenso de la APA en las células tumorales podría dar lugar a un incremento neto de la producción de Ang II en el microambiente tumoral. Esto, unido al descenso en la expresión del receptor AT2R, señala un desequilibrio hacia el eje protumoral. Teniendo en cuenta que estos receptores regulan la proliferación y la apoptosis de las células del túbulo proximal en los riñones sanos (374,375), esta alteración sugiere su posible implicación en el CCRCC, ya que son tumores que proceden de estas células de la nefrona proximal.

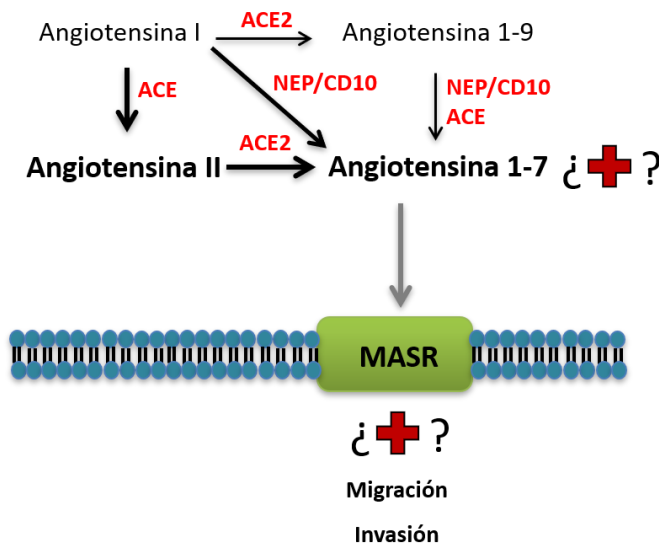


**Figura 5.1. Balance entre los ejes principales del RAS en el desarrollo del RCC.** El análisis de la expresión de los componentes de ambos ejes sugiere el fortalecimiento de la señalización protumoral a través del eje ACE/AngII/AT1R. (\*) Aunque nuestros resultados mostraron una gran variabilidad, la sobreexpresión de AT1R en CCRCCs con alto grado y peor supervivencia ha sido previamente descrita (117).

Otro de los ejes del RAS considerado como protector es el compuesto por ACE2/Ang 1-7/Mas1. En un amplio grupo de tumores sólidos, la Ang 1-7 ha demostrado tener efectos antioncogénicos, reduciendo el potencial angiogénico e invasivo de los tumores (141,142,149,376). En patología renal no neoplásica se ha



descrito un rol antifibrótico y renoprotector de este eje (377). Sin embargo, en el RCC se ha descrito que la Ang 1-7, vía receptor Mas1 y señalización mediante Akt, promueve el potencial metastásico (158). Este péptido es producido directamente por ACE2 mediante hidrólisis de Ang II o bien indirectamente mediante la acción de NEP/CD10, ACE y ACE2 (Figura 5.2). Nuestros resultados en el CCRCC demostraron que la proporción de tumores positivos para ambas enzimas aumenta en grados histológicos altos. Además, es mayor el porcentaje de tumores que expresan dichas enzimas en los subtipos tumorales originarios del túbulo proximal que de la nefrona distal, que son a su vez más agresivos (46). Por tanto, estos resultados sugieren una posible relación entre el aumento de la síntesis de Ang 1-7 y la agresividad tumoral en el RCC.



**Figura 5.2. Diagrama de la síntesis del péptido Ang 1-7 en el RCC.** El perfil de la expresión de los péptidos que sintetizan la Ang 1-7 sugiere un aumento de su síntesis con el desarrollo del RCC, pudiendo traducirse en un aumento de la señalización de dicho eje, relacionado con la migración e invasión.

En conjunto, el análisis de la expresión de los diferentes componentes del iRAS demuestra una alteración del sistema en el RCC. Además, las correlaciones observadas entre sus componentes y las diferentes variables clínico-patológicas en pacientes con CCRCC sugiere una desregulación a medida que la enfermedad progresa. Sin embargo, el rol específico que desempeña cada uno de los componentes del RAS en el desarrollo tumoral está aún lejos de conocerse.

## 5. Discusión. Eztabaida

Con objeto de estudiar el papel de algunos de los componentes del RAS en diferentes aspectos biológicos del RCC se llevaron a cabo ensayos con cultivos celulares. Dichos ensayos *in vitro* confirmaron la existencia de un RAS funcional en las células tumorales del RCC mediante la activación de la señalización vía MAPK/ERK como consecuencia de la unión de Ang II a su receptor AT1R. Pese a ello, los ensayos realizados con los péptidos bioactivos principales del sistema no demuestran su implicación directa ni en la proliferación ni en la migración de las células tumorales renales en las condiciones estudiadas. Esto no descarta un papel del iRAS en la carcinogénesis renal ya que los protagonistas de un tumor son numerosos. Por ejemplo, en este estudio demostramos que la ACE se expresa en los vasos del CCRCC y que dicha expresión correlaciona positivamente con parámetros de agresividad tumoral. Ello sugiere su implicación en la angiogénesis y pone de manifiesto la necesidad de modelos *in vitro* más completos, compuestos por las diferentes poblaciones que constituyen el tumor, para comprender el rol integral del RAS en el RCC.

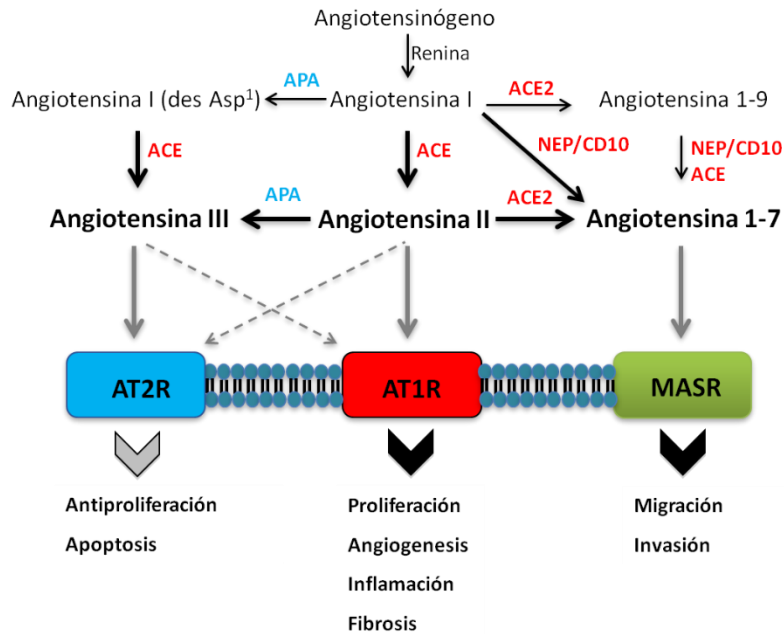
En concordancia con el perfil de ACE observado en pacientes con CCRCC, son varios los estudios que atribuyen el efecto antitumoral del bloqueo del RAS a la inhibición de la angiogénesis. En un modelo *in vivo* de RCC, Hii y colaboradores achacaban la reducción observada en el crecimiento tumoral a una potencial inhibición de la neovascularización del tumor más que a un efecto directo en la célula tumoral (181). Además, Araújo y cols., que observaron el mismo efecto administrando iACEs y ARBs, proponían que parte del efecto podría ser debido al descenso observado en los niveles de VEGF (182).

De forma complementaria, diversos estudios han demostrado que los inhibidores del RAS, en combinación con las terapias antiangiogénicas que se emplean en el tratamiento del mCCRCC, aumentan la supervivencia de los pacientes (175–177). *In vivo* se ha descrito que la combinación del ARB telmisartán con sunitinib disminuye la densidad microvascular, la concentración de VEGF circulante

y aumenta la necrosis (360). Además, pese a que estos agentes actúan principalmente en la vasos tumorales, la combinación de sunitinib con los iACEs captopril y lisinopril disminuye la viabilidad celular de células de RCC *in vitro* (175).

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis y la bibliografía existente sugieren que la aportación final del iRAS al desarrollo del RCC vendría de la suma de las alteraciones en la señalización de los diferentes ejes que la componen (Figura 5.3). Conocer el efecto de cada eje en el desarrollo del RCC se antoja imprescindible para comprender el efecto del RAS en esta patología. El desarrollo de modelos tanto *in vitro* como *in vivo* en los que la señalización de cada eje estuviera inhibida o activada (mediante *knock out* o sobreexpresión de sus componentes) supondría una herramienta especialmente útil para dicho propósito. Además, cabe recordar que las enzimas analizadas en el presente estudio también regulan otros péptidos bioactivos, pueden degradar matriz extracelular e incluso pueden ejercer acciones independientes de su actividad catalítica (378). Por lo tanto, su rol en cada una de las etapas del desarrollo tumoral será la suma de sus diferentes acciones biológicas (379).

Sin embargo, los resultados de esta tesis indican una alteración del RAS como sistema en el desarrollo del RCC. En este sentido, sería de especial interés analizar varios aspectos que sugiere el patrón de las enzimas NEP/CD10, APA y ACE2 en las células tumorales y el ACE en los vasos. Por un lado, esclarecer la posible implicación de ACE en la angiogénesis sería importante para el diseño de estrategias adyuvantes a la terapia dirigida más común en el tratamiento del mCCRCC, la terapia antiangiogénica mediante inhibidores de receptores tirosina quinasa (RTKs) (380). Por otro, confirmar el rol antioncogénico del eje APA/Ang III/AT2R postularía su activación como una potencial diana terapéutica. Finalmente, probar que la síntesis de Ang 1-7 correlaciona con la agresividad tumoral, como sugiere la sobreexpresión de NEP/CD10 y ACE2 en los CCRCCs de mayor grado, situaría la inhibición del eje ACE2/Ang 1-7/Mas1 como potencial herramienta para prevenir la metástasis.



**Figura 5.3.** Esquema de los 3 ejes centrales del RAS intrarrenal en el CCRCC. Los componentes sobre expresados se muestran en rojo frente a los regulados a la baja que se muestran en azul. En el eje de la APA/Ang III/AT2R, tanto la enzima como el receptor reducen su expresión en función del desarrollo tumoral. En cambio, las enzimas que sintetizan los péptidos de los ejes de AT1R y Mas incrementan su expresión en fases avanzadas de la enfermedad: la ACE en los vasos sanguíneos y la NEP/CD10 y la ACE2 en las células tumorales.

Las características intrínsecas del RCC como su carácter asintomático y el hecho de que un 30% de los pacientes que son tratados con cirugía a priori curativa sufran una recaída, subrayan la necesidad de biomarcadores efectivos para su diagnóstico y pronóstico. En este sentido, el análisis de biomarcadores mediante métodos no invasivos o mínimamente invasivos ha cobrado importancia durante los últimos años. Así, diferentes componentes de la sangre han sido propuestos como potenciales marcadores tumorales en el cáncer, como las células tumorales o el ácido desoxirribonucleico (DNA) circulante, microRNAs y exosomas provenientes de tumores, e incluso las plaquetas derivadas de estas (381,382). Sin embargo, existen pocos marcadores serológicos validados para la práctica clínica en enfermedades neoplásicas. Entre los pocos existentes, destaca el *prostate-specific antigen* o PSA, una serina peptidasa empleada para el diagnóstico y pronóstico de pacientes con cáncer de próstata, el cáncer urológico más frecuente (383).

## 5. **Discusión.** Eztabaida

Además de la expresión, también se ha descrito que la actividad de las peptidasas estudiadas en esta tesis está alterada en diferentes subtipos de RCC en comparación con el tejido sano adyacente. Así, la actividad de las enzimas APA, ACE, ACE2 y NEP/CD10 se ha visto disminuida en tumores renales en comparación con el tejido no tumoral (179,348,384,385). Además, tanto la actividad como la expresión varían en función de la agresividad tumoral. Así, la actividad y la expresión de ACE, ACE2 y NEP/CD10 se ha visto aumentada en grados altos de CCRCC (179). Al tratarse de enzimas que pueden ser secretadas al líquido extracelular (386,387), cabe la posibilidad de que las alteraciones detectadas a nivel local tengan un reflejo en el suero y por tanto que la medición de su actividad pueda ser una herramienta de diagnóstico o pronóstico de utilidad en el RCC.

El origen de las peptidasas en el suero de pacientes con cáncer es hoy en día un tema controvertido. Pese a que la hipótesis principal sitúa dicho origen en el microambiente tumoral, otras consideran el sistema inmunológico, el hígado o el bazo como fuentes más probables (378,388). Esto se debe, al menos en parte, a que las alteraciones observadas en la expresión y la actividad a nivel tisular no guardan ninguna relación con las observadas a nivel sérico. A pesar de ello, la correlación de estas alteraciones con diferentes parámetros clínico-patológicos de los tumores las convierte en potenciales marcadores de diagnóstico y pronóstico no invasivos (378,388–391).

En este contexto, decidimos analizar la actividad de las enzimas del RAS en el suero de pacientes con RCC para estudiar su potencial como biomarcadores en el desarrollo de la enfermedad. Así, la actividad de NEP/CD10, ACE2 y APA era mayor en el suero de pacientes de RCC que en sus controles. Estos resultados coinciden con otros observados en los pacientes con cáncer de páncreas y colon (392,393), pero difieren de lo observado en pacientes con cáncer de mama (389). Ello sugiere que los cambios en la actividad de las enzimas del RAS en el suero de pacientes son también específicos del tipo de cáncer, como sucede en el tejido.

## 5. **Discusión.** Eztabaida

En la bibliografía, varios estudios desarrollados en cánceres originados en diferentes tejidos defienden el análisis de los niveles de enzimas del RAS como herramientas útiles para el *screening*, el diagnóstico/pronóstico, el seguimiento evolutivo y la monitorización del tratamiento (388,389,392–395). Algunos de nuestros resultados apuntan en la misma dirección:

Por un lado, el descenso de la actividad de ACE observado en el suero de pacientes con CCRCC de grado alto y metastásico, lo sitúan como un potencial biomarcador para el seguimiento de la enfermedad en pacientes diagnosticados en fases tempranas. Aunque estos resultados son solo preliminares, de validarse podrían ofrecer un método sencillo para estudiar el desarrollo del CCRCC. Además, la técnica de análisis de la actividad de ACE ya se emplea en la práctica clínica en el diagnóstico de la sarcoidosis (396), lo que facilitaría su uso para este nuevo fin.

Por otro, la actividad NEP/CD10 era significativamente inferior en el suero de pacientes con un score alto en los modelos pronósticos UISS y SSIGN. Estos modelos predicen la probabilidad de recidiva de pacientes con RCC (24,25). Pese a que esta parte del estudio se desarrolló con un diseño prospectivo y el seguimiento medio fue solo de 32 meses, una actividad inferior a 7350 UP/L correlacionó con una peor supervivencia, coincidiendo con la información obtenida de los modelos pronósticos. NEP/CD10 es un marcador de diagnóstico diferencial entre CCRCC eosinófilos (que son positivos) y los ChRCC y RO eosinófilos (negativos) (192). Recientemente, sus niveles séricos han mostrado un potencial como marcador serológico en el cáncer colorrectal, en el que una mayor concentración correlacionaba con fases avanzadas de la enfermedad (395). Los resultados obtenidos en esta tesis, aunque con un perfil diferente, también sugieren que la actividad sérica de NEP/CD10 podría ser un buen marcador pronóstico del RCC. También la actividad de ACE2 correlacionó con el modelo SSIGN, en el que la actividad descendía en pacientes con riesgos de recidiva medio y alto en comparación con los de riesgo bajo.

## 5. **Discusión.** Eztabaida

Tanto con la ACE, con la ACE2 como con la NEP/CD10 se observó una correlación negativa entre lo observado en el tejido y en el suero, con un aumento de la expresión en los grados altos, y un descenso en la actividad sérica en los pacientes con tumores más agresivos. Este fenómeno de correlación negativa entre el tejido y el plasma ya ha sido previamente descrito para otras peptidasas (393). En cambio, pese a las alteraciones de expresión observadas en los tumores de pacientes con CCRCC con diferente pronóstico, la actividad sérica de la APA no variaba de forma significativa. Esto podría sugerir una regulación específica de la secreción de cada peptidasa a medida que avanza la enfermedad, aumentando o disminuyendo su liberación. Esta liberación tendría un impacto en la proteólisis pericelular, un fenómeno esencial para el desarrollo tumoral (397). Comprender la función específica de cada peptidasa y de su secreción es esencial para el diseño de estrategias efectivas con las que inhibir el desarrollo tumoral (397).

Además, su implantación como herramientas diagnósticas y pronósticas requiere de una validación previa. Por un lado, confirmar el tumor como origen de las alteraciones observadas en la actividad de estas enzimas parece crucial para su validación como herramienta clínica útil (378,388,391). Por otro, es necesario profundizar en varios aspectos del análisis serológico de las angiotensinasas, ya que se han descrito varios factores que influyen en su actividad sérica. Por ejemplo, el genotipo de la enzima influye en la actividad de ACE (398). Los tratamientos antitumorales producen alteraciones en diferentes angiotensinasas (389) y algunas enfermedades inflamatorias, como la artritis, pueden también influir en sus niveles serológicos (65).

Sin embargo, los resultados obtenidos en la actividad sérica de las enzimas del RAS en pacientes con RCC sugieren una regulación dependiente del desarrollo tumoral y postulan a estas enzimas como potenciales herramientas para realizar el seguimiento de esta enfermedad mediante una forma mínimamente invasiva.

## **5.2 CAPÍTULO 2: PROTEÍNA DE ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS $\alpha$ (FAP $\alpha$ ) EN EL CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (CCRCC)**

El desarrollo de un tumor no depende exclusivamente de las propias células tumorales si no que es el resultado de la comunicación bidireccional entre las células tumorales y los diferentes componentes del estroma tumoral (227). Este microambiente tumoral cambia constantemente en función de la proporción y el estado de activación de las poblaciones celulares que la componen, dotando al tumor de las condiciones necesarias para su evolución. Es por ello por lo que hoy en día varias estrategias terapéuticas que se emplean en el tratamiento del cáncer o que están en desarrollo tienen como diana componentes del estroma tumoral. En el CCRCC metastásico sin ir más lejos, el tratamiento de primera línea es la terapia antiangiogénica con sunitinib, que tiene como diana final el descenso de la vascularización de los tumores (36). Además, los últimos estudios sitúan la inmunoterapia como herramienta terapéutica con mayor potencial para mejorar el tratamiento del CCRCC avanzado (41). Se espera que los beneficios de la combinación de ambos agentes permita su implantación a corto/medio plazo (399).

Los fibroblastos asociados a tumores o CAFs, componen una de las poblaciones más importantes en el citado estroma tumoral. La de los CAFs es una población celular de diferentes orígenes, muy heterogénea y multifuncional (237). Así los CAFs se han visto implicados en las diferentes fases del desarrollo tumoral y especialmente en la metástasis. En el cáncer renal en concreto, en un artículo publicado en el 2015, se demostraba que el co-cultivo entre CAFs y células tumorales aumentaba la proliferación de estos últimos, promovía la migración y disminuía la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento con everolimus mediante las vías de señalización de MAPKs y Akt (343).



