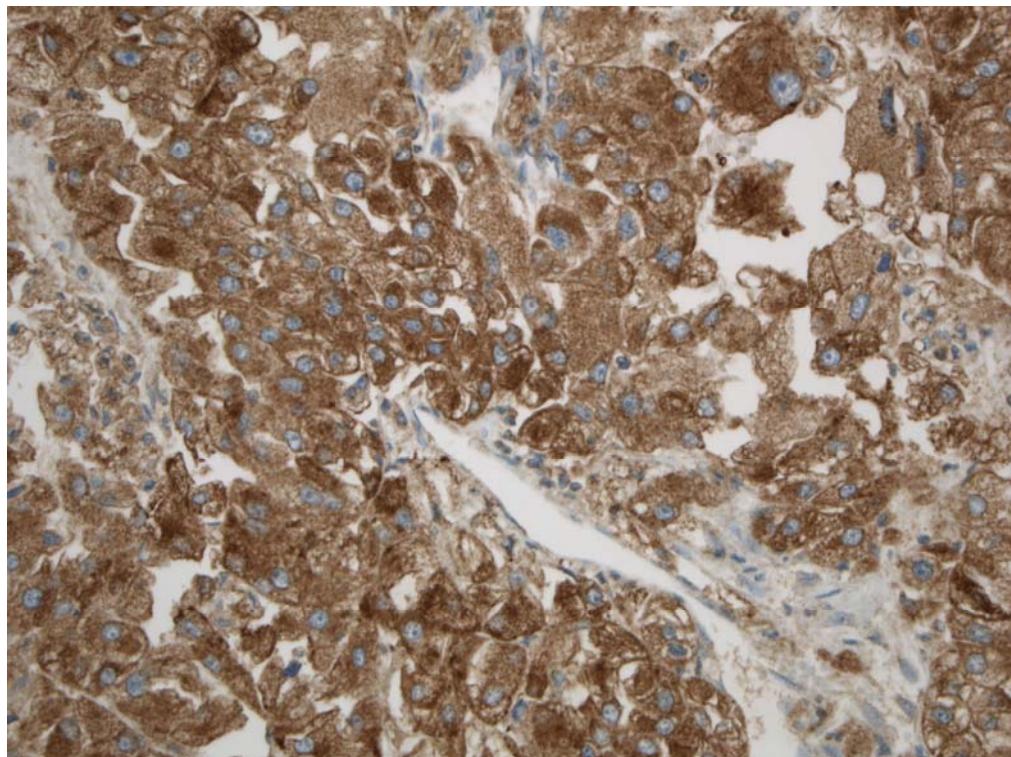


# TRABAJO FIN DE MASTER

*“Evaluación de la expresión y correlación de HLA-G y sHLA-G como factores pronósticos en el carcinoma renal”*



---

*Master en Iniciación a la Investigación en Medicina (Facultad de Medicina de Zaragoza).*

ALBERTO RODRIGO CÁCERES

## **INDICE**

### **1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**

1.1. Antecedentes

1.2. Objetivos del estudio

### **2. INTRODUCCIÓN**

2.1. Carcinoma renal

2.1.1. Epidemiología

2.1.2. Factores de riesgo

2.1.3. Tipos histológicos y factores pronósticos

2.2. Molécula de HLA-G

2.3. HLA-G y carcinoma renal

2.3.1. Expresión de HLA-G en el carcinoma renal

2.3.2. Mecanismos moleculares de la regulación de HLA-G

2.3.3. Alteraciones en la estructura del HLA-G: polimorfismos del HLA-G en el carcinoma renal

2.3.4. Efecto de la expresión de HLA-G en la respuesta inmune en el carcinoma renal

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

3.1. Material

3.1.1. Pacientes

3.1.1.1. Universo poblacional

3.1.1.2. Criterios de inclusión y exclusión. Universo muestral

3.1.1.3. Muestras

3.1.2. Material para estudio inmunohistoquímico

3.1.2.1. Anticuerpos

3.1.2.2. Otros materiales

3.1.3. Material para estudio ELISA

3.2. Métodos

3.2.1. Recogida de datos y Estadaje de los pacientes

3.2.2. Procesado de las muestras

3.2.2.1. Inmunohistoquímica

3.3. Marcadores inmunohistoquímicos y carcinoma renal

3.3.1.Utilidades de los marcadores inmunohistoquímicos

3.3.2.Tipos de marcadores inmunohistoquímicos

3.3.2.1. Citoqueratinas

3.3.2.2. Vimentina

3.3.2.3. Ki67

3.3.2.4. HLA-G

3.3.2.5. ELISA

## 4. RESULTADOS

4.1. Descripción de la muestra

4.1.1. Edad y sexo

4.1.2. Estadio tumoral

4.1.3. Metástasis al diagnóstico y localización

4.1.4. Progresión de la enfermedad y localización

4.1.5. Subtipo histológico

4.1.6. Exitus

4.2. Resultados de inmunohistoquímica según subtipo histológico

4.2.1. HLA-G

4.2.2. Expresión de citoqueratinas

4.2.2.1. Pancyto

4.2.2.2. HMW

4.2.3. Expresión de Vimentina

4.2.4. Expresión de Ki67

4.3. Resultados séricos

4.4. Análisis de datos

## 5. DISCUSIÓN

## 6. CONCLUSIÓN

## ANEXO I

## 7. BIBLIOGRAFÍA

## 1.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

### 1.1.- ANTECEDENTES

El antígeno leucocitario humano G (HLA-G) presenta un amplio espectro de funciones immunosupresoras, jugando un papel importante en la tolerancia materno-fetal y en la aceptación de los aloinjertos en los pacientes transplantados como consecuencia de sus propiedades tolerogénicas<sup>1-2</sup>.