## 5. **Discusión.** Eztabaida

La expresión de FAP $\alpha$ , es un hito en el proceso de activación que sufren los CAFs. Su expresión se ha detectado en el 90% de los tumores epiteliales y aunque en algunos casos se ha detectado en células epiteliales, normalmente se limita a las células estromales. En este estudio se describe por primera vez la expresión de FAP $\alpha$  en el CCRCC. Se distinguían dos patrones de tinción en función de la arquitectura tumoral y en ambos casos la expresión de esta serina peptidasa se limita a los fibroblastos asociados a tumores.

FAP $\alpha$  se ha visto involucrada en las diferentes funciones que desempeñan los CAFs en el desarrollo de los tumores. Así, se ha relacionado con la proliferación, la migración y la resistencia a tratamientos en diferentes modelos tumorales y en concreto con la capacidad invasiva de estos (272–275,304). En el carcinoma renal de células claras (CCRCC), la expresión de FAP $\alpha$  en una serie de 208 tumores primarios correlacionó significativamente con parámetros clínicos de agresividad como el grado, el estadio y el diámetro del tumor. Además, dicha expresión se asoció con una peor supervivencia a 5, 10 y 15 años en estos pacientes. Las diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de los pacientes fueron detectadas desde los 20 meses, un dato que refuerza el potencial de la detección inmunohistoquímica de FAP $\alpha$  como herramienta útil en la práctica clínica para la selección de los tumores de carácter más agresivo. Además, el análisis multivariante demostró que la detección de FAP podría ser una herramienta con tanto potencial como los parámetros de agresividad clásicos para dicho propósito.

Se han descrito diferentes mecanismos tanto dependientes de su actividad enzimática como ajenas a ella mediante los que la FAP $\alpha$  completa sus funciones. Una de ellas es su capacidad de asociarse con otras proteínas. En este sentido, se ha descrito que FAP $\alpha$  tiene capacidad para generar heterodímeros funcionales con la serina proteasa DPPIV/CD26, y que estos dímeros juegan un rol activo en la migración e invasión de células endoteliales mediante la degradación de la matriz extracelular (204). Además, ambas proteínas pueden actuar como moléculas de

adhesión interactuando con integrinas, y reforzando la señalización intracelular de estas (400). El grupo de investigación en el que se enmarca esta tesis había descrito previamente un incremento de la actividad de la serina proteasa DPPiV/CD26 en CCRCCs de grado y estadio alto en comparación con los de grado y estadio bajo (349). Más aún, dicho incremento correlacionó con una peor supervivencia de los pacientes (349). Estudiados en conjunto tanto los antecedentes como estos resultados sugieren una posible acción conjunta coordinada de ambas enzimas en la progresión tumoral y por tanto los convierte en potenciales dianas terapéuticas en el RCC.

La metástasis es el proceso mediante el que células provenientes del tumor primario invaden tejidos circundantes o lejanos dando lugar a nuevos tumores. Son estos los que en una gran mayoría de los casos provocan la muerte del paciente. En el CCRCC, alrededor de un 30% de los pacientes son diagnosticados con metástasis y un tercio de los diagnosticados en fases tempranas de la enfermedad desarrollarán metástasis con el tiempo a pesar de ser tratados con nefrectomía “curativa” (401,402). En la fase metastásica de la enfermedad, la relevancia de los factores pronósticos clásicos como el diámetro tumoral, el grado y el estadio disminuye drásticamente (403). En consecuencia, nuevos biomarcadores con potencial pronóstico o con capacidad para predecir la respuesta a tratamientos antiangiogénicos o de inmunoterapia son necesarios para la optimización del tratamiento de dichos pacientes (403,404).

La correlación positiva entre la expresión de FAP $\alpha$  en tumores primarios y la agresividad tumoral sugiere su implicación en el desarrollo de metástasis en los tumores renales. Por ello, con el objeto de conocer mejor la implicación pronóstica de esta serina proteasa, se estudió su expresión en el tejido tumoral primario y en sus metástasis en una serie de 59 pacientes con CCRCC metastásico (mCCRCC). En esta nueva serie validamos los resultados obtenidos previamente ya que la expresión de FAP $\alpha$  en los tumores primarios de pacientes que debutaron con metástasis o las desarrollaron más adelante volvió a correlacionar con una peor supervivencia a 10

## 5. **Discusión.** Eztabaida

años. Más aún, se observó una correlación directa entre la expresión de FAP $\alpha$  en los fibroblastos del estroma de tumores primarios y en sus metástasis. A pesar de que el RCC primario y el metastásico tienen características moleculares y un patrón de expresión génica, proteica y de miRNAs diferente (404), el hecho de que la expresión de FAP $\alpha$  se mantenga en las metástasis le confiere potencial como diana para un tratamiento integral del mCCRCC. Además, que su expresión se mantenga desde el tumor primario al metastásico sugiere un rol activo en este proceso.

La correlación entre la expresión de FAP en los tumores primarios y sus metástasis podría deberse a dos fenómenos biológicos diferentes. Por un lado, a la capacidad de las células metastásicas para inducir la expresión de FAP $\alpha$  en los fibroblastos del tejido en el que anidan. En nuestro modelo *in vitro*, hemos visto que el medio condicionado de líneas celulares metastásicas Caki-1 es capaz de inducir la expresión de FAP en los fibroblastos. Por otro lado, no debería descartarse que los fibroblastos FAP $\alpha$  positivos migren junto con las propias células tumorales y que aniden junto con ellas en órganos y tejidos a distancia, como ya ha sido propuesto en recientes estudios en un proceso denominado invasión colectiva (405–407).

En un artículo publicado hace una década, Gaggioli y cols. demostraron cómo los fibroblastos lideraban la invasión colectiva en los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello y ginecológicos (251). Los CAFs generaban cambios proteolíticos y estructurales en la ECM, abriendo una vía por la que grupos de células escamosas invadían sin necesidad de perder su fenotipo epitelial. En este sentido, el empleo de modelos de invasión tridimensionales dirigidos por CAFs como el propuesto por este grupo de investigación podría ayudar en la comprensión del rol que desarrolla FAP $\alpha$  en este proceso, ya que su actividad colagenasa sugiere una implicación directa (408). Relacionado con esto, se ha propuesto un modelo que explica que los CAFs dirigen el proceso de metástasis, mediante su acción paracrina y mecánica en la interfase entre el tumor y el tejido no neoplásico. Este modelo postula que los CAFs dirigen la creación de una infraestructura en el frente tumoral

## 5. **Discusión.** Eztabaida

en el que las células estromales y las tumorales invaden recíprocamente y junto con el estrés mecánico creado, dirigen el proceso metastásico (409). La localización de FAP $\alpha$  en el estroma del frente tumoral sugiere su implicación en dicho proceso (410).

La presentación temporal de metástasis es de por sí una importante variable que influye en el pronóstico de los pacientes con cáncer. En el CCRCC, las metástasis sincrónicas o detectadas en el mismo momento que el diagnóstico del tumor primario están relacionadas con un peor pronóstico que las metacrónicas (411). De hecho, en la serie de tumores analizada en este estudio, era claramente la variable independiente con mayor potencial para el pronóstico de la supervivencia de pacientes con mCCRCC. Esta variable ya había sido contemplada en otros estudios previos bajo otros nombres como “años o tiempo transcurrido desde la nefrectomía al desarrollo de las metástasis” como factor de mal pronóstico (412,413). Así, en nuestro estudio, el 86% y el 83% de los mCCRCC sincrónicos fueron positivos para FAPp y FAPm frente a un 20% y un 33% de los metacrónicos respectivamente, siendo la expresión de FAPp, tras la sincronidad el factor pronóstico más significativo en el análisis multivariante.

En la serie de mCCRCC estudiada, la mayoría de las metástasis sincrónicas ocurrieron en nodos linfáticos mientras que la mayoría de las metacrónicas tuvieron lugar en tejidos epiteliales. Además, la mayoría de los tumores primarios (75%) que metastatizaron a nodos linfáticos fueron positivos para FAP $\alpha$  y la expresión se mantuvo en el 70% de las metástasis linfáticas. Este fenómeno ya había sido previamente descrito en bibliografía en procesos neoplásicos de otros tejidos. De hecho, en un meta-análisis que recoge un total de casi 2000 pacientes con 11 tipos diferentes de tumores sólidos, la expresión de FAP $\alpha$  correlacionó con metástasis a nodos linfáticos (264). La invasión a nodos linfáticos ha sido relacionada claramente con una peor supervivencia en el RCC (414) y se ha descrito que la disección de estos puede ser beneficiosa para el control de la enfermedad (415,416). Estos resultados, además, indican que la interacción entre las células tumorales y los CAFs también

juega un rol determinante en la creación del microambiente y el desarrollo de metástasis en los nodos linfáticos (417). Y es que son muchos los estudios que relacionan los diferentes marcadores de la activación de fibroblastos como  $\alpha$ SMA o la podoplanina con metástasis y en concreto con metástasis a nodos linfáticos (418–422). En conjunto, la correlación entre la expresión de FAP $\alpha$ , la sincronidad y su localización en ganglios linfáticos sugieren una migración temprana de las células tumorales desde los tumores FAP $\alpha$  positivos hasta los nodos linfáticos.

La transformación sarcomatoide es un fenotipo que se puede observar entre el 8 y el 10% de los RCCs y alrededor del 8% de los CCRCCs (423). Las regiones con diferenciación sarcomatoide carecen de los clásicos componentes epiteliales. Las células son alargadas, fusiformes y eosinófilas, similares a las que componen los sarcomas (423,424). Los pacientes diagnosticados con CCRCC sarcomatoide tienen peor pronóstico debido a la alta propensión de estos para desarrollar metástasis y la baja efectividad de las terapias dirigidas (425). De hecho, los pacientes con un porcentaje mayor al 30% de diferenciación sarcomatoide en los tumores primarios presentan principalmente este fenotipo en las metástasis (426). En el presente estudio, el 100% de los tumores con diferenciación sarcomatoide fueron positivos para FAP $\alpha$ , tanto en el tumor primario como en la metástasis.

La mayor capacidad de migración, junto con las características mesenquimales mostradas por los tumores sarcomatoides han postulado a este fenotipo como modelo de la transición epitelio-mesénquima (EMT) neoplásico en varios tumores sólidos, entre ellos el cáncer renal (427). La EMT es un proceso reversible mediante el que las células cancerígenas pierden las clásicas características epiteliales y adoptan nuevas características mesenquimales y se considera un mecanismo clave en la adquisición de la capacidad metastásica. Así, se ha demostrado que en regiones sarcomatoides del CCRCC los marcadores epiteliales E-cadherina y  $\beta$ -catenina disminuyen y en cambio aumentan las mesenquimales como la vimentina,  $\alpha$ SMA y Snail en comparación con el CCRCC convencional (427).

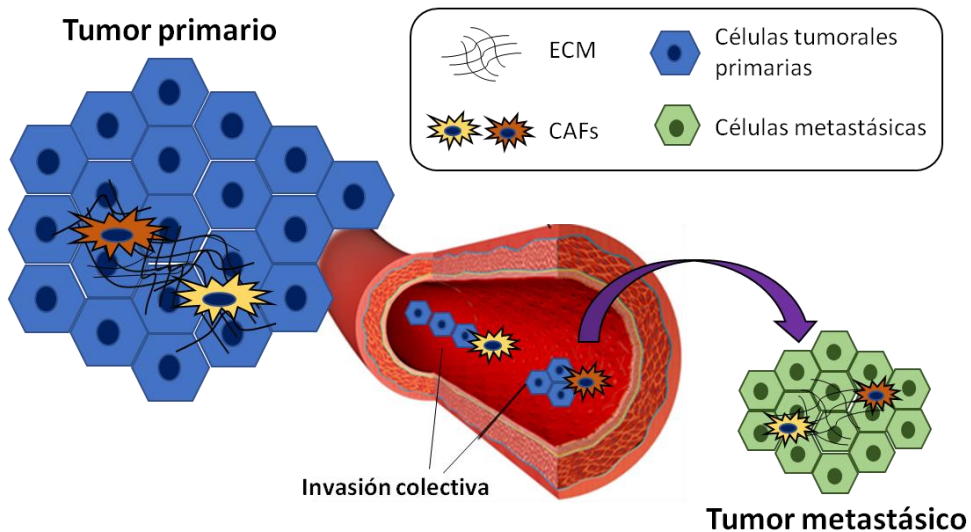
## 5. **Discusión.** Eztabaida

El hecho de que todos los tumores con diferenciación sarcomatoide expresen FAP $\alpha$  y que además la expresión de esta correlacione con metástasis a nodos linfáticos y una peor supervivencia, sugiere su posible implicación en la EMT en el CCRCC. Más aún teniendo en cuenta que la expresión de FAP $\alpha$  correlacionó con la de la vimentina, marcador mesenquimal, tanto en el tumor primario como en las metástasis.

La inducción de la EMT por parte de los CAFs ha sido descrita en diferentes modelos neoplásicos y mediante diferentes vías de señalización, lo que coincide con su liderazgo en el desarrollo de metástasis (428–432). Es más, un estudio ha propuesto que únicamente la expresión de FAP $\alpha$  sería suficiente para inducir EMT debido a su capacidad de modificar la expresión de marcadores (E y N-cadherinas y vimentina) y factores de transcripción (Snail y Slug) claves en este proceso (281). Además, la inducción de EMT por parte de FAP $\alpha$  podría explicar, al menos en parte, la resistencia a tratamientos convencionales observada. Y es que el fenotipo celular asociado a EMT correlaciona con una mayor resistencia a tratamientos quimioterápicos, radioterápicos y hormonales tanto *in vitro* como *in vivo* (433).

A pesar de ello, la relación entre la vimentina y la metástasis no se limita a su rol de biomarcador en la EMT. Recientemente, Richardson y cols. (434), en un modelo de cáncer de pulmón, han demostrado que la vimentina es necesaria para el desarrollo de metástasis colectivas, en las que mantiene las interacciones entre CAFs y células tumorales durante el proceso de invasión conjunta (Figura 5.4). Además, estos clúster de CAFs y células tumorales se han visto aumentados en estadios tempranos del adenocarcinoma de pulmón, lo que sugiere una diseminación temprana. Otro hecho que apoya esta tesis de migración colectiva es que los fibroblastos localizados en los nodos linfáticos muestran un perfil de marcadores similar a los fibroblastos de los tumores primarios (435).

La correlación de la expresión de FAP $\alpha$  en tumores primarios y sus metástasis, su asociación con metástasis sincrónicas a nodos linfáticos, junto con la correlación con la vimentina podría sugerir un fenómeno similar en el CCRCC. Así, FAP $\alpha$  podría estar involucrado en el desarrollo de metástasis mediante la inducción de EMT, liderando la metástasis colectiva e incluso mediante ambos mecanismos.



**Figura 5.4. Diagrama de la invasión colectiva entre CAFs y células tumorales.** Recientemente se ha propuesto la posibilidad de que los CAFs, una población heterogénea de células estromales, lideren la invasión tumoral induciendo la supervivencia de células tumorales y favoreciendo la implantación de nichos metastásicos mediante la producción de ECM y factores de crecimiento. Nuestros resultados sugieren que FAP $\alpha$  podría estar involucrado en este proceso (406,434).

En nuestro estudio la expresión de FAP $\alpha$  tanto en tumores primarios como en sus metástasis correlacionó con la presencia de necrosis. La necrosis, histológicamente, se caracteriza por grupos de células muertas o degenerativas con una transición abrupta al tumor viable (436). En el CCRCC, en el que un 28% de los tumores suelen tener focos necróticos, este fenómeno se asocia con tumores de grado alto, enfermedad avanzada y un descenso de la supervivencia (16,437). De hecho la cuantificación de la necrosis tumoral se ha demostrado como factor pronóstico independiente de la supervivencia en CCRCC (438). Tradicionalmente, el origen de la necrosis se ha situado en las condiciones de hipoxia creadas por la alta

tasa de crecimiento tumoral. Se ha demostrado que la expresión de FAP $\alpha$  induce la proliferación en diferentes modelos tumorales, lo que podría explicar, al menos en parte, la correlación entre la expresión de FAP $\alpha$  y la necrosis (281,439,440).

Los resultados obtenidos mediante los ensayos con medio condicionado, el aumento de la expresión de FAP $\alpha$  en los fibroblastos y el de la migración en las células tumorales, demuestran una comunicación bidireccional entre células tumorales de RCC y CAFs y confirman la implicación de estos últimos en el desarrollo del CCRCC. El aumento de la expresión de FAP $\alpha$  observado en los fibroblastos sugiere además que esta serina proteasa tiene un papel relevante en dicho proceso. Este fenómeno ya ha sido descrito previamente, y se han identificado diferentes citoquinas mediante las que las células tumorales activan los fibroblastos e inducen la expresión de FAP $\alpha$ , entre las que destaca TGF- $\beta$  (296). Sin embargo, pese a que se ha visto implicado en diferentes mecanismos como la adhesión celular, su movilidad e invasión, la angiogénesis o la respuesta inmune tumoral, el papel específico de FAP $\alpha$  en el cáncer aún está por definir (441).

Nuestros resultados descriptivos en tejido tumoral sugieren que esta serina proteasa está asociada a la agresividad tumoral en el CCRCC. El modelo *in vitro* de co-cultivo propuesto en el desarrollo de esta tesis doctoral para el estudio del efecto de los fibroblastos y en concreto de la FAP $\alpha$  en la EMT no ha podido demostrar relación alguna entre ambos. Pero probablemente estos resultados se deban a las limitaciones del modelo empleado. Por un lado, la línea de fibroblastos utilizada no fue una línea de CAFs. A pesar de ser una línea que expresara FAP $\alpha$  y que el medio condicionado generado a partir de ella tuviera capacidad para incrementar la migración en ensayos de *Wound Healing*, la heterogeneidad en la población de CAFs y los efectos adversos observados para CAFs y fibroblastos normales en diversos ensayos sugiere que no era el modelo óptimo (244). Además, el co-cultivo indirecto, por definición, carece de algunas de las características para estudiar de forma integral el rol de FAP $\alpha$ . Por un lado, no hay interacción directa entre las dos



## 5. **Discusión.** Eztabaida

poblaciones celulares, lo que descartaría los efectos producidos mediante la interacción de FAP $\alpha$  con otras proteínas. Además, la ausencia de matriz extracelular o algún componente que la mimetice suprime la posibilidad de estudiar otra de las acciones principales atribuidas a esta serina proteasa, su interacción con la ECM. Lo mismo sucede con las otras poblaciones celulares que componen el microambiente tumoral, y por tanto imposibilita el estudio de la acción inmunomoduladora que se le atribuye (442).

A pesar de ello, su empleo permitía el estudio independiente de los cambios generados en cada tipo celular como consecuencia de la comunicación mediante los diferentes factores secretados por cada uno de ellos. Además, este diseño permite incorporar inhibidores de la actividad enzimática de FAP $\alpha$ , así como modular su expresión mediante siRNAs o plásmidos de expresión para el estudio de las acciones dependientes e independientes de su actividad. La ausencia de resultados relevantes en el co-cultivo en este sentido ha impedido dar más pasos, sugiriendo revalorar el modelo empleado. A su vez, el estudio de los resultados únicamente a nivel de expresión génica limita la información obtenida, ya que es posible que parte de los cambios producidos por el co-cultivo se deban a modificaciones post-transcripcionales y por tanto solo podamos detectarlos a nivel proteico.

Por tanto, son necesarios estudios adicionales que permitan conocer el papel que juega esta serina proteasa en la biología tumoral para el diseño de estrategias adecuadas que mejoren el tratamiento de los pacientes. Por un lado, para estudiar la relación entre células tumorales y CAFs sería necesario trabajar con fibroblastos originarios de CCRCCs. El desarrollo de co-cultivos con estas células junto con un análisis más completo tanto a nivel transcriptómico como proteico completaría estos resultados preliminares. Por otro, el desarrollo de modelos *in vitro* más sofisticados que el empleado para este primer acercamiento se antojan necesarios. En este sentido el desarrollo de cultivos en 3D se asemeja más a los procesos *in vivo*. En especial para ensayos funcionales de migración e invasión en los que FAP $\alpha$  parece

estar más involucrado ya que permiten la interacción entre diferentes tipos de células y entre células y la matriz extracelular (443). Así, los hidrogeles en 3D parecen el modelo más adecuado teniendo en cuenta que el colágeno tipo I es uno de los substratos principales de la actividad endopeptidasa de FAP $\alpha$ , colágeno que se ha descrito se encuentra en niveles altos en la ECM de diversos tumores sólidos (444–446). Además, sería interesante estudiar la implicación de FAP $\alpha$  en la invasión colectiva dirigida por CAFs. Para ello, adecuar el modelo 3D propuesto por el grupo de Gaggioli y cols. al cáncer renal sería de ayuda en el estudio de este fenómeno (408).

El hecho de que las células tumorales y el microambiente tumoral actúen de forma sinérgica en el desarrollo del cáncer ha abierto un nuevo horizonte en la búsqueda de potenciales dianas diagnósticas y terapéuticas en los diferentes tipos celulares que conforman este microambiente (231). Los CAFs son uno de los principales componentes de este microambiente y juegan un rol clave en desarrollo tumoral (306,447).

La expresión de FAP $\alpha$  es un hito en la activación de los CAFs (279). En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio demuestran su potencial como herramienta diagnóstica y pronóstica tanto en el CCRCC como en el mCCRCC. Además, la correlación expuesta entre la expresión de FAP $\alpha$  y la metástasis a nodos linfáticos, sugiere que podría ser una herramienta útil en la toma de decisiones de relevancia clínica como la resección de nodos linfáticos metastásicos. En este sentido, se ha propuesto el uso intraoperatorio de inmunoliposomas fluorescentes con FAP $\alpha$  como diana para aumentar la precisión de la resección tumoral y de metástasis a ganglios linfáticos (271).

Además, su potencial como herramienta diagnóstica no se limita a su detección inmunohistoquímica. Aunque sean resultados pendientes de validación, los niveles de FAP $\alpha$  disminuyen en el plasma de pacientes oncológicos (268,269).

## 5. **Discusión.** Eztabaida

Este fenómeno de regulación inversa entre el tejido tumoral y el plasma de los pacientes, además, lo hemos visto con otras peptidasas estudiadas en el primer capítulo de esta tesis. A su vez, en un estudio reciente, la detección de nanopartículas sensibles a la actividad de FAP $\alpha$  en la orina en un modelo murino mostraba resultados esperanzadores para la detección de tumores sólidos, aunque en este caso en concreto el carcinoma renal era una excepción (270). En conjunto, nuestros resultados confieren un gran potencial diagnóstico y pronóstico a la detección de esta enzima en el CCRCC. Serán necesarios nuevos ensayos en biopsias líquidas de estos pacientes para su verdadero potencial como biomarcador de invasión mínima en esta enfermedad.

A medida que se ha ido conociendo la importancia del microambiente en el desarrollo tumoral, se han desarrollado estrategias terapéuticas contra los componentes de esta que se han mostrado eficaces como terapia adyuvante en el tratamiento del cáncer (231). En este aspecto, es importante destacar que la expresión de FAP $\alpha$  sólo se da en fibroblastos activos de tejidos que proliferan, como la embriogénesis, los procesos de cicatrización o la carcinogénesis (222,223). Los tejidos adultos no expresan FAP $\alpha$  (448) por lo que una terapia dirigida contra esta proteína minimizaría los efectos secundarios en el resto del organismo, lo que la convierte en una diana muy atractiva.

Así, se han diseñado diferentes estrategias terapéuticas con FAP $\alpha$  como diana, desde inhibidores de su actividad enzimática, anticuerpos o vacunas, hasta pro-drogas citotóxicas para la activación mediante su actividad enzimática. A pesar de todo ello, los ensayos clínicos desarrollados con Talabostat (inhibidor de la actividad dipeptidil peptidasa) y sibrotuzumab (anticuerpo humanizado anti-FAP) no han mostrado un gran beneficio clínico (309–311,314,315). Los resultados extraídos de nuestro estudio sugieren que FAP $\alpha$  está principalmente involucrada en una migración en fases tempranas del desarrollo tumoral a nodos linfáticos. En cambio, los principales ensayos clínicos con esta serina proteasa como diana, se han realizado

## 5. **Discusión.** Eztabaida

en pacientes con tumores en estadios avanzados. En consecuencia, sería un factor a tener en cuenta la posibilidad de que la eficacia de las estrategias para neutralizar el efecto de FAP $\alpha$  en el desarrollo tumoral, como los inhibidores o los anticuerpos, sería mayor en fases tempranas de dicho desarrollo, o al menos en etapas previas al desarrollo de metástasis.

Sin embargo, su potencial relevancia terapéutica no se limita al uso de agentes que neutralizan la actividad de la FAP $\alpha$ . Estrategias como el empleo de prodrogas citotóxicas que puedan activarse por la FAP $\alpha$  en las metástasis, donde sabemos que también se expresa confiere a estas prodrogas y a esta diana un gran potencial para el tratamiento del CCRCC también en sus fases más avanzadas.

El hecho de que la expresión de FAP $\alpha$  correlacione con los tumores más agresivos y su posible implicación en el desarrollo tumoral, convierten las estrategias terapéuticas dirigidas contra FAP $\alpha$  y por tanto los CAFs como el complemento idóneo de las terapias antiangiogénicas e inmunoterápicas llamadas a conformar el tratamiento de primera línea del CCRCC en un futuro próximo. Más si tenemos en cuenta la naturaleza quimio/radio resistente de este cáncer (28,29). Por tanto, el desarrollo de nuevas terapias junto con la validación y optimización de las existentes podría tener un gran potencial en el tratamiento del CCRCC.



## **6. CONCLUSIONES. Ondorioak**



## 6.1 CAPÍTULO 1. ESTUDIO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRARRENAL (iRAS) EN EL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES.

- La expresión de las enzimas con capacidad convertidora de péptidos de angiotensina varía en los diferentes subtipos histológicos de RCC. Así la proporción de tumores que expresan NEP/CD10 y ACE2 es mayor en los subtipos originarios del túbulo proximal (CCRCC y PRCC) que en los originarios de la nefrona distal (ChRCC y RO). Además, ACE se expresa casi exclusivamente en los vasos del CCRCC. Sin embargo, la APA se detecta en un 80% de los tumores, sin diferencias significativas entre subtipos histológicos.
- En el CCRCC, la expresión de las enzimas del RAS correlaciona con variables clínico-patológicas de agresividad tumoral como el grado, la invasión local o el diámetro tumoral. Además, la expresión de NEP/CD10 y la ausencia de esta en el caso de APA correlacionan positivamente con una peor supervivencia de los pacientes a los 5, 10 y 15 años. Esto indica, junto con la bibliografía previa, una desregulación del sistema que podría favorecer el desarrollo del CCRCC.
- Las células tumorales renales disponen de un RAS funcional. Sin embargo, el modelo *in vitro* empleado no ha demostrado su implicación en hitos del cáncer como la proliferación o la migración celular. Los resultados sugieren el uso de modelos más complejos, compuestos por los diferentes tipos celulares del microambiente para comprender la implicación del RAS en el RCC.
- La actividad sérica de NEP/CD10, ACE2 y APA aumenta en pacientes con RCC en comparación con personas sanas. Sin embargo, en el CCRCC, una menor actividad de NEP/CD10, ACE2 y ACE correlaciona con diferentes parámetros clínicos de mal pronóstico.



## 6.2 CAPÍTULO 2: PROTEÍNA DE ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS $\alpha$ (FAP $\alpha$ ) EN EL CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (CCRCC).

- La serina proteasa proteína de activación de fibroblastos  $\alpha$  (FAP $\alpha$ ) se expresa en los CAFs de tumores primarios y metástasis del CCRCC. Esta expresión correlaciona de forma significativa con parámetros de agresividad tumoral y, en el caso de FAPp, con una peor supervivencia a los 5, 10 y 15 años, lo que la convierte en un marcador relevante de mal pronóstico en pacientes con CCRCC y mCCRCC.
- La expresión de FAP $\alpha$  en el tumor primario correlaciona con metástasis sincrónicas a ganglios linfáticos lo que lo convierte en un buen predictor del desarrollo de metástasis en fases tempranas.
- Existe una correlación positiva entre la expresión de FAP $\alpha$  en tumores primarios y sus respectivas metástasis en el mCCRCC. Además, dicha expresión se asocia con el de la vimentina tanto en tejido primario como en el metastásico. Estos resultados sugieren un rol para la FAP $\alpha$  en el desarrollo de metástasis. Sin embargo, es necesario profundizar en este aspecto para conocer los fenómenos en los que está involucrado.
- Los ensayos *in vitro* demuestran un aumento de la expresión de FAP $\alpha$  como consecuencia de la interacción entre CAFs y células tumorales renales. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios para conocer su rol específico en el desarrollo tumoral. En este sentido, el empleo de modelos que permitan analizar los diversos mecanismos de acción de esta serina proteasa en el microambiente tumoral es una de las prioridades.

## **7. BIBLIOGRAFÍA.** Bibliografia



## 7. Bibliografía. Bibliografia

1. Koeppen, Bruce M.; Stanton BA. **Renal Physiology**. Philadelphia: Elsevier; 2013. 256 p.
2. Lote CJ. **Principles of Renal Physiology**. New York, NY: Springer International Publishing; 2012.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. **Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012**. Vol. 136, International Journal of Cancer. 2015 Mar 1;359–86.
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. **Global cancer statistics, 2012**. Vol. 65, CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2015 Mar;87–108.
5. López de Munáin A.; Audícana C.; Larrañaga N. **Minbizia Euskal Autonomia Erkidegoan 2000-2015**. 2017.
6. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. **International Variations and Trends in Renal Cell Carcinoma Incidence and Mortality**. Vol. 67, European Urology. 2015 Mar;519–30.
7. Sánchez-Martín FM, Millán-Rodríguez F, Urdaneta-Pignalosa G, Rubio-Briones J, Villavicencio-Mavrich H. **Small Renal Masses: Incidental Diagnosis, Clinical Symptoms, and Prognostic Factors**. Advances in Urology. 2008;1–6.
8. Dy GW, Gore JL, Forouzanfar MH, Naghavi M, Fitzmaurice C. **Global Burden of Urologic Cancers, 1990–2013**. Vol. 71, European Urology. 2017 Mar;437–46.
9. Chow W-H, Dong LM, Devesa SS. **Epidemiology and risk factors for kidney cancer**. Vol. 7, Nature Reviews Urology. 2010 May;245–57.
10. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. **Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: Meta-analysis of 24 studies**. Vol. 114, International Journal of Cancer. 2005 Mar 10;101–8.
11. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. **Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies**. Vol. 371, The Lancet. 2008 Feb;569–78.
12. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjønneland A, et al. **Blood Pressure and Risk of Renal Cell Carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition**. Vol. 167, American Journal of Epidemiology. 2008 Jan 7;438–46.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

13. Haas NB, Nathanson KL. **Hereditary Kidney Cancer Syndromes**. Vol. 21, *Advances in Chronic Kidney Disease*. 2014 Jan;81–90.
14. Abe H, Kamai T. **Recent advances in the treatment of metastatic renal cell carcinoma**. *International Journal of Urology*. 2013 Jun;
15. Cohen HT, McGovern FJ. **Renal-Cell Carcinoma**. Vol. 353, *New England Journal of Medicine*. 2005 Dec 8;2477–90.
16. Lohse CM, Gupta S, Cheville JC. **Outcome prediction for patients with renal cell carcinoma**. Vol. 32, *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2015;172–83.
17. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL T. **AJCC Cancer Staging Manual 7th Edition**. New York: Springer; 2010.
18. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. **Renal cell carcinoma**. Vol. 3, *Nature reviews. Disease primers*. 2017 Mar 9;17009.
19. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. **Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma**. Vol. 6, *The American journal of surgical pathology*. 1982 Oct;655–63.
20. Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, et al. **The International Society of Urological Pathology (ISUP) Grading System for Renal Cell Carcinoma and Other Prognostic Parameters**. Vol. 37, *The American Journal of Surgical Pathology*. 2013 Oct;1490–504.
21. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Leibovich BC, Frank I, et al. **Sarcomatoid renal cell carcinoma: an examination of underlying histologic subtype and an analysis of associations with patient outcome**. Vol. 28, *The American journal of surgical pathology*. 2004 Apr;435–41.
22. Przybycin CG, McKenney JK, Reynolds JP, Campbell S, Zhou M, Karafa MT, et al. **Rhabdoid Differentiation Is Associated With Aggressive Behavior in Renal Cell Carcinoma**. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2014 Aug;1.
23. Lam JS, Shvarts O, Said JW, Pantuck AJ, Seligson DB, Aldridge ME, et al. **Clinicopathologic and molecular correlations of necrosis in the primary tumor of patients with renal cell carcinoma**. Vol. 103, *Cancer*. 2005 Jun 15;2517–25.
24. Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Said JW, Shvarts O, Quintana D, et al. **Improved Prognostication of Renal Cell Carcinoma Using an Integrated Staging System**. Vol. 19, *Journal of Clinical Oncology*. 2001 Mar 15;1649–57.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

25. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. **An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score.** Vol. 168, The Journal of urology. 2002 Dec;2395–400.
26. Krabbe L-M, Bagrodia A, Margulis V, Wood C. **Surgical Management of Renal Cell Carcinoma.** Vol. 31, Seminars in Interventional Radiology. 2014 Feb 20;027–32.
27. El Dib R, Touma NJ, Kapoor A. **Cryoablation vs radiofrequency ablation for the treatment of renal cell carcinoma: a meta-analysis of case series studies.** Vol. 110, BJU International. 2012 Aug;510–6.
28. Milowsky MI, Nanus DM. **Chemotherapeutic strategies for renal cell carcinoma.** Vol. 30, The Urologic clinics of North America. 2003 Aug;601–9.
29. De Meerleer G, Khoo V, Escudier B, Joniau S, Bossi A, Ost P, et al. **Radiotherapy for renal-cell carcinoma.** Vol. 15, The Lancet Oncology. 2014 Apr;e170–7.
30. Kerbl K, Clayman R V, McDougall EM, Kavoussi LR. **Laparoscopic nephrectomy.** Vol. 307, BMJ (Clinical research ed.). 1993 Dec 4;1488–9.
31. Dunn MD, Portis AJ, Shalhav AL, Elbahnasy AM, Heidorn C, McDougall EM, et al. **Laparoscopic versus open radical nephrectomy: a 9-year experience.** Vol. 164, The Journal of urology. 2000 Oct;1153–9.
32. Patard J-J, Shvarts O, Lam JS, Pantuck AJ, Kim HL, Ficarra V, et al. **Safety and efficacy of partial nephrectomy for all T1 tumors based on an international multicenter experience.** Vol. 171, The Journal of urology. 2004 Jun;2181–5, quiz 2435.
33. Crépel M, Jeldres C, Sun M, Lughezzani G, Isbarn H, Alasker A, et al. **A Population-based Comparison of Cancer-control Rates Between Radical and Partial Nephrectomy for T1A Renal Cell Carcinoma.** Vol. 76, Urology. 2010 Oct;883–8.
34. Hanna N, Sun M, Meyer CP, Nguyen PL, Pal SK, Chang SL, et al. **Survival Analyses of Patients With Metastatic Renal Cancer Treated With Targeted Therapy With or Without Cytoreductive Nephrectomy: A National Cancer Data Base Study.** Vol. 34, Journal of Clinical Oncology. 2016 Sep 20;3267–75.
35. Tosco L, Van Poppel H, Frea B, Gregoraci G, Joniau S. **Survival and Impact of Clinical Prognostic Factors in Surgically Treated Metastatic Renal Cell Carcinoma.** Vol. 63, European Urology. 2013 Apr;646–52.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

36. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. **Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma.** Vol. 356, New England Journal of Medicine. 2007 Jan 11;115–24.
37. Buczek M, Escudier B, Bartnik E, Szczylik C, Czarnecka A. **Resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear cell renal cell carcinoma: From the patient's bed to molecular mechanisms.** Vol. 1845, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer. 2014 Jan;31–41.
38. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. **Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial.** Vol. 372, The Lancet. 2008 Aug;449–56.
39. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. **Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma.** Vol. 356, New England Journal of Medicine. 2007 May 31;2271–81.
40. Armstrong AJ, Halabi S, Eisen T, Broderick S, Stadler WM, Jones RJ, et al. **Everolimus versus sunitinib for patients with metastatic non-clear cell renal cell carcinoma (ASPEN): a multicentre, open-label, randomised phase 2 trial.** Vol. 17, The Lancet Oncology. 2016 Mar;378–88.
41. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. **Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma.** Vol. 373, New England Journal of Medicine. 2015 Nov 5;1803–13.
42. Hsieh JJ, Chen D, Wang PI, Marker M, Redzematovic A, Chen Y-B, et al. **Genomic Biomarkers of a Randomized Trial Comparing First-line Everolimus and Sunitinib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma.** Vol. 71, European Urology. 2017 Mar;405–14.
43. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. **The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours.** Vol. 70, European Urology. 2016 Jul;93–105.
44. Muglia VF, Prando A. **Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings.** Vol. 48, Radiologia Brasileira. 2015 Jun;166–74.
45. McLennan, Gregory; Cheng L. **Neoplasms of the Kidney.** In: Cheng L, Bostwick DG, editors. Essentials of Anatomic Pathology. Cham: Springer International Publishing; 2016.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

46. Leibovich BC, Lohse CM, Crispen PL, Boorjian SA, Thompson RH, Blute ML, et al. **Histological Subtype is an Independent Predictor of Outcome for Patients With Renal Cell Carcinoma.** Vol. 183, The Journal of Urology. 2010 Apr;1309–16.
47. Zhou, Ming; Hattab, Eyas M; Eble, John N; Cheng L. **Neoplasms of the kidney.** In: Genitourinary Pathology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015.
48. Creighton CJ, Morgan M, Gunaratne PH, Wheeler DA, Gibbs RA, Gordon Robertson A, et al. **Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma.** Vol. 499, Nature. 2013 Jun 23;43–9.
49. Kaelin WG. **The Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene and Kidney Cancer.** Vol. 10, Clinical Cancer Research. 2004 Sep 15;6290S–6295S.
50. Shen C, Kaelin WG. **The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma.** Vol. 23, Seminars in Cancer Biology. 2013 Feb;18–25.
51. Voss MH, Hakimi AA, Pham CG, Brannon AR, Chen Y-B, Cunha LF, et al. **Tumor Genetic Analyses of Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma and Extended Benefit from mTOR Inhibitor Therapy.** Vol. 20, Clinical Cancer Research. 2014 Apr 1;1955–64.
52. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. **Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing.** Vol. 366, New England Journal of Medicine. 2012 Mar 8;883–92.
53. Şenbabaoğlu Y, Gejman RS, Winer AG, Liu M, Van Allen EM, de Velasco G, et al. **Tumor immune microenvironment characterization in clear cell renal cell carcinoma identifies prognostic and immunotherapeutically relevant messenger RNA signatures.** Vol. 17, Genome Biology. 2016 Dec 17;231.
54. Abrahams NA, Tamboli P. **Oncocytic renal neoplasms: diagnostic considerations.** Vol. 25, Clinics in laboratory medicine. 2005 Jun;317–39, vi.
55. Hes O, Petersson F, Kuroda N, Hora M, Michal M. **Renal hybrid oncocytic/chromophobe tumors - a review.** Vol. 28, Histology and histopathology. 2013;1257–64.
56. Ng KL, Rajandram R, Morais C, Yap NY, Samaratunga H, Gobe GC, et al. **Differentiation of oncocytoma from chromophobe renal cell carcinoma (RCC): can novel molecular biomarkers help solve an old problem?** Vol. 67, Journal of Clinical Pathology. 2014 Feb;97–104.



## 7. Bibliografia. Bibliografia

57. Al-Saleem T, Cairns P, Dulaimi EA, Feder M, Testa JR, Uzzo RG. **The genetics of renal oncocytosis: a possible model for neoplastic progression.** Vol. 152, Cancer Genetics and Cytogenetics. 2004 Jul;23–8.
58. Rawlings ND, SG. **Handbook of Proteolytic Enzymes.** Alan Barrett Neil Rawlings J. Woessner, editor. 2013. 4094 p.
59. Barrett AJ, Rawlings ND. **“Species” of peptidases.** Vol. 388, Biological Chemistry. 2007 Jan 1;
60. Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. **Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors.** Vol. 44, Nucleic Acids Research. 2016 Jan 4;D343–50.
61. Turk B, Turk D, Turk V. **Protease signalling: the cutting edge.** Vol. 31, The EMBO Journal. 2012 Apr 4;1630–43.
62. Das A, Monteiro M, Barai A, Kumar S, Sen S. **MMP proteolytic activity regulates cancer invasiveness by modulating integrins.** Vol. 7, Scientific reports. 2017 Oct 27;14219.
63. Affara NI, Andreu P, Coussens LM. **Delineating protease functions during cancer development.** Vol. 539, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2009;1–32.
64. Nieman MT. **Protease-activated receptors in hemostasis.** Vol. 128, Blood. 2016 Jul 14;169–77.
65. Chadha KC, Nair BB, Chakravarthi S, Zhou R, Godoy A, Mohler JL, et al. **Enzymatic activity of free-prostate-specific antigen (f-PSA) is not required for some of its physiological activities.** Vol. 71, The Prostate. 2011 Nov;1680–90.
66. Mullooly M, McGowan PM, Crown J, Duffy MJ. **The ADAMs family of proteases as targets for the treatment of cancer.** Vol. 17, Cancer Biology & Therapy. 2016 Aug 2;870–80.
67. Cepeda MA, Evered CL, Pelling JJH, Damjanovski S. **Inhibition of MT1-MMP proteolytic function and ERK1/2 signalling influences cell migration and invasion through changes in MMP-2 and MMP-9 levels.** Vol. 11, Journal of cell communication and signaling. 2017 Jun;167–79.
68. Turk B. **Targeting proteases: successes, failures and future prospects.** Vol. 5, Nature Reviews Drug Discovery. 2006;785–99.

## 7. Bibliografia. Bibliografía

69. Cushman DW, Ondetti MA. **History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme.** Vol. 17, Hypertension. 1991 Apr 1;589–92.
70. Holst JJ, Deacon CF. **Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes.** Vol. 47, Diabetes. 1998 Nov 1;1663–70.
71. Scheen AJ. **A review of gliptins for 2014.** Vol. 16, Expert Opinion on Pharmacotherapy. 2015 Jan 2;43–62.
72. Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.** Vol. 144, Cell. 2011 Mar;646–74.
73. van Kempen LCL, de Visser KE, Coussens LM. **Inflammation, proteases and cancer.** Vol. 42, European Journal of Cancer. 2006 Apr;728–34.
74. Hoeller D, Hecker C-M, Dikic I. **Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis.** Vol. 6, Nature Reviews Cancer. 2006 Oct;776–88.
75. Havre, Pamela A. **The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer.** Vol. 13, Frontiers in Bioscience. 2008;1634.
76. Weidle UH, Tiefenthaler G, Georges G. **Proteases as activators for cytotoxic prodrugs in antitumor therapy.** Vol. 11, Cancer genomics & proteomics. :67–79.
77. Lah TT, Durán Alonso MB, Van Noorden CJ. **Antiprotease therapy in cancer: hot or not?** Vol. 6, Expert Opinion on Biological Therapy. 2006 Mar 27;257–79.
78. Coussens LM. **Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer--Trials and Tribulations.** Vol. 295, Science. 2002 Mar 29;2387–92.
79. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. **Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas.** Vol. 2, Genes & Diseases. 2015 Mar;26–34.
80. Adams J, Kauffman M. **Development of the Proteasome Inhibitor Velcade™ (Bortezomib).** Vol. 22, Cancer Investigation. 2004 Jan 24;304–11.
81. Barry MJ. **Prostate-Specific–Antigen Testing for Early Diagnosis of Prostate Cancer.** Vol. 344, New England Journal of Medicine. 2001 May 3;1373–7.
82. Look MP, Foekens JA. **Clinical relevance of the urokinase plasminogen activator system in breast cancer.** Vol. 107, APMIS. 1999 Mar;150–9.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

83. Góra J, Latajka R. **Involvement of cysteine proteases in cancer.** Vol. 22, Current medicinal chemistry. 2015;944–57.
84. Truong LD, Shen SS. **Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms.** Vol. 135, Archives of pathology & laboratory medicine. 2011 Jan;92–109.
85. Paul M. **Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems.** Vol. 86, Physiological Reviews. 2006 Jul 1;747–803.
86. Kumar R, Singh VP, Baker KM. **The intracellular renin–angiotensin system: a new paradigm.** Vol. 18, Trends in Endocrinology & Metabolism. 2007 Jul;208–14.
87. Basso N, Terragno NA. **History About the Discovery of the Renin-Angiotensin System.** Vol. 38, Hypertension. 2001 Dec 1;1246–9.
88. Braun-Menendez E, Page IH. **Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin.** Vol. 127, Science. 1958 Jan 31;242–242.
89. Ondetti M, Rubin B, Cushman D. **Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents.** Vol. 196, Science. 1977 Apr 22;441–4.
90. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, et al. **Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists.** Vol. 45, Pharmacological reviews. 1993 Jun;205–51.
91. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. **A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9.** Vol. 87, Circulation Research. 2000 Sep 1;e1–9.
92. Li XC, Zhang J, Zhuo JL. **The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: Physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases.** Vol. 125, Pharmacological Research. 2017 Nov;21–38.
93. George AJ, Thomas WG, Hannan RD. **The renin–angiotensin system and cancer: old dog, new tricks.** Vol. 10, Nature Reviews Cancer. 2010 Nov 22;745–59.
94. Zhuo JL, Ferrao FM, Zheng Y, Li XC. **New Frontiers in the Intrarenal Renin-Angiotensin System: A Critical Review of Classical and New Paradigms.** Vol. 4, Frontiers in Endocrinology. 2013;

## 7. Bibliografia. Bibliografia

95. Hrenak J, Paulis L, Simko F. **Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology.** Vol. 17, International Journal of Molecular Sciences. 2016 Jul 20;1098.
96. Navar LG. **Physiology: hemodynamics, endothelial function, renin–angiotensin–aldosterone system, sympathetic nervous system.** Vol. 8, Journal of the American Society of Hypertension. 2014 Jul;519–24.
97. Jarari N, Rao N, Peela JR, Ellafi KA, Shakila S, Said AR, et al. **A review on prescribing patterns of antihypertensive drugs.** Vol. 22, Clinical Hypertension. 2015 Dec 27;7.
98. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. **Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies.** Vol. 94, Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017 Oct;317–25.
99. Romero CA, Orias M, Weir MR. **Novel RAAS agonists and antagonists: clinical applications and controversies.** Vol. 11, Nature Reviews Endocrinology. 2015 Feb 10;242–52.
100. Almeida-Santos AF, Kangussu LM, Campagnole-Santos MJ. **The Renin-Angiotensin System and the Neurodegenerative Diseases: a brief review.** Vol. 24, Protein & Peptide Letters. 2017 Aug 22;
101. Palumbo A, Ávila J, Naftolin F. **The Ovarian Renin–Angiotensin System (OVRAS).** Vol. 23, Reproductive Sciences. 2016 Dec 7;1644–55.
102. Po Sing Leung. **Frontiers in Research of the Renin-Angiotensin System on Human Disease.** Springer; 2007. 304 p.
103. Wegman-Ostrosky T, Soto-Reyes E, Vidal-Millan S, Sanchez-Corona J. **The renin-angiotensin system meets the hallmarks of cancer.** Vol. 16, J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2015;227–33.
104. Kaji K, Yoshiji H, Ikenaka Y, Noguchi R, Aihara Y, Shirai Y, et al. **Possible involvement of angiogenesis in chronic liver diseases: interaction among renin-angiotensin-aldosterone system, insulin resistance and oxidative stress.** Vol. 19, Current medicinal chemistry. 2012;1889–98.
105. Campbell DJ. **Clinical Relevance of Local Renin Angiotensin Systems.** Vol. 5, Frontiers in Endocrinology. 2014 Jul 14;
106. Pena-Polanco JE, Fried LF. **Established and Emerging Strategies in the Treatment of Chronic Kidney Disease.** Vol. 36, Seminars in Nephrology. 2016 Jul;331–42.

## 7. Bibliografía. Bibliografia

107. Catalá-López F, Macías Saint-Gerons D, González-Bermejo D, Rosano GM, Davis BR, Ridao M, et al. **Cardiovascular and Renal Outcomes of Renin–Angiotensin System Blockade in Adult Patients with Diabetes Mellitus: A Systematic Review with Network Meta-Analyses.** Taal MW, editor. Vol. 13, PLOS Medicine. 2016 Mar 8;e1001971.
108. Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, et al. **Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer?** Vol. 352, The Lancet. 1998 Jul;179–84.
109. Fujimoto M, Kanou M, Hosomi K, Takada M. **Angiotensin receptor blockers and the risk of cancer: data mining of a spontaneous reporting database and a claims database.** Vol. 55, Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2017 Apr 1;295–303.
110. Shen J, Huang Y-M, Wang M, Hong X-Z, Song X-N, Zou X, et al. **Renin-angiotensin system blockade for the risk of cancer and death.** Vol. 17, Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. 2016 Jul 8;
111. Song T, Choi CH, Kim MK, Kim M-L, Yun BS, Seong SJ. **The effect of angiotensin system inhibitors (angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers) on cancer recurrence and survival.** Vol. 26, European Journal of Cancer Prevention. 2017 Jan;78–85.
112. Sun H, Li T, Zhuang R, Cai W, Zheng Y. **Do renin–angiotensin system inhibitors influence the recurrence, metastasis, and survival in cancer patients?** Vol. 96, Medicine. 2017 Mar;e6394.
113. Yang H, Cai C, Ye L, Rao Y, Wang Q, Hu D, et al. **The relationship between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and digestive cancer risk: Insights from a meta-analysis.** Vol. 16, Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. 2015 Dec;1306–13.
114. Wang X, Wang S, Lin Y, Wu J, Chen H, Mao Y, et al. **Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of prostate cancer in the Han population of China.** Vol. 29, Medical Oncology. 2012 Sep 28;1964–71.
115. Delforce SJ, Lumbers ER, Corbisier de Meaultsart C, Wang Y, Proietto A, Otton G, et al. **Expression of renin–angiotensin system (RAS) components in endometrial cancer.** Vol. 6, Endocrine Connections. 2017 Jan;9–19.
116. Shirotake S, Miyajima A, Kosaka T, Tanaka N, Maeda T, Kikuchi E, et al. **Angiotensin II Type 1 Receptor Expression and Microvessel Density in Human Bladder Cancer.** Vol. 77, Urology. 2011 Apr;1009.e19-1009.e25.

## 7. Bibliografía. Bibliografia

117. Dolley-Hitze T, Jouan F, Martin B, Mottier S, Edeline J, Moranne O, et al. **Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma?** Vol. 103, British Journal of Cancer. 2010 Nov 23;1698–705.
118. Uemura H, Hasumi H, Ishiguro H, Teranishi J, Miyoshi Y, Kubota Y. **Renin-angiotensin system is an important factor in hormone refractory prostate cancer.** Vol. 66, The Prostate. 2006 Jun 1;822–30.
119. Arrieta O, Villarreal-Garza C, Vizcaíno G, Pineda B, Hernández-Pedro N, Guevara-Salazar P, et al. **Association between AT1 and AT2 angiotensin II receptor expression with cell proliferation and angiogenesis in operable breast cancer.** Vol. 36, Tumor Biology. 2015 Jul 15;5627–34.
120. Han C-D, Ge W-S. **Up-Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Enhances Cell Proliferation and Predicts Poor Prognosis in Laryngeal Cancer.** Vol. 22, Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research. 2016 Nov 1;4132–8.
121. Ye G, Qin Y, Lu X, Xu X, Xu S, Wu C, et al. **The association of renin-angiotensin system genes with the progression of hepatocellular carcinoma.** Vol. 459, Biochemical and Biophysical Research Communications. 2015 Mar;18–23.
122. Zhou L, Zhang R, Yao W, Wang J, Qian A, Qiao M, et al. **Decreased expression of angiotensin-converting enzyme 2 in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with tumor progression.** Vol. 217, The Tohoku journal of experimental medicine. 2009 Feb;123–31.
123. Luo Y, Tanabe E, Kitayoshi M, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Matsushima S, et al. **Expression of MAS1 in breast cancer.** Vol. 106, Cancer Science. 2015 Sep;1240–8.
124. Bernardi S, Zennaro C, Palmisano S, Velkoska E, Sabato N, Toffoli B, et al. **Characterization and significance of ACE2 and Mas receptor in human colon adenocarcinoma.** Vol. 13, Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS. 2012 Mar;202–9.
125. Huang M-M, Guo A-B, Sun J-F, Chen X-L, Yin Z-Y. **Angiotensin II promotes the progression of human gastric cancer.** Vol. 9, Molecular Medicine Reports. 2014 Mar;1056–60.
126. Ren H. **Angiotensin II receptor type 1 blockers suppress the cell proliferation effects of angiotensin II in breast cancer cells by inhibiting AT1R signaling.** Oncology Reports. 2012 Mar 13;

## 7. Bibliografia. Bibliografia

127. Uemura H, Ishiguro H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Miyoshi Y, Fujinami K, et al. **Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: a possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor.** Vol. 2, Molecular cancer therapeutics. 2003 Nov;1139–47.
128. Ji Y, Wang Z, Li Z, Zhang A, Jin Y, Chen H, et al. **Angiotensin II Enhances Proliferation and Inflammation through AT1/PKC/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma Cells.** Vol. 39, Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. 2016 Jun 20;13–32.
129. Alvarenga EC de, Fonseca M de C, Carvalho CC, Florentino RM, França A, Matias E, et al. **Angiotensin Converting Enzyme Regulates Cell Proliferation and Migration.** Filleur S, editor. Vol. 11, PLOS ONE. 2016 Dec 19;e0165371.
130. Guimond M-O, Battista M-C, Nikjoutavabi F, Carmel M, Barres V, Doueik AA, et al. **Expression and role of the angiotensin II AT2 receptor in human prostate tissue: In search of a new therapeutic option for prostate cancer.** Vol. 73, The Prostate. 2013 Jul;1057–68.
131. Doi C, Egashira N, Kawabata A, Maurya DK, Ohta N, Uppalapati D, et al. **Angiotensin II type 2 receptor signaling significantly attenuates growth of murine pancreatic carcinoma grafts in syngeneic mice.** Vol. 10, BMC Cancer. 2010 Dec 24;67.
132. Kinoshita J, Fushida S, Harada S, Yagi Y, Fujita H, Kinami S, et al. **Local angiotensin II-generation in human gastric cancer: correlation with tumor progression through the activation of ERK1/2, NF-kappaB and survivin.** Vol. 34, International journal of oncology. 2009 Jun;1573–82.
133. Amaya K, Ohta T, Kitagawa H, Kayahara M, Takamura H, Fujimura T, et al. **Angiotensin II activates MAP kinase and NF-kappaB through angiotensin II type I receptor in human pancreatic cancer cells.** Vol. 25, International journal of oncology. 2004 Oct;849–56.
134. Bakhtiari E, Hosseini A, Boroushaki MT, Mousavi SH. **Angiotensin II receptor antagonist olmesartan and NF-kappaB inhibitor as cytotoxic and apoptotic agents in MCF-7 human cell line.** Vol. 28, Journal of chemotherapy (Florence, Italy). 2016 Aug;314–20.
135. Pei N, Mao Y, Wan P, Chen X, Li A, Chen H, et al. **Angiotensin II type 2 receptor promotes apoptosis and inhibits angiogenesis in bladder cancer.** Vol. 36, Journal of experimental & clinical cancer research : CR. 2017 Jun 9;77.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

136. Lützen U, Zhao Y, Lucht K, Zuhayra M, Hedderich J, Cascorbi I, et al. **Activation of the cell membrane angiotensin AT2 receptors in human leiomyosarcoma cells induces differentiation and apoptosis by a PPAR $\gamma$  – dependent mechanism.** Vol. 64, Neoplasma. 2017;395–405.
137. Liu Y, Li B, Wang X, Li G, Shang R, Yang J, et al. **Angiotensin-(1-7) Suppresses Hepatocellular Carcinoma Growth and Angiogenesis via Complex Interactions of Angiotensin II Type 1 Receptor, Angiotensin II Type 2 Receptor and Mas Receptor.** Vol. 21, Molecular medicine (Cambridge, Mass.). 2015 Jul 27;626–36.
138. Fan F, Tian C, Tao L, Wu H, Liu Z, Shen C, et al. **Candesartan attenuates angiogenesis in hepatocellular carcinoma via downregulating AT1R/VEGF pathway.** Vol. 83, Biomedicine & Pharmacotherapy. 2016 Oct;704–11.
139. Oh E, Kim JY, Cho Y, An H, Lee N, Jo H, et al. **Overexpression of angiotensin II type 1 receptor in breast cancer cells induces epithelial–mesenchymal transition and promotes tumor growth and angiogenesis.** Vol. 1863, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2016 Jun;1071–81.
140. Clere N, Corre I, Faure S, Guihot A-L, Vessières E, Chalopin M, et al. **Deficiency or blockade of angiotensin II type 2 receptor delays tumorigenesis by inhibiting malignant cell proliferation and angiogenesis.** Vol. 127, International Journal of Cancer. 2010 Feb 8;2279–91.
141. Menon J, Soto-Pantoja DR, Callahan MF, Cline JM, Ferrario CM, Tallant EA, et al. **Angiotensin-(1-7) Inhibits Growth of Human Lung Adenocarcinoma Xenografts in Nude Mice through a Reduction in Cyclooxygenase-2.** Vol. 67, Cancer Research. 2007 Mar 15;2809–15.
142. Krishnan B, Torti FM, Gallagher PE, Tallant EA. **Angiotensin-(1-7) reduces proliferation and angiogenesis of human prostate cancer xenografts with a decrease in angiogenic factors and an increase in sFlt-1.** Vol. 73, The Prostate. 2013 Jan;60–70.
143. Bouquet C, Lamandé N, Brand M, Gasc J-M, Jullienne B, Faure G, et al. **Suppression of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus-mediated gene transfer of human angiotensinogen.** Vol. 14, Molecular Therapy. 2006 Aug;175–82.
144. Carl-McGrath S, Ebert MPA, Lendeckel U, Röcken C. **Expression of the local angiotensin II system in gastric cancer may facilitate lymphatic invasion and nodal spread.** Vol. 6, Cancer biology & therapy. 2007 Aug;1218–26.



## 7. Bibliografia. Bibliografia

145. Rodrigues-Ferreira S, Abdelkarim M, Dillenburg-Pilla P, Luissint A-C, Di-Tommaso A, Deshayes F, et al. **Angiotensin II facilitates breast cancer cell migration and metastasis.** Vol. 7, PloS one. 2012;e35667.
146. Zhou L, Luo Y, Sato S, Tanabe E, Kitayoshi M, Fujiwara R, et al. **Role of two types of angiotensin II receptors in colorectal carcinoma progression.** Vol. 81, Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology. 2014;169–75.
147. Koh SL, Ager EI, Costa PLN, Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V, Christophi C. **Blockade of the renin-angiotensin system inhibits growth of colorectal cancer liver metastases in the regenerating liver.** Vol. 31, Clinical & experimental metastasis. 2014 Apr;395–405.
148. Miyajima A, Kosaka T, Asano T, Asano T, Seta K, Kawai T, et al. **Angiotensin II type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis.** Vol. 62, Cancer research. 2002 Aug 1;4176–9.
149. Krishnan B, Smith TL, Dubey P, Zapadka ME, Torti FM, Willingham MC, et al. **Angiotensin-(1-7) attenuates metastatic prostate cancer and reduces osteoclastogenesis.** Vol. 73, The Prostate. 2013 Jan;71–82.
150. Qian Y-R, Guo Y, Wan H-Y, Fan L, Feng Y, Ni L, et al. **Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates the metastasis of non-small cell lung cancer through inhibition of epithelial-mesenchymal transition.** Vol. 29, Oncology reports. 2013 Jun;2408–14.
151. Yu C, Tang W, Wang Y, Shen Q, Wang B, Cai C, et al. **Downregulation of ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis promotes breast cancer metastasis by enhancing store-operated calcium entry.** Vol. 376, Cancer letters. 2016;268–77.
152. Bruce EB, de Kloet AD. **The intricacies of the renin-angiotensin-system in metabolic regulation.** Vol. 178, Physiology & behavior. 2017 Sep 1;157–65.
153. Das UN. **Renin-angiotensin-aldosterone system in insulin resistance and metabolic syndrome.** Vol. 4, Journal of translational internal medicine. 2016 Jun 1;66–72.
154. Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA. **The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome.** Vol. 302, American journal of physiology. Heart and circulatory physiology. 2012 Mar 15;H1219-30.

## 7. Bibliografia. Bibliografía

155. Tone A, Shikata K, Ogawa D, Sasaki S, Nagase R, Sasaki M, et al. **Changes of gene expression profiles in macrophages stimulated by angiotensin II — Angiotensin II induces MCP-2 through AT1-receptor.** Vol. 8, Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. 2007 Mar;45–50.
156. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Ryan R, Pucci F, Sio SW, et al. **Angiotensin II Drives the Production of Tumor-Promoting Macrophages.** Vol. 38, Immunity. 2013 Feb;296–308.
157. Gopallawa I, Uhal BD. **Angiotensin-(1-7)/mas inhibits apoptosis in alveolar epithelial cells through upregulation of MAP kinase phosphatase-2.** Vol. 310, American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology. 2016 Feb 1;L240-8.
158. Zheng S, Yang Y, Song R, Yang X, Liu H, Ma Q, et al. **Ang-(1-7) promotes the migration and invasion of human renal cell carcinoma cells via Mas-mediated AKT signaling pathway.** Vol. 460, Biochemical and biophysical research communications. 2015 May 1;333–40.
159. Dandona P, Dhindsa S, Ghanim H, Chaudhuri A. **Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade.** Vol. 21, Journal of Human Hypertension. 2007 Jan 9;20–7.
160. Pinter M, Jain RK. **Targeting the renin-angiotensin system to improve cancer treatment: Implications for immunotherapy.** Vol. 9, Science Translational Medicine. 2017 Oct 4;ean5616.
161. Capettini LSA, Montecucco F, Mach F, Stergiopoulos N, Santos RAS, da Silva RF. **Role of renin-angiotensin system in inflammation, immunity and aging.** Vol. 18, Current pharmaceutical design. 2012;963–70.
162. Smith GR, Missailidis S. **Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors.** Vol. 1, Journal of inflammation (London, England). 2004 Sep 30;3.
163. Rodrigues-Ferreira S, Nahmias C. **G-protein coupled receptors of the renin-angiotensin system: new targets against breast cancer?** Vol. 6, Frontiers in pharmacology. 2015;24.
164. Gallagher PE, Arter AL, Deng G, Tallant EA. **Angiotensin-(1-7): a peptide hormone with anti-cancer activity.** Vol. 21, Current medicinal chemistry. 2014;2417–23.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

165. Coulson R, Liew SH, Connelly AA, Yee NS, Deb S, Kumar B, et al. **The angiotensin receptor blocker, Losartan, inhibits mammary tumor development and progression to invasive carcinoma.** *Oncotarget*. 2017 Mar 20;
166. Petty WJ, Miller AA, McCoy TP, Gallagher PE, Tallant EA, Torti FM. **Phase I and Pharmacokinetic Study of Angiotensin-(1-7), an Endogenous Antiangiogenic Hormone.** Vol. 15, *Clinical Cancer Research*. 2009 Dec 1;7398–404.
167. Savage PD, Lovato J, Brosnihan KB, Miller AA, Petty WJ. **Phase II Trial of Angiotensin-(1-7) for the Treatment of Patients with Metastatic Sarcoma.** Vol. 2016, *Sarcoma*. 2016;4592768.
168. Nakai Y, Isayama H, Ijichi H, Sasaki T, Takahara N, Ito Y, et al. **A multicenter phase II trial of gemcitabine and candesartan combination therapy in patients with advanced pancreatic cancer: GECA2.** Vol. 31, *Investigational new drugs*. 2013 Oct;1294–9.
169. Navar LG, Nishiyama A. **Why are angiotensin concentrations so high in the kidney?** Vol. 13, *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2004 Jan;107–15.
170. Brewster UC, Perazella MA. **The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease.** Vol. 116, *The American Journal of Medicine*. 2004 Feb;263–72.
171. Culver S, Li C, Siragy HM. **Intrarenal Angiotensin-Converting Enzyme: the Old and the New.** Vol. 19, *Current Hypertension Reports*. 2017 Oct 19;80.
172. Deckers IA, van den Brandt PA, van Engeland M, van Schooten F-J, Godschalk RW, Keszei AP, et al. **Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal cell cancer risk: Interplay with hypertension and intakes of sodium, potassium and fluid.** Vol. 136, *International Journal of Cancer*. 2015 Mar 1;1104–16.
173. de Martino M, Klatte T, Schatzl G, Waldert M, Remzi M, Haitel A, et al. **Insertion/Deletion Polymorphism of Angiotensin I-converting Enzyme Gene Is Linked With Chromophobe Renal Cell Carcinoma.** Vol. 77, *Urology*. 2011 Apr;1005.e9-1005.e13.
174. Miyajima A, Yazawa S, Kosaka T, Tanaka N, Shirotake S, Mizuno R, et al. **Prognostic Impact of Renin–Angiotensin System Blockade on Renal Cell Carcinoma After Surgery.** Vol. 22, *Annals of Surgical Oncology*. 2015 Oct 18;3751–9.

## 7. Bibliografía. Bibliografia

175. McKay RR, Rodriguez GE, Lin X, Kaymakcalan MD, Hamnvik O-PR, Sabbisetti VS, et al. **Angiotensin system inhibitors and survival outcomes in patients with metastatic renal cell carcinoma.** Vol. 21, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015 Jun 1;2471–9.
176. Keizman D, Huang P, Eisenberger MA, Pili R, Kim JJ, Antonarakis ES, et al. **Angiotensin system inhibitors and outcome of sunitinib treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: a retrospective examination.** Vol. 47, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2011 Sep;1955–61.
177. Izzedine H, Derosa L, Le Teuff G, Albiges L, Escudier B. **Hypertension and angiotensin system inhibitors: impact on outcome in sunitinib-treated patients for metastatic renal cell carcinoma.** Vol. 26, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2015 Jun;1128–33.
178. Goldfarb DA, Diz DI, Tubbs RR, Ferrario CM, Novick AC. **Angiotensin II Receptor Subtypes in the Human Renal Cortex and Renal Cell Carcinoma.** Vol. 151, *The Journal of Urology*. 1994 Jan;208–13.
179. Larrinaga G, Pérez I, Sanz B, Blanco L, López JI, Cándenas ML, et al. **Angiotensin-converting enzymes (ACE and ACE2) are downregulated in renal tumors.** Vol. 165, *Regulatory Peptides*. 2010 Dec;218–23.
180. Blanco L, Sanz B, Perez I, Sánchez CE, Cándenas ML, Pinto FM, et al. **Altered glutamyl-aminopeptidase activity and expression in renal neoplasms.** Vol. 14, *BMC Cancer*. 2014 Dec 30;386.
181. Hii SI, Nicol DL, Gotley DC, Thompson LC, Green MK, Jonsson JR. **Captopril inhibits tumour growth in a xenograft model of human renal cell carcinoma.** Vol. 77, *British journal of cancer*. 1998 Mar;880–3.
182. Araújo WF, Naves MA, Ravanini JN, Schor N, Teixeira VPC. **Renin-angiotensin system (RAS) blockade attenuates growth and metastatic potential of renal cell carcinoma in mice.** Vol. 33, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2015 Sep;389.e1-389.e7.
183. Yang K-K, Sui Y, Zhou H-R, Zhao H-L. **Interaction of renin-angiotensin system and adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling pathway in renal carcinogenesis of uninephrectomized rats.** Vol. 39, *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2017 May;1010428317699116.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

184. Funao K, Matsuyama M, Kawahito Y, Sano H, Chargui J, Touraine J-L, et al. **Telmisartan as a peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ligand is a new target in the treatment of human renal cell carcinoma.** Vol. 2, Molecular medicine reports. :193–8.
185. de Araújo Júnior RF, Leitão Oliveira ALCS, de Melo Silveira RF, de Oliveira Rocha HA, de França Cavalcanti P, de Araújo AA. **Telmisartan induces apoptosis and regulates Bcl-2 in human renal cancer cells.** Vol. 240, Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.). 2015 Jan;34–44.
186. Tatokoro M, Fujii Y, Kawakami S, Fukui N, Komai Y, Saito K, et al. **Favorable response to combination treatment of cimetidine, cyclooxygenase-2 inhibitor and renin-angiotensin system inhibitor in metastatic renal cell carcinoma: Report of three cases.** Vol. 15, International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association. 2008 Sep;848–50.
187. Tatokoro M, Fujii Y, Kawakami S, Saito K, Koga F, Matsuoka Y, et al. **Phase-II trial of combination treatment of interferon- $\alpha$ , cimetidine, cyclooxygenase-2 inhibitor and renin-angiotensin-system inhibitor (I-CCA therapy) for advanced renal cell carcinoma.** Vol. 102, Cancer science. 2011 Jan;137–43.
188. Velez JCQ. **The importance of the intrarenal renin-angiotensin system.** Vol. 5, Nature clinical practice. Nephrology. 2009 Feb;89–100.
189. Bauer J, Berthold H, Schaefer F, Ehmke H, Parekh N. **Quantification of conversion and degradation of circulating angiotensin in rats.** Vol. 277, The American journal of physiology. 1999 Aug;R412-8.
190. Leung PS, editor. **Frontiers in Research of the Renin-Angiotensin System on Human Disease.** 2007. 304 p.
191. Jokubaitis VJ, Sinka L, Driessen R, Whitty G, Haylock DN, Bertoncello I, et al. **Angiotensin-converting enzyme (CD143) marks hematopoietic stem cells in human embryonic, fetal, and adult hematopoietic tissues.** Vol. 111, Blood. 2008 Jan 11;4055–63.
192. Langner C, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Zigeuner R. **CD10 is a diagnostic and prognostic marker in renal malignancies.** Vol. 45, Histopathology. 2004 Nov;460–7.
193. Luan Y, Ma C, Wang Y, Fang H, Xu W. **The Characteristics, Functions and Inhibitors of Three Aminopeptidases Belonging to the M1 Family.** Vol. 13, Current Protein & Peptide Science. 2012 Aug 1;490–500.

## 7. Bibliografía. Bibliografia

194. Rettig WJ, Garin-Chesa P, Beresford HR, Oettgen HF, Melamed MR, Old LJ. **Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells.** Vol. 85, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1988 May;3110–4.
195. Aoyama A, Chen WT. **A 170-kDa membrane-bound protease is associated with the expression of invasiveness by human malignant melanoma cells.** Vol. 87, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1990 Nov;8296–300.
196. Monsky WL, Lin CY, Aoyama A, Kelly T, Akiyama SK, Mueller SC, et al. **A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells.** Vol. 54, Cancer research. 1994 Nov 1;5702–10.
197. Scanlan MJ, Raj BK, Calvo B, Garin-Chesa P, Sanz-Moncasi MP, Healey JH, et al. **Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers.** Vol. 91, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994 Jun 7;5657–61.
198. Piñeiro-Sánchez ML, Goldstein LA, Dodt J, Howard L, Yeh Y, Tran H, et al. **Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease.** Vol. 272, The Journal of biological chemistry. 1997 Mar 21;7595–601.
199. Lee KN. **Anti-plasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein.** Vol. 107, Blood. 2006 Feb 15;1397–404.
200. Goldstein LA, Chen W-T. **Identification of an Alternatively Spliced Seprase mRNA That Encodes a Novel Intracellular Isoform.** Vol. 275, Journal of Biological Chemistry. 2000 Jan 28;2554–9.
201. Aertgeerts K, Levin I, Shi L, Snell GP, Jennings A, Prasad GS, et al. **Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha.** Vol. 280, The Journal of biological chemistry. 2005 May 20;19441–4.
202. Sun S, Albright CF, Fish BH, George HJ, Selling BH, Hollis GF, et al. **Expression, purification, and kinetic characterization of full-length human fibroblast activation protein.** Vol. 24, Protein expression and purification. 2002 Mar;274–81.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

203. Park JE, Lenter MC, Zimmermann RN, Garin-chesa P, Old LJ, Rettig WJ. **Fibroblast Activation Protein , a Dual Specificity Serine Protease Expressed in Reactive Human Tumor Stromal Fibroblasts.** Vol. 274. 1999;36505–12.
204. Ghersi G, Zhao Q, Salamone M, Yeh Y, Zucker S, Chen W. **The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrice.** Vol. 66. 2007;4652–61.
205. Irwin DM. Ancient **Duplications of the Human Proglucagon Gene.** Vol. 79, Genomics. 2002 May;741–6.
206. Keane FM, Nadvi NA, Yao T-W, Gorrell MD. **Neuropeptide Y, B-type natriuretic peptide, substance P and peptide YY are novel substrates of fibroblast activation protein- $\alpha$ .** Vol. 278. FEBS journal. 2011 Apr;1316–32.
207. Christiansen VJ, Jackson KW, Lee KN, McKee PA. **Effect of fibroblast activation protein and alpha2-antiplasmin cleaving enzyme on collagen types I, III, and IV.** Vol. 457, Archives of biochemistry and biophysics. 2007 Jan 15;177–86.
208. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Dolence EK, McKee PA. **Enhancement of fibrinolysis by inhibiting enzymatic cleavage of precursor  $\alpha$ 2-antiplasmin.** Vol. 9, Journal of thrombosis and haemostasis. JTH. 2011 May;987–96.
209. Huang C-H, Suen C-S, Lin C-T, Chien C-H, Lee H-Y, Chung K-M, et al. **Cleavage-site specificity of prolyl endopeptidase FAP investigated with a full-length protein substrate.** Vol. 149, Journal of biochemistry. 2011 Jun;685–92.
210. Coppage AL, Heard KR, DiMare MT, Liu Y, Wu W, Lai JH, et al. **Human FGF-21 Is a Substrate of Fibroblast Activation Protein.** Alemany M, editor. Vol. 11, PLOS ONE. 2016 Mar 10;e0151269.
211. Sánchez-Garrido MA, Habegger KM, Clemmensen C, Holleman C, Müller TD, Perez-Tilve D, et al. **Fibroblast activation protein (FAP) as a novel metabolic target.** Vol. 5, Molecular Metabolism. 2016 Oct;1015–24.
212. Huang Y, Simms AE, Mazur A, Wang S, León NR, Jones B, et al. **Fibroblast activation protein- $\alpha$  promotes tumor growth and invasion of breast cancer cells through non-enzymatic functions.** Vol. 28, Clinical & Experimental Metastasis. 2011 Aug 22;567–79.
213. Artym V V, Kindzelskii AL, Chen W-T, Petty HR. **Molecular proximity of seprase and the urokinase-type plasminogen activator receptor on malignant melanoma cell membranes: dependence on beta1 integrins and the cytoskeleton.** Vol. 23, Carcinogenesis. 2002 Oct;1593–601.

## 7. Bibliografia. Bibliografía

214. Dolznig H, Schweifer N, Puri C, Kraut N, Rettig WJ, Kerjaschki D, et al. **Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin.** Vol. 5, Cancer immunity. 2005 Aug 3;10.
215. Bae S, Park CW, Son HK, Ju HK, Paik D, Jeon C-J, et al. **Fibroblast activation protein alpha identifies mesenchymal stromal cells from human bone marrow.** Vol. 142, British journal of haematology. 2008 Sep;827–30.
216. Busek P, Hrabal P, Fric P, Sedo A. **Co-expression of the homologous proteases fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase-IV in the adult human Langerhans islets.** Vol. 143, Histochemistry and cell biology. 2015 May;497–504.
217. Levy MT, McCaughan GW, Abbott CA, Park JE, Cunningham AM, Müller E, et al. **Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis.** Vol. 29, Hepatology (Baltimore, Md.). 1999 Jun;1768–78.
218. Acharya PS, Zukas A, Chandan V, Katzenstein A-LA, Puré E. **Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis.** Vol. 37, Human pathology. 2006 Mar;352–60.
219. Bauer S, Jendro MC, Wadle A, Kleber S, Stenner F, Dinser R, et al. **Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes.** Vol. 8, Arthritis research & therapy. 2006;R171.
220. Brokopp CE, Schoenauer R, Richards P, Bauer S, Lohmann C, Emmert MY, et al. **Fibroblast activation protein is induced by inflammation and degrades type I collagen in thin-cap fibroatheromata.** Vol. 32, European heart journal. 2011 Nov;2713–22.
221. Rovedatti L, Di Sabatino A, Knowles CH, Sengupta N, Biancheri P, Corazza GR, et al. **Fibroblast activation protein expression in Crohn's disease strictures.** Vol. 17, Inflammatory bowel diseases. 2011 May;1251–3.
222. Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. **Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers.** Vol. 87, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1990 Sep;7235–9.
223. Jacob M, Chang L, Pure E. **Fibroblast Activation Protein in Remodeling Tissues.** Vol. 12, Current Molecular Medicine. 2012 Nov 1;1220–43.



## 7. Bibliografia. Bibliografia

224. Dvorak HF. **Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing.** Vol. 315, The New England journal of medicine. 1986 Dec 25;1650–9.
225. Hui L, Chen Y. **Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil.** Vol. 368, Cancer letters. 2015 Nov 1;7–13.
226. Hanahan D, Coussens LM. **Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment.** Vol. 21, Cancer cell. 2012 Mar 20;309–22.
227. Quail DF, Joyce JA. **Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis.** Vol. 19, Nature Medicine. 2013;1423–37.
228. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. **Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment.** Vol. 14, Nature Immunology. 2013 Sep 18;1014–22.
229. Oikonomopoulou K, Brinc D, Kyriacou K, Diamandis EP. **Infection and Cancer: Reevaluation of the Hygiene Hypothesis.** Vol. 19, Clinical Cancer Research. 2013 Jun 1;2834–41.
230. Milara J, Cortijo J. **Tobacco, inflammation, and respiratory tract cancer.** Vol. 18, Current pharmaceutical design. 2012;3901–38.
231. Fang H, DeClerck YA. **Targeting the Tumor Microenvironment: From Understanding Pathways to Effective Clinical Trials.** Vol. 73, Cancer Research. 2013 Aug 15;4965–77.
232. Rusch T, Bayry J, Werner J, Shevchenko I, Bazhin A V. **Immunotherapy as an Option for Cancer Treatment.** Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. 2017 Oct 12;
233. Burugu S, Dancsok AR, Nielsen TO. **Emerging targets in cancer immunotherapy.** Seminars in cancer biology. 2017 Oct 5;
234. Sun Y. **Translational horizons in the tumor microenvironment: harnessing breakthroughs and targeting cures.** Vol. 35, Medicinal research reviews. 2015 Mar;408–36.
235. Anderberg C, Pietras K. **On the origin of cancer-associated fibroblasts.** Vol. 8, Cell cycle (Georgetown, Tex.). 2009 May 15;1461–2.
236. Marsh T, Pietras K, McAllister SS. **Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis.** Vol. 1832, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2013 Jul;1070–8.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

237. Kalluri R. **The biology and function of fibroblasts in cancer.** Vol. 16, Nature Reviews Cancer. 2016 Aug 23;582–98.
238. Räsänen K, Vaheri A. **Activation of fibroblasts in cancer stroma.** Vol. 316, Experimental Cell Research. 2010 Oct;2713–22.
239. Bhowmick NA. **TGF- Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia.** Vol. 303, Science. 2004 Feb 6;848–51.
240. Clayton A, Evans RA, Pettit E, Hallett M, Williams JD, Steadman R. **Cellular activation through the ligation of intercellular adhesion molecule-1.** Vol. 111 Pt 4, Journal of cell science. 1998 Feb;443–53.
241. Mitra AK, Zillhardt M, Hua Y, Tiwari P, Murmann AE, Peter ME, et al. **MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer.** Vol. 2, Cancer discovery. 2012 Dec;1100–8.
242. Tao L, Huang G, Song H, Chen Y, Chen L. **Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment (Review).** Oncology Letters. 2017 Jun 30;
243. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. **Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment.** Vol. 5, Cancer biology & therapy. 2006 Dec;1640–6.
244. Kalluri R. **The biology and function of fibroblasts in cancer.** Vol. 16, Nature reviews. Cancer. 2016;582–98.
245. Cirri P, Chiarugi P. **Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression.** Vol. 31, Cancer and Metastasis Reviews. 2012 Jun 19;195–208.
246. Trimboli AJ, Cantemir-Stone CZ, Li F, Wallace JA, Merchant A, Creasap N, et al. **Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours.** Vol. 461, Nature. 2009 Oct 22;1084–91.
247. Ostman A, Augsten M. **Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players.** Vol. 19, Current opinion in genetics & development. 2009 Feb;67–73.
248. Gomes FG, Nedel F, Alves AM, Nör JE, Tarquinio SBC. **Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms.** Vol. 92, Life sciences. 2013 Feb 7;101–7.

## 7. Bibliografia. Bibliografía

249. Ferrara N. **Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis.** Vol. 21, Cytokine & growth factor reviews. 2010 Feb;21–6.
250. Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. **Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction.** Vol. 110, British journal of cancer. 2014 Jan 21;469–78.
251. Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, et al. **Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells.** Vol. 9, Nature cell biology. 2007 Dec;1392–400.
252. Harper J, Sainson RCA. **Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts.** Vol. 25, Seminars in cancer biology. 2014 Apr;69–77.
253. Fiaschi T, Marini A, Giannoni E, Taddei ML, Gandellini P, De Donatis A, et al. **Reciprocal metabolic reprogramming through lactate shuttle coordinately influences tumor-stroma interplay.** Vol. 72, Cancer research. 2012 Oct 1;5130–40.
254. Alderton GK. **Therapeutic resistance: Fibroblasts restrain drug sensitivity.** Vol. 15, Nature reviews. Cancer. 2015 Jun;318–9.
255. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. **Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion.** Vol. 487, Nature. 2012 Jul 4;500–4.
256. Flach EH, Rebecca VW, Herlyn M, Smalley KSM, Anderson ARA. **Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance.** Vol. 8, Molecular pharmaceutics. 2011 Dec 5;2039–49.
257. Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, et al. **Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin  $\beta$ 1/FAK signaling.** Vol. 27, Cancer cell. 2015 Apr 13;574–88.
258. Sui H, Zhu L, Deng W, Li Q. **Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance: role, molecular mechanisms, and therapeutic strategies.** Vol. 37, Oncology research and treatment. 2014;584–9.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

259. Brennen WN, Isaacs JT, Denmeade SR. **Rationale Behind Targeting Fibroblast Activation Protein-Expressing Carcinoma-Associated Fibroblasts as a Novel Chemotherapeutic Strategy.** Vol. 11, *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012 Feb 1;257–66.
260. Schmitz S, Machiels J-P. **Targeting the Tumor Environment in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.** Vol. 17, *Current Treatment Options in Oncology*. 2016 Jul 4;37.
261. von Ahrens D, Bhagat TD, Nagrath D, Maitra A, Verma A. **The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer.** Vol. 10, *Journal of Hematology & Oncology*. 2017 Dec 28;76.
262. De Vlieghere E, Verset L, Demetter P, Bracke M, De Wever O. **Cancer-associated fibroblasts as target and tool in cancer therapeutics and diagnostics.** Vol. 467, *Virchows Archiv*. 2015 Oct 11;367–82.
263. Ramirez-Montagut T, Blachere NE, Sviderskaya E V, Bennett DC, Rettig WJ, Garin-Chesa P, et al. **FAPalpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor.** Vol. 23, *Oncogene*. 2004 Jul 15;5435–46.
264. Liu F, Qi L, Liu B, Liu J, Zhang H, Che D, et al. **Fibroblast Activation Protein Overexpression and Clinical Implications in Solid Tumors: A Meta-Analysis.** Green J, editor. Vol. 10, *PLOS ONE*. 2015 Mar 16;e0116683.
265. Hu M, Qian C, Hu Z, Fei B, Zhou H. **Biomarkers in Tumor Microenvironment? Upregulation of Fibroblast Activation Protein- $\alpha$  Correlates with Gastric Cancer Progression and Poor Prognosis.** Vol. 21, *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. 2017 Jan;38–44.
266. Ariga N, Sato E, Ohuchi N, Nagura H, Ohtani H. **Stromal expression of fibroblast activation protein/seprase, a cell membrane serine proteinase and gelatinase, is associated with longer survival in patients with invasive ductal carcinoma of breast.** Vol. 95, *International journal of cancer*. 2001 Jan 20;67–72.
267. Liao Y, Ni Y, He R, Liu W, Du J. **Clinical implications of fibroblast activation protein- $\alpha$  in non-small cell lung cancer after curative resection: a new predictor for prognosis.** Vol. 139, *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2013 Sep;1523–8.
268. Javidroozi M, Zucker S, Chen W-T. **Plasma seprase and DPP4 levels as markers of disease and prognosis in cancer.** Vol. 32, *Disease markers*. 2012;309–20.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

269. Liao Y, Xing S, Xu B, Liu W, Zhang G. **Evaluation of the circulating level of fibroblast activation protein  $\alpha$  for diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma.** Vol. 8, *Oncotarget*. 2017 May 2;30050–62.
270. Feng X, Wang Q, Liao Y, Zhou X, Wang Y, Liu W, et al. **A synthetic urinary probe-coated nanoparticles sensitive to fibroblast activation protein  $\alpha$  for solid tumor diagnosis.** Vol. 12, *International journal of nanomedicine*. 2017;5359–72.
271. Tansi FL, Ruger R, Bohm C, Kontermann RE, Teichgraeber UK, Fahr A, et al. **Potential of activatable FAP-targeting immunoliposomes in intraoperative imaging of spontaneous metastases.** Vol. 88, *Biomaterials*. 2016 May;70–82.
272. Yang L, Ma L, Lai D. **Over-expression of fibroblast activation protein alpha increases tumor growth in xenografts of ovarian cancer cells.** Vol. 45, *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2013 Nov;928–37.
273. Kawase T, Yasui Y, Nishina S, Hara Y, Yanatori I, Tomiyama Y, et al. **Fibroblast activation protein- $\alpha$ -expressing fibroblasts promote the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma.** Vol. 15, *BMC gastroenterology*. 2015 Sep 2;109.
274. Lo A, Li C-P, Buza EL, Blomberg R, Govindaraju P, Avery D, et al. **Fibroblast activation protein augments progression and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma.** Vol. 2, *JCI insight*. 2017 Oct 5;
275. Wen X, He X, Jiao F, Wang C, Sun Y, Ren X, et al. **Fibroblast Activation Protein- $\alpha$ -Positive Fibroblasts Promote Gastric Cancer Progression and Resistance to Immune Checkpoint Blockade.** Vol. 25, *Oncology research*. 2017 Apr 14;629–40.
276. Mentlein R, Hattermann K, Hemion C, Jungbluth AA, Held-Feindt J. **Expression and role of the cell surface protease seprase/fibroblast activation protein- $\alpha$  (FAP- $\alpha$ ) in astroglial tumors.** Vol. 392, *Biological chemistry*. 2011 Mar;199–207.
277. Kennedy A, Dong H, Chen D, Chen W-T. **Elevation of seprase expression and promotion of an invasive phenotype by collagenous matrices in ovarian tumor cells.** Vol. 124, *International journal of cancer*. 2009 Jan 1;27–35.
278. Wang R-F, Zhang L-H, Shan L-H, Sun W-G, Chai C-C, Wu H-M, et al. **Effects of the fibroblast activation protein on the invasion and migration of gastric cancer.** Vol. 95, *Experimental and molecular pathology*. 2013 Dec;350–6.

## 7. Bibliografía. Bibliografia

279. Teichgräber V, Monasterio C, Chaitanya K, Boger R, Gordon K, Dieterle T, et al. **Specific inhibition of fibroblast activation protein (FAP)-alpha prevents tumor progression in vitro.** Vol. 60, *Advances in medical sciences*. 2015 Sep;264–72.
280. Cai F, Li Z, Wang C, Xian S, Xu G, Peng F, et al. **Short hairpin RNA targeting of fibroblast activation protein inhibits tumor growth and improves the tumor microenvironment in a mouse model.** Vol. 46, *BMB reports*. 2013 May;252–7.
281. Wang H, Wu Q, Liu Z, Luo X, Fan Y, Liu Y, et al. **Downregulation of FAP suppresses cell proliferation and metastasis through PTEN/PI3K/AKT and Ras-ERK signaling in oral squamous cell carcinoma.** Vol. 5, *Cell death & disease*. 2014 Apr 10;e1155.
282. Huang Y, Simms AE, Mazur A, Wang S, León NR, Jones B, et al. **Fibroblast activation protein- $\alpha$  promotes tumor growth and invasion of breast cancer cells through non-enzymatic functions.** Vol. 28, *Clinical & experimental metastasis*. 2011 Aug;567–79.
283. Lv B, Xie F, Zhao P, Ma X, Jiang WG, Yu J, et al. **Promotion of Cellular Growth and Motility Is Independent of Enzymatic Activity of Fibroblast Activation Protein- $\alpha$ .** Vol. 13, *Cancer genomics & proteomics*. 2016;201–8.
284. Cheng JD, Valianou M, Canutescu AA, Jaffe EK, Lee H-O, Wang H, et al. **Abrogation of fibroblast activation protein enzymatic activity attenuates tumor growth.** Vol. 4, *Molecular cancer therapeutics*. 2005 Mar;351–60.
285. Lee H-O, Mullins SR, Franco-Barraza J, Valianou M, Cukierman E, Cheng JD. **FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells.** Vol. 11, *BMC cancer*. 2011 Jun 13;245.
286. Wäster P, Rosdahl I, Gilmore BF, Seifert O. **Ultraviolet exposure of melanoma cells induces fibroblast activation protein- $\alpha$  in fibroblasts: Implications for melanoma invasion.** Vol. 39, *International journal of oncology*. 2011 Jul;193–202.
287. Wang XM, Yu DMT, McCaughan GW, Gorrell MD. **Fibroblast activation protein increases apoptosis, cell adhesion, and migration by the LX-2 human stellate cell line.** Vol. 42, *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2005 Oct;935–45.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

288. Koczorowska MM, Tholen S, Bucher F, Lutz L, Kizhakkedathu JN, De Wever O, et al. **Fibroblast activation protein- $\alpha$ , a stromal cell surface protease, shapes key features of cancer associated fibroblasts through proteome and degradome alterations.** Vol. 10, Molecular Oncology. 2016 Jan;40–58.
289. Huang Y, Wang S, Kelly T. **Seprase promotes rapid tumor growth and increased microvessel density in a mouse model of human breast cancer.** Vol. 64, Cancer research. 2004 Apr 15;2712–6.
290. Patsouras D, Papaxoinis K, Kostakis A, Safioleas MC, Lazaris AC, Nicolopoulou-Stamati P. **Fibroblast activation protein and its prognostic significance in correlation with vascular endothelial growth factor in pancreatic adenocarcinoma.** Vol. 11, Molecular medicine reports. 2015 Jun;4585–90.
291. Santos AM, Jung J, Aziz N, Kissil JL, Puré E. **Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice.** Vol. 119, The Journal of clinical investigation. 2009 Dec;3613–25.
292. Tulley S, Chen W-T. **Transcriptional regulation of seprase in invasive melanoma cells by transforming growth factor- $\beta$  signaling.** Vol. 289, The Journal of biological chemistry. 2014 May 30;15280–96.
293. Chen H, Yang W-W, Wen Q-T, Xu L, Chen M. TGF-beta induces fibroblast activation protein expression; fibroblast activation protein expression increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM [corrected]. Vol. 87, Experimental and molecular pathology. 2009 Dec;189–94.
294. Wong PF, Gall MG, Bachovchin WW, McCaughan GW, Keane FM, Gorrell MD. **Neuropeptide Y is a physiological substrate of fibroblast activation protein: Enzyme kinetics in blood plasma and expression of Y2R and Y5R in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.** Vol. 75, Peptides. 2016 Jan;80–95.
295. Xu P, Zhang Y, Wang W, Yuan Q, Liu Z, Rasoul LM, et al. **Long-Term Administration of Fibroblast Growth Factor 21 Prevents Chemically-Induced Hepatocarcinogenesis in Mice.** Vol. 60, Digestive diseases and sciences. 2015 Oct;3032–43.
296. Zi F, He J, He D, Li Y, Yang L, Cai Z. **Fibroblast activation protein  $\alpha$  in tumor microenvironment: Recent progression and implications (Review).** Vol. 11, Molecular Medicine Reports. 2015 May;3203–11.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

297. Fearon DT. **The Carcinoma-Associated Fibroblast Expressing Fibroblast Activation Protein and Escape from Immune Surveillance.** Vol. 2, Cancer Immunology Research. 2014 Mar 1;187–93.
298. Yang X, Lin Y, Shi Y, Li B, Liu W, Yin W, et al. **FAP Promotes Immunosuppression by Cancer-Associated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment via STAT3-CCL2 Signaling.** Vol. 76, Cancer research. 2016 Jul 15;4124–35.
299. Chen L, Qiu X, Wang X, He J. **FAP positive fibroblasts induce immune checkpoint blockade resistance in colorectal cancer via promoting immunosuppression.** Vol. 487, Biochemical and biophysical research communications. 2017 May 20;8–14.
300. Feig C, Jones JO, Kraman M, Wells RJB, Deonaraine A, Chan DS, et al. **Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer.** Vol. 110, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013 Dec 10;20212–7.
301. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. **Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion.** Vol. 121, Cell. 2005 May 6;335–48.
302. Lo A, Wang L-CS, Scholler J, Monslow J, Avery D, Newick K, et al. **Tumor-Promoting Desmoplasia Is Disrupted by Depleting FAP-Expressing Stromal Cells.** Vol. 75, Cancer research. 2015 Jul 15;2800–10.
303. Wu X, Wang Y, Xu J, Luo T, Deng J, Hu Y. **MM-BMSCs induce naïve CD4+ T lymphocytes dysfunction through fibroblast activation protein  $\alpha$ .** Vol. 8, Oncotarget. 2017 Aug 8;52614–28.
304. Zi F-M, He J-S, Li Y, Wu C, Wu W-J, Yang Y, et al. **Fibroblast activation protein protects bortezomib-induced apoptosis in multiple myeloma cells through  $\beta$ -catenin signaling pathway.** Vol. 15, Cancer biology & therapy. 2014 Oct;1413–22.
305. Mhaweche-Fauceglia P, Yan L, Sharifian M, Ren X, Liu S, Kim G, et al. **Stromal Expression of Fibroblast Activation Protein Alpha (FAP) Predicts Platinum Resistance and Shorter Recurrence in patients with Epithelial Ovarian Cancer.** Vol. 8, Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society. 2015 Apr;23–31.



## 7. Bibliografia. Bibliografia

306. Li M, Li M, Yin T, Shi H, Wen Y, Zhang B, et al. **Targeting of cancer-associated fibroblasts enhances the efficacy of cancer chemotherapy by regulating the tumor microenvironment.** Vol. 13, *Molecular medicine reports*. 2016 Mar;2476–84.
307. Poplawski SE, Lai JH, Li Y, Jin Z, Liu Y, Wu W, et al. **Identification of selective and potent inhibitors of fibroblast activation protein and prolyl oligopeptidase.** Vol. 56, *Journal of medicinal chemistry*. 2013 May 9;3467–77.
308. Cunningham CC. **Talabostat.** Vol. 16, *Expert opinion on investigational drugs*. 2007 Sep;1459–65.
309. Eager RM, Cunningham CC, Senzer NN, Stephenson J, Anthony SP, O’Day SJ, et al. **Phase II assessment of talabostat and cisplatin in second-line stage IV melanoma.** Vol. 9, *BMC cancer*. 2009 Jul 30;263.
310. Eager RM, Cunningham CC, Senzer N, Richards DA, Raju RN, Jones B, et al. **Phase II trial of talabostat and docetaxel in advanced non-small cell lung cancer.** Vol. 21, *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*. 2009 Aug;464–72.
311. Narra K, Mullins SR, Lee H-O, Strzemkowski-Brun B, Magalong K, Christiansen VJ, et al. **Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer.** Vol. 6, *Cancer biology & therapy*. 2007 Nov;1691–9.
312. Jackson KW, Christiansen VJ, Yadav VR, Silasi-Mansat R, Lupu F, Awasthi V, et al. **Suppression of tumor growth in mice by rationally designed pseudopeptide inhibitors of fibroblast activation protein and prolyl oligopeptidase.** Vol. 17, *Neoplasia (New York, N.Y.)*. 2015 Jan;43–54.
313. Jansen K, Heirbaut L, Verkerk R, Cheng JD, Joossens J, Cos P, et al. **Extended structure-activity relationship and pharmacokinetic investigation of (4-quinolinoyl)glycyl-2-cyanopyrrolidine inhibitors of fibroblast activation protein (FAP).** Vol. 57, *Journal of medicinal chemistry*. 2014 Apr 10;3053–74.
314. Scott AM, Wiseman G, Welt S, Adjei A, Lee F-T, Hopkins W, et al. **A Phase I dose-escalation study of sibrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer.** Vol. 9, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003 May;1639–47.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

315. Hofheinz R-D, Al-Batran S-E, Hartmann F, Hartung G, Jäger D, Renner C, et al. **Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer.** Vol. 26, *Onkologie*. 2003 Feb;44–8.
316. Zhang J, Valianou M, Simmons H, Robinson MK, Lee H-O, Mullins SR, et al. **Identification of inhibitory scFv antibodies targeting fibroblast activation protein utilizing phage display functional screens.** Vol. 27, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013 Feb;581–9.
317. Hornig N, Kermer V, Frey K, Diebolder P, Kontermann RE, Müller D. **Combination of a bispecific antibody and costimulatory antibody-ligand fusion proteins for targeted cancer immunotherapy.** Vol. 35, *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*. 2012 Jun;418–29.
318. Brünker P, Wartha K, Friess T, Grau-Richards S, Waldhauer I, Koller CF, et al. **RG7386, a Novel Tetravalent FAP-DR5 Antibody, Effectively Triggers FAP-Dependent, Avidity-Driven DR5 Hyperclustering and Tumor Cell Apoptosis.** Vol. 15, *Molecular cancer therapeutics*. 2016 May;946–57.
319. Fischer E, Chaitanya K, Wüest T, Wadle A, Scott AM, van den Broek M, et al. **Radioimmunotherapy of fibroblast activation protein positive tumors by rapidly internalizing antibodies.** Vol. 18, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012 Nov 15;6208–18.
320. LeBeau AM, Brennen WN, Aggarwal S, Denmeade SR. **Targeting the cancer stroma with a fibroblast activation protein-activated promelittin protoxin.** Vol. 8, *Molecular cancer therapeutics*. 2009 May;1378–86.
321. Chen M, Lei X, Shi C, Huang M, Li X, Wu B, et al. **Pericyte-targeting prodrug overcomes tumor resistance to vascular disrupting agents.** Vol. 127, *The Journal of clinical investigation*. 2017 Oct 2;3689–701.
322. Kim M-G, Shon Y, Kim J, Oh Y-K. **Selective Activation of Anticancer Chemotherapy by Cancer-Associated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment.** Vol. 109, *Journal of the National Cancer Institute*. 2017;
323. Deng L-J, Wang L-H, Peng C-K, Li Y-B, Huang M-H, Chen M-F, et al. **Fibroblast Activation Protein  $\alpha$  Activated Tripeptide Bufadienolide Antitumor Prodrug with Reduced Cardiotoxicity.** Vol. 60, *Journal of medicinal chemistry*. 2017 Jul 13;5320–33.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

324. Akinboye ES, Brennen WN, Rosen DM, Bakare O, Denmeade SR. **Iterative design of emetine-based prodrug targeting fibroblast activation protein (FAP) and dipeptidyl peptidase IV DPPIV using a tandem enzymatic activation strategy.** Vol. 76, The Prostate. 2016 Jun;703–14.
325. Brennen WN, Rosen DM, Chaux A, Netto GJ, Isaacs JT, Denmeade SR. **Pharmacokinetics and toxicology of a fibroblast activation protein (FAP)-activated prodrug in murine xenograft models of human cancer.** Vol. 74, The Prostate. 2014 Sep;1308–19.
326. Brennen WN, Rosen DM, Wang H, Isaacs JT, Denmeade SR. **Targeting carcinoma-associated fibroblasts within the tumor stroma with a fibroblast activation protein-activated prodrug.** Vol. 104, Journal of the National Cancer Institute. 2012 Sep 5;1320–34.
327. Huang S, Fang R, Xu J, Qiu S, Zhang H, Du J, et al. **Evaluation of the tumor targeting of a FAP $\alpha$ -based doxorubicin prodrug.** Vol. 19, Journal of drug targeting. 2011 Aug;487–96.
328. Ji T, Zhao Y, Ding Y, Wang J, Zhao R, Lang J, et al. **Transformable Peptide Nanocarriers for Expeditious Drug Release and Effective Cancer Therapy via Cancer-Associated Fibroblast Activation.** Vol. 55, Angewandte Chemie (International ed. in English). 2016 Jan 18;1050–5.
329. Baum P, Müller D, Rüger R, Kontermann RE. **Single-chain Fv immunoliposomes for the targeting of fibroblast activation protein-expressing tumor stromal cells.** Vol. 15, Journal of drug targeting. 2007 Jul;399–406.
330. Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang X-Y. **Therapeutic Cancer Vaccines.** In 2013. p. 421–75.
331. Lee J, Fassnacht M, Nair S, Boczkowski D, Gilboa E. **Tumor immunotherapy targeting fibroblast activation protein, a product expressed in tumor-associated fibroblasts.** Vol. 65, Cancer research. 2005 Dec 1;11156–63.
332. Yi Y-M, Zhang G, Zeng J, Huang S-C, Li L-L, Fang R, et al. **A new tumor vaccine: FAP $\gamma$ -MT elicits effective antitumor response by targeting indolamine2,3-dioxygenase in antigen presenting cells.** Vol. 11, Cancer biology & therapy. 2011 May 15;866–73.
333. Wen Y, Wang C-T, Ma T-T, Li Z-Y, Zhou L-N, Mu B, et al. **Immunotherapy targeting fibroblast activation protein inhibits tumor growth and increases survival in a murine colon cancer model.** Vol. 101, Cancer science. 2010 Nov;2325–32.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

334. Loeffler M, Krüger JA, Niethammer AG, Reisfeld RA. **Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake.** Vol. 116, The Journal of clinical investigation. 2006 Jul;1955–62.
335. Meng M, Wang W, Yan J, Tan J, Liao L, Shi J, et al. **Immunization of stromal cell targeting fibroblast activation protein providing immunotherapy to breast cancer mouse model.** Vol. 37, Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2016 Aug;10317–27.
336. Xia Q, Geng F, Zhang F-F, Liu C-L, Xu P, Lu Z-Z, et al. **Cyclophosphamide enhances anti-tumor effects of a fibroblast activation protein  $\alpha$ -based DNA vaccine in tumor-bearing mice with murine breast carcinoma.** Vol. 39, Immunopharmacology and immunotoxicology. 2017 Feb;37–44.
337. Xia Q, Zhang F-F, Geng F, Liu C-L, Wang Y-Q, Xu P, et al. **Improvement of anti-tumor immunity of fibroblast activation protein  $\alpha$  based vaccines by combination with cyclophosphamide in a murine model of breast cancer.** Vol. 310, Cellular immunology. 2016 Dec;89–98.
338. Xia Q, Geng F, Zhang F-F, Liu C-L, Xu P, Lu Z-Z, et al. **Enhancement of fibroblast activation protein  $\alpha$ -based vaccines and adenovirus boost immunity by cyclophosphamide through inhibiting IL-10 expression in 4T1 tumor bearing mice.** Vol. 34, Vaccine. 2016 Aug 31;4526–35.
339. Jiang G-M, Xie W-Y, Wang H-S, Du J, Wu B-P, Xu W, et al. **Curcumin combined with FAP $\alpha$  vaccine elicits effective antitumor response by targeting indolamine-2,3-dioxygenase and inhibiting EMT induced by TNF- $\alpha$  in melanoma.** Vol. 6, Oncotarget. 2015 Sep 22;25932–42.
340. Kakarla S, Chow KKH, Mata M, Shaffer DR, Song X-T, Wu M-F, et al. **Antitumor effects of chimeric receptor engineered human T cells directed to tumor stroma.** Vol. 21, Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2013 Aug;1611–20.
341. Wang L-CS, Lo A, Scholler J, Sun J, Majumdar RS, Kapoor V, et al. **Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity.** Vol. 2, Cancer immunology research. 2014 Feb;154–66.

## 7. Bibliografía. Bibliografia

342. Schuberth PC, Hagedorn C, Jensen SM, Gulati P, van den Broek M, Mischo A, et al. **Treatment of malignant pleural mesothelioma by fibroblast activation protein-specific re-directed T cells.** Vol. 11, Journal of translational medicine. 2013 Aug 12;187.
343. Xu Y, Lu Y, Song J, Dong B, Kong W, Xue W, et al. **Cancer-associated fibroblasts promote renal cell carcinoma progression.** Vol. 36, Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2015 May;3483–8.
344. Bakhtyar N, Wong N, Kapoor A, Cutz J-C, Hill B, Ghert M, et al. **Clear cell renal cell carcinoma induces fibroblast-mediated production of stromal periostin.** Vol. 49, European Journal of Cancer. 2013 Nov;3537–46.
345. Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. **Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis.** Vol. 14, Nature reviews. Cancer. 2014;430–9.
346. Schito L, Rey S, Tafani M, Zhang H, Wong CC-L, Russo A, et al. **Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells.** Vol. 109, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012 Oct 2;E2707-16.
347. Petrova V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Amelio I. **The hypoxic tumour microenvironment.** Vol. 7, Oncogenesis. 2018 Jan 24;10.
348. Blanco L, Sanz B, Perez I, Sánchez CE, Cándenas ML, Pinto FM, et al. **Altered glutamyl-aminopeptidase activity and expression in renal neoplasms.** Vol. 14, BMC cancer. 2014 May 30;386.
349. Varona A, Blanco L, Perez I, Gil J, Irazusta J, López JI, et al. **Expression and activity profiles of DPP IV/CD26 and NEP/CD10 glycoproteins in the human renal cancer are tumor-type dependent.** Vol. 10, BMC cancer. 2010 May 11;193.
350. Spandidos A, Wang X, Wang H, Seed B. **PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification.** Vol. 38, Nucleic Acids Research. 2010 Jan;D792–9.
351. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. **Primer3—new capabilities and interfaces.** Vol. 40, Nucleic Acids Research. 2012 Aug;e115–e115.
352. Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method.** Vol. 25, Methods. 2001 Dec;402–8.

## 7. Bibliografía. Bibliografia

353. Florentin D, Sassi A, Roques BP. **A highly sensitive fluorometric assay for "enkephalinase," a neutral metalloendopeptidase that releases tyrosine-glycine-glycine from enkephalins.** Vol. 141, Analytical biochemistry. 1984 Aug 15;62–9.
354. Tobe H, Kojima F, Aoyagi T, Umezawa H. **Purification by affinity chromatography using amastatin and properties of aminopeptidase A from pig kidney.** Vol. 613, Biochimica et biophysica acta. 1980 Jun 13;459–68.
355. Sentandreu MA, Toldrá F. **A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity.** Vol. 1, Nature protocols. 2006;2423–7.
356. Yan Z-H, Ren K-J, Wang Y, Chen S, Brock TA, Rege AA. **Development of intramolecularly quenched fluorescent peptides as substrates of angiotensin-converting enzyme 2.** Vol. 312, Analytical biochemistry. 2003 Jan 15;141–7.
357. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** Vol. 150, Analytical Biochemistry. 1985 Oct;76–85.
358. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Vol. 76, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1979 Sep;4350–4.
359. Zhong Y, Chen EY, Liu R, Chuang PY, Mallipattu SK, Tan CM, et al. **Renoprotective Effect of Combined Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme and Histone Deacetylase.** Vol. 24, Journal of the American Society of Nephrology. 2013 May 1;801–11.
360. Verhoest G, Dolley-Hitze T, Jouan F, Belaud-Rotureau M-A, Oger E, Lavenu A, et al. **Sunitinib Combined with Angiotensin-2 Type-1 Receptor Antagonists Induces More Necrosis: A Murine Xenograft Model of Renal Cell Carcinoma.** Vol. 2014, BioMed Research International. 2014;1–9.
361. Sorich MJ, Kichenadasse G, Rowland A, Woodman RJ, Mangoni AA. **Angiotensin system inhibitors and survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with VEGF-targeted therapy: A pooled secondary analysis of clinical trials.** Vol. 138, International Journal of Cancer. 2016 May 1;2293–9.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

362. Huillard O, Xylinas E, Peyromaure M, Alexandre J, Goldwasser F. **Angiotensin System Inhibitors in Renal Cell Carcinoma--Letter**. Vol. 22, *Clinical Cancer Research*. 2016 Jan 15;524–524.
363. Ager EI, Neo J, Christophi C. **The renin-angiotensin system and malignancy**. Vol. 29, *Carcinogenesis*. 2008 Jun 9;1675–84.
364. Chow BSM, Allen TJ. **Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in renal and cardiovascular disease**. Vol. 130, *Clinical science (London, England : 1979)*. 2016 Aug 1;1307–26.
365. Chuang H-Y, Jiang J-K, Yang M-H, Wang H-W, Li M-C, Tsai C-Y, et al. **Aminopeptidase A initiates tumorigenesis and enhances tumor cell stemness via TWIST1 upregulation in colorectal cancer**. Vol. 8, *Oncotarget*. 2017 Mar 28;21266–80.
366. Fujimura H, Ino K, Nagasaka T, Nakashima N, Nakazato H, Kikkawa F, et al. **Aminopeptidase A expression in cervical neoplasia and its relationship to neoplastic transformation and progression**. Vol. 58, *Oncology*. 2000 May;342–52.
367. Carey RM. **Update on angiotensin AT2 receptors**. Vol. 26, *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2017 Mar;91–6.
368. Kemp BA, Bell JF, Rottkamp DM, Howell NL, Shao W, Navar LG, et al. **Intrarenal angiotensin III is the predominant agonist for proximal tubule angiotensin type 2 receptors**. Vol. 60, *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2012 Aug;387–95.
369. Ishiguro S, Yoshimura K, Tsunedomi R, Oka M, Takao S, Inui M, et al. **Involvement of angiotensin II type 2 receptor (AT2R) signaling in human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): a novel AT2R agonist effectively attenuates growth of PDAC grafts in mice**. Vol. 16, *Cancer Biology & Therapy*. 2015 Feb 10;307–16.
370. Li J, Luo J, Gu D, Jie F, Pei N, Li A, et al. **Adenovirus-Mediated Angiotensin II Type 2 Receptor Overexpression Inhibits Tumor Growth of Prostate Cancer In Vivo**. Vol. 7, *Journal of Cancer*. 2016;184–91.
371. Du H, Liang Z, Zhang Y, Jie F, Li J, Fei Y, et al. **Effects of angiotensin II type 2 receptor overexpression on the growth of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo**. Vol. 8, *PloS one*. 2013;e83754.
372. Koulis C, Chow BSM, McKelvey M, Steckelings UM, Unger T, Thallas-Bonke V, et al. **AT2R agonist, compound 21, is reno-protective against type 1 diabetic nephropathy**. Vol. 65, *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2015 May;1073–81.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

373. Steckelings U, Lindblad L, Leisvuori A, Lovro Z, Vainio P, Graens J, et al. **Successful completion of a phase I, randomized, double-blind, placebo controlled, single ascending dose trial for the first in class angiotensin AT2-receptor agonist compound 21.** Vol. 35, Journal of Hypertension. 2017 Sep;e105–6.
374. Chatterjee PK, Weerackody RP, Mistry SK, Hawksworth GM, McLay JS. **Selective antagonism of the AT1 receptor inhibits angiotensin II stimulated DNA and protein synthesis in primary cultures of human proximal tubular cells.** Vol. 52, Kidney international. 1997 Sep;699–705.
375. Cao Z, Kelly DJ, Cox A, Casley D, Forbes JM, Martinello P, et al. **Angiotensin type 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis.** Vol. 58, Kidney international. 2000 Dec;2437–51.
376. Hinsley EE, de Oliveira CE, Hunt S, Coletta RD, Lambert DW. **Angiotensin 1-7 inhibits angiotensin II-stimulated head and neck cancer progression.** Vol. 125, European Journal of Oral Sciences. 2017 Aug;247–57.
377. Pinheiro SVB, Simões e Silva AC. **Angiotensin Converting Enzyme 2, Angiotensin-(1-7), and Receptor Mas Axis in the Kidney.** Vol. 2012, International Journal of Hypertension. 2012;1–8.
378. Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Röcken C. **Ectopeptidases in tumour biology: a review.** Vol. 21, Histology and histopathology. 2006;1339–53.
379. Gonzalez-Villalobos RA, Shen XZ, Bernstein EA, Janjulia T, Taylor B, Giani JF, et al. **Rediscovering ACE: novel insights into the many roles of the angiotensin-converting enzyme.** Vol. 91, Journal of Molecular Medicine. 2013 Oct 18;1143–54.
380. Escudier B, Szczylik C, Porta C, Gore M. **Treatment selection in metastatic renal cell carcinoma: expert consensus.** Vol. 9, Nature reviews. Clinical oncology. 2012 Apr 10;327–37.
381. Mamdani H, Ahmed S, Armstrong S, Mok T, Jalal SI. **Blood-based tumor biomarkers in lung cancer for detection and treatment.** Vol. 6, Translational Lung Cancer Research. 2017 Dec;648–60.
382. Mizuno R, Kimura G, Fukasawa S, Ueda T, Kondo T, Hara H, et al. **Angiogenic, inflammatory and immunologic markers in predicting response to sunitinib in metastatic renal cell carcinoma.** Vol. 108, Cancer science. 2017 Sep;1858–63.



## 7. Bibliografía. Bibliografia

383. Pezaro C, Woo HH, Davis ID. **Prostate cancer: measuring PSA**. Vol. 44, Internal Medicine Journal. 2014 May;433–40.
384. Blanco L, Perez I, Sanz B, Gil J, López JI, Ugalde A, et al. **Changes in cell-surface peptidase activity in papillary renal cell carcinoma**. Vol. 30, Anticancer research. 2010 Apr;1137–41.
385. Larrinaga G, Blanco L, Sanz B, Perez I, Gil J, Unda M, et al. **The impact of peptidase activity on clear cell renal cell carcinoma survival**. Vol. 303, American journal of physiology. Renal physiology. 2012 Dec 15;F1584-91.
386. Ehlers MRW, Gordon K, Schwager SLU, Sturrock ED. **Shedding the load of hypertension: the proteolytic processing of angiotensin-converting enzyme**. Vol. 102, South African medical journal Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde. 2012 Mar 2;461–4.
387. Xiao F, Zimpelmann J, Burger D, Kennedy C, Hébert RL, Burns KD. **Protein Kinase C- $\delta$  Mediates Shedding of Angiotensin-Converting Enzyme 2 from Proximal Tubular Cells**. Vol. 7, Frontiers in pharmacology. 2016;146.
388. Bar J, Ding K, Zhao H, Han L, Laurie SA, Seymour L, et al. **Angiotensin-Converting Enzyme and Aldosterone Serum Levels as Prognostic and Predictive Biomarkers for Cediranib in NCIC Clinical Trials Group Study BR.24**. Vol. 16, Clinical lung cancer. 2015 Nov;e189-201.
389. Ramírez-Expósito MJ, Carrera-González M del P, Mayas MD, Dueñas B, Martínez-Ferrol J, Martínez-Martos JM. **Neoadjuvant chemotherapy modifies serum angiotensinase activities in women with breast cancer**. Vol. 72, Maturitas. 2012 May;79–83.
390. Larrinaga G, Perez I, Blanco L, Sanz B, Errarte P, Beitia M, et al. **Prolyl endopeptidase activity is correlated with colorectal cancer prognosis**. Vol. 11, International Journal of Medical Sciences. 2014;
391. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. **On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients**. Vol. 58, Cancer immunology, immunotherapy : CII. 2009 Nov;1723–47.
392. Pang L, Zhang N, Xia Y, Wang D, Wang G, Meng X. **Serum APN/CD13 as a novel diagnostic and prognostic biomarker of pancreatic cancer**. Vol. 7, Oncotarget. 2016 Nov 22;77854–64.
393. Larrinaga G, Perez I, Blanco L, Sanz B, Errarte P, Beitia M, et al. **Prolyl endopeptidase activity is correlated with colorectal cancer prognosis**. Vol. 11, International journal of medical sciences. 2014;199–208.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

394. Kälin M, Cima I, Schiess R, Fankhauser N, Powles T, Wild P, et al. **Novel prognostic markers in the serum of patients with castration-resistant prostate cancer derived from quantitative analysis of the pten conditional knockout mouse proteome.** Vol. 60, *European urology*. 2011 Dec;1235–43.
395. Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Fujiwara R, Kitayoshi M, Tanabe E, et al. **Serum CD10 is associated with liver metastasis in colorectal cancer.** Vol. 192, *The Journal of surgical research*. 2014 Dec;390–4.
396. Lieberman J. **Elevation of serum angiotensin-converting-enzyme (ACE) level in sarcoidosis.** Vol. 59, *The American journal of medicine*. 1975 Sep;365–72.
397. Sevenich L, Joyce JA. **Pericellular proteolysis in cancer.** Vol. 28, *Genes & Development*. 2014 Nov 1;2331–47.
398. Stokes GS, Monaghan JC, Schrader AP, Glenn CL, Ryan M, Morris BJ. **Influence of angiotensin converting enzyme (ACE) genotype on interpretation of diagnostic tests for serum ACE activity.** Vol. 29, *Australian and New Zealand journal of medicine*. 1999 Jun;315–8.
399. Tannir N, Hammers H, Amin A. **First-line vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma: priming the tumor microenvironment for immunotherapy.** *Current medical research and opinion*. 2018 Jan 3;1–15.
400. Baird SK, Allan L, Renner C, Scott FE, Scott AM. **Fibroblast activation protein increases metastatic potential of fibrosarcoma line HT1080 through upregulation of integrin-mediated signaling pathways.** Vol. 32, *Clinical & experimental metastasis*. 2015 Jun;507–16.
401. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, et al. **Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†.** Vol. 27, *Annals of Oncology*. 2016 Sep;v58–68.
402. Dabestani S, Thorstenson A, Lindblad P, Harmenberg U, Ljungberg B, Lundstam S. **Renal cell carcinoma recurrences and metastases in primary non-metastatic patients: a population-based study.** Vol. 34, *World journal of urology*. 2016 Aug;1081–6.
403. Volpe A, Patard JJ. **Prognostic factors in renal cell carcinoma.** Vol. 28, *World journal of urology*. 2010 Jun;319–27.
404. Semeniuk-Wojtaś A, Stec R, Szczylik C. **Are primary renal cell carcinoma and metastases of renal cell carcinoma the same cancer?** Vol. 34, *Urologic oncology*. 2016 May;215–20.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

405. Duda DG, Duyverman AMMJ, Kohno M, Snuderl M, Steller EJA, Fukumura D, et al. **Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil.** Vol. 107, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010 Dec 14;21677–82.
406. Gaggioli C. **Collective invasion of carcinoma cells: when the fibroblasts take the lead.** Vol. 2, Cell adhesion & migration. :45–7.
407. Ao Z, Shah SH, Machlin LM, Parajuli R, Miller PC, Rawal S, et al. **Identification of cancer-associated fibroblasts in circulating blood from patients with metastatic breast cancer.** Vol. 75, Cancer Research. 2015;4681–7.
408. Albregues J, Meneguzzi G, Gaggioli C. **Analysis of collective invasion of carcinoma cells in a 3D organotypic model.** Vol. 961, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2013;243–52.
409. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP. **Cancer-Associated Fibroblasts Drive the Progression of Metastasis through both Paracrine and Mechanical Pressure on Cancer Tissue.** Vol. 10, Molecular Cancer Research. 2012 Nov 1;1403–18.
410. Wikberg ML, Edin S, Lundberg I V, Van Guelpen B, Dahlin AM, Rutegård J, et al. **High intratumoral expression of fibroblast activation protein (FAP) in colon cancer is associated with poorer patient prognosis.** Vol. 34, Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2013 Apr;1013–20.
411. Kwak C, Park YH, Jeong CW, Jeong H, Lee SE, Ku JH. **Characteristics of metastasis as a prognostic factor for immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma.** Vol. 93, Tumori. :68–74.
412. Leibovich BC, Chevillet JC, Lohse CM, Zincke H, Frank I, Kwon ED, et al. **A scoring algorithm to predict survival for patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials.** Vol. 174, The Journal of Urology. 2005 Nov;1759–63.
413. Escudier B, Choueiri TK, Oudard S, Szczylik C, Négrier S, Ravaud A, et al. **Prognostic Factors of Metastatic Renal Cell Carcinoma After Failure of Immunotherapy: New Paradigm From a Large Phase III Trial With Shark Cartilage Extract AE 941.** Vol. 178, The Journal of Urology. 2007 Nov;1901–5.
414. Kroeger N, Pantuck AJ, Wells JC, Lawrence N, Broom R, Kim JJ, et al. **Characterizing the impact of lymph node metastases on the survival outcome for metastatic renal cell carcinoma patients treated with targeted therapies.** Vol. 68, European urology. 2015 Sep;506–15.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

415. Capitanio U, Leibovich BC. **The rationale and the role of lymph node dissection in renal cell carcinoma.** Vol. 35, World journal of urology. 2017 Apr;497–506.
416. Tilki D, Chandrasekar T, Capitanio U, Ciancio G, Daneshmand S, Gontero P, et al. **Impact of lymph node dissection at the time of radical nephrectomy with tumor thrombectomy on oncological outcomes: Results from the International Renal Cell Carcinoma-Venous Thrombus Consortium (IRCC-VTC).** Urologic oncology. 2017 Nov 9;
417. Montel V, Mose ES, Tarin D. **Tumor-stromal interactions reciprocally modulate gene expression patterns during carcinogenesis and metastasis.** Vol. 119, International journal of cancer. 2006 Jul 15;251–63.
418. Ota D, Kanayama M, Matsui Y, Ito K, Maeda N, Kutomi G, et al. **Tumor- $\alpha 9\beta 1$  integrin-mediated signaling induces breast cancer growth and lymphatic metastasis via the recruitment of cancer-associated fibroblasts.** Vol. 92, Journal of molecular medicine (Berlin, Germany). 2014 Dec;1271–81.
419. Yang X-Y, Zhang D, Zou Q-F, Fan F, Shen F. **Association of tumor-associated fibroblasts with progression of hepatocellular carcinoma.** Vol. 30, Medical oncology (Northwood, London, England). 2013;593.
420. Lin X-D, Chen S-Q, Qi Y-L, Zhu J-W, Tang Y, Lin J-Y. **Overexpression of thrombospondin-1 in stromal myofibroblasts is associated with tumor growth and nodal metastasis in gastric carcinoma.** Vol. 106, Journal of surgical oncology. 2012 Jul 1;94–100.
421. Rozenchan PB, Pasini FS, Roela RA, Katayama MLH, Mundim FGL, Brentani H, et al. **Specific upregulation of RHOA and RAC1 in cancer-associated fibroblasts found at primary tumor and lymph node metastatic sites in breast cancer.** Vol. 36, Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2015 Dec;9589–97.
422. Liang P, Hong J-W, Ubukata H, Liu G, Katano M, Motohashi G, et al. **Myofibroblasts correlate with lymphatic microvessel density and lymph node metastasis in early-stage invasive colorectal carcinoma.** Vol. 25, Anticancer research. :2705–12.
423. Shuch B, Bratslavsky G, Linehan WM, Srinivasan R. **Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma: A Comprehensive Review of the Biology and Current Treatment Strategies.** Vol. 17, The Oncologist. 2012 Jan 1;46–54.

## 7. Bibliografia. Bibliografía

424. Yan Y, Liu L, Zhou J, Li L, Li Y, Chen M, et al. **Clinicopathologic characteristics and prognostic factors of sarcomatoid renal cell carcinoma.** Vol. 141, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2015 Feb 2;345–52.
425. Kyriakopoulos CE, Chittoria N, Choueiri TK, Kroeger N, Lee J-L, Srinivas S, et al. **Outcome of patients with metastatic sarcomatoid renal cell carcinoma: results from the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium.** Vol. 13, Clinical genitourinary cancer. 2015 Apr;e79-85.
426. Shuch B, Said J, LaRochelle JC, Zhou Y, Li G, Klatte T, et al. **Histologic evaluation of metastases in renal cell carcinoma with sarcomatoid transformation and its implications for systemic therapy.** Vol. 116, Cancer. 2010 Feb 1;616–24.
427. Boström A-K, 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.** Vol. 43, Human pathology. 2012 May;708–19.
428. Wu X, Tao P, Zhou Q, Li J, Yu Z, Wang X, et al. **IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway.** Vol. 8, Oncotarget. 2017 Mar 28;20741–50.
429. Yi Y, Zeng S, Wang Z, Wu M, Ma Y, Ye X, et al. **Cancer-associated fibroblasts promote epithelial-mesenchymal transition and EGFR-TKI resistance of non-small cell lung cancers via HGF/IGF-1/ANXA2 signaling.** Vol. 1864, Biochimica et biophysica acta. 2017 Dec 16;793–803.
430. Sun Y, Fan X, Zhang Q, Shi X, Xu G, Zou C. **Cancer-associated fibroblasts secrete FGF-1 to promote ovarian proliferation, migration, and invasion through the activation of FGF-1/FGFR4 signaling.** Vol. 39, Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2017 Jul;1010428317712592.
431. Pistore C, Giannoni E, Colangelo T, Rizzo F, Magnani E, Muccillo L, et al. **DNA methylation variations are required for epithelial-to-mesenchymal transition induced by cancer-associated fibroblasts in prostate cancer cells.** Vol. 36, Oncogene. 2017 Oct 5;5551–66.
432. Zhou B, Chen W-L, Wang Y-Y, Lin Z-Y, Zhang D-M, Fan S, et al. **A role for cancer-associated fibroblasts in inducing the epithelial-to-mesenchymal transition in human tongue squamous cell carcinoma.** Vol. 43, Journal of oral pathology & medicine: official publication of International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2014 Sep;585–92.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

433. Steinestel K, Eder S, Schrader A, Steinestel J. **Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition.** Vol. 3, Clinical and Translational Medicine. 2014;17.
434. Richardson AM, Havel LS, Koyen AE, Konen JM, Shupe J, Wiles WG, et al. **Vimentin Is Required for Lung Adenocarcinoma Metastasis via Heterotypic Tumor Cell–Cancer-Associated Fibroblast Interactions during Collective Invasion.** Clinical Cancer Research. 2017 Dec 5;
435. Mundim FGL, Pasini FS, Nonogaki S, Rocha RM, Soares FA, Brentani MM, et al. **Breast Carcinoma–associated Fibroblasts Share Similar Biomarker Profiles in Matched Lymph Node Metastasis.** Vol. 24, Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. 2016;712–20.
436. Proskuryakov SY, Gabai VL. **Mechanisms of tumor cell necrosis.** Vol. 16, Current pharmaceutical design. 2010 Jan;56–68.
437. Beddy P, Genega EM, Ngo L, Hindman N, Wei J, Bullock A, et al. **Tumor Necrosis on Magnetic Resonance Imaging Correlates With Aggressive Histology and Disease Progression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma.** Vol. 12, Clinical Genitourinary Cancer. 2014 Feb;55–62.
438. Renshaw AA, Cheville JC. **Quantitative tumour necrosis is an independent predictor of overall survival in clear cell renal cell carcinoma.** Vol. 47, Pathology. 2015 Jan;34–7.
439. Qian C-N, Huang D, Wondergem B, Teh BT. **Complexity of tumor vasculature in clear cell renal cell carcinoma.** Vol. 115, Cancer. 2009 May 15;2282–9.
440. Yang W, Han W, Ye S, Liu D, Wu J, Liu H, et al. **Fibroblast activation protein- $\alpha$  promotes ovarian cancer cell proliferation and invasion via extracellular and intracellular signaling mechanisms.** Vol. 95, Experimental and molecular pathology. 2013 Aug;105–10.
441. Kelly T, Huang Y, Simms AE, Mazur A. **Fibroblast Activation Protein- $\alpha$ .** In 2012. p. 83–116.
442. Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, Jones JO, et al. **Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha.** Vol. 330, Science (New York, N.Y.). 2010 Nov 5;827–30.
443. Herrmann D, Conway JRW, Vennin C, Magenau A, Hughes WE, Morton JP, et al. **Three-dimensional cancer models mimic cell-matrix interactions in the tumour microenvironment.** Vol. 35, Carcinogenesis. 2014 Aug;1671–9.

## 7. Bibliografia. Bibliografia

444. Mazur A, Holthoff E, Vadali S, Kelly T, Post SR. **Cleavage of Type I Collagen by Fibroblast Activation Protein- $\alpha$  Enhances Class A Scavenger Receptor Mediated Macrophage Adhesion.** Vol. 11, PloS one. 2016;e0150287.
445. Imamura T, Iguchi H, Manabe T, Ohshio G, Yoshimura T, Wang ZH, et al. **Quantitative analysis of collagen and collagen subtypes I, III, and V in human pancreatic cancer, tumor-associated chronic pancreatitis, and alcoholic chronic pancreatitis.** Vol. 11, Pancreas. 1995 Nov;357–64.
446. Zou X, Feng B, Dong T, Yan G, Tan B, Shen H, et al. **Up-regulation of type I collagen during tumorigenesis of colorectal cancer revealed by quantitative proteomic analysis.** Vol. 94, Journal of proteomics. 2013 Dec 6;473–85.
447. Prakash J. **Cancer-Associated Fibroblasts: Perspectives in Cancer Therapy.** Vol. 2, Trends in Cancer. 2016 Jun;277–9.
448. O'Brien P, O'Connor BF. **Seprase: An overview of an important matrix serine protease.** Vol. 1784, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2008 Sep;1130–45.

## **8. ANEXOS. Eranskinak**





## **8. Anexos.** Eranskinak

Los resultados obtenidos a partir de las dos líneas de investigación que componen esta tesis doctoral han dado lugar a la publicación de 3 artículos en revistas científicas internacionales de impacto (todas ellas situadas en el primer cuartil de su respectivo área). El estudio del rol de FAP $\alpha$  en el CCRCC nos ha permitido publicar 2 artículos. La primera en la revista *Human Pathology* en marzo de 2016 y el segundo en la revista *Plos One* en diciembre del mismo año. A su vez, con los resultados del estudio del sistema renina-angiotensina intrarrenal se publicó un artículo en *Plos One* en agosto del 2017. Los artículos citados se anexan como información complementaria.