Asimismo, se ha encontrado expresión de HLA-G tanto en tumores sólidos<sup>3-5</sup> como en desórdenes linfoproliferativos<sup>6-7</sup>, asociándose esta expresión a una disminución o pérdida de las respuestas inmunes mediadas por células NK y T, y a menudo a un aumento de la tumorogenicidad.

En cuanto a sHLA-G, ha sido también detectado en el plasma de pacientes con diferentes tipos de enfermedades malignas<sup>7</sup>. En cáncer renal, la expresión de HLA-G se ha detectado tanto en lesiones tumorales como en líneas celulares de cáncer renal, y se ha visto como los niveles plasmáticos de sHLA-G son mayores en los pacientes con CCR respecto a los controles sanos<sup>4-8</sup>.

### 1.2.- OBJETIVOS DEL ESTUDIO

- Determinar la presencia de expresión de HLA-G en lesiones de cáncer renal.
- Determinar los niveles de sHLA-G en suero de pacientes con cáncer renal y controles sanos.
- Determinar si existe correlación entre los niveles de expresión de sHLA-G en suero y diferentes parámetros clínicos (sexo, edad, PS, localización tumoral, clasificación TNM, subtipos histológicos, grado nuclear), y su valor pronóstico.
- Determinar si existe correlación entre la expresión de HLA-G en lesiones de cáncer renal y los niveles de expresión de sHLA-G en suero en pacientes con cáncer renal.

## 2.- INTRODUCCIÓN

### 2.1.- CARCINOMA RENAL

#### 2.1.1 Epidemiología

El carcinoma renal supone un 3% de todos los tumores sólidos, y es el responsable de un 2% de las muertes por cáncer. A nivel mundial, afecta anualmente a más de 150.000 personas y produce unas 78.000 muertes por año. En los últimos 30 años, la incidencia de carcinoma renal ha presentado un progresivo y significativo aumento (2-4% anual), con un incremento del 43% desde el año 1973 <sup>22-24</sup>. Este incremento ha sido mayor en las áreas geográficas desarrolladas y más marcado entre la población negra americana, que ha sobrepasado a la blanca en las tasas de incidencia <sup>22</sup>. La generalización de las pruebas de imagen abdominales, que condicionan un elevado número de diagnósticos como hallazgo radiológico casual, explica en parte este aumento de la incidencia.

En cuanto a la edad más habitual del diagnóstico, se sitúa entre los 50 y los 70 años, con una relación hombre-mujer de 1.6:1 <sup>24</sup>. Se estima que en el momento del diagnóstico hasta un 25% de los casos de cáncer renal se presentan como enfermedad avanzada, debido a que en la gran mayoría de los casos la enfermedad es asintomática, pudiendo presentar un gran crecimiento en el retroperitoneo o diseminación metastásica y una aparición tardía de los síntomas. Así pues, la tríada clásica hematuria, dolor y masa abdominal, indica generalmente la presencia de enfermedad avanzada. Por otra parte, de los pacientes sometidos a resección por enfermedad localizada, un 33% presentarán una recurrencia <sup>25, 26</sup>. La supervivencia estimada en Europa para

esta neoplasia a los 5 años es del 56% para hombres y del 61% para las mujeres, siendo la mediana de supervivencia de 13 meses para la enfermedad metastásica <sup>27</sup>.

### **2.1.2 Factores de riesgo**

Se han asociado múltiples factores de riesgo a la aparición de carcinoma renal <sup>25, 26</sup>, con el consumo de cigarrillos y la obesidad como los dos factores más consistentemente establecidos. De esta forma, fumar incrementa un 38% el riesgo de padecer un carcinoma renal con respecto a las personas no fumadoras, siendo el riesgo mayor en los varones fumadores (54%) que en las mujeres fumadoras (22%). Existe además una relación dosis-dependiente, con aproximadamente el doble de riesgo en las personas que fuman más de 20 cigarrillos diarios y, aunque el abandono del hábito tabáquico reduce el riesgo, no se llegan a alcanzar los valores de la población no fumadora. En el caso de la obesidad, el riesgo es mayor en las mujeres, con un incremento aproximado de un 7% por cada 3 kg de sobrepeso.

La hipertensión, parece tener también influencia en el desarrollo del carcinoma renal, a pesar de desconocerse el mecanismo exacto. Otro factor de riesgo postulado durante años es el uso crónico de altas dosis de analgésicos, aunque hasta el momento no ha sido ligado convincentemente con el desarrollo del carcinoma renal. Ocurre lo mismo en el caso de otras exposiciones, como al asbesto, gasolina o tricloroetileno. El consumo de frutas y verduras parece ejercer un efecto protector para la aparición de carcinoma renal, si bien no se

ha encontrado todavía un componente específico de las mismas como responsable. Así pues, son precisos estudios epidemiológicos para establecer causas ligadas a la aparición del carcinoma renal <sup>26</sup>.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que hasta un 4% de los tumores renales se asocian a un síndrome hereditario. En estos casos su aparición suele ser a edades más tempranas y es más probable que sea bilateral o múltiple. Estos síndromes se acompañan además de alteraciones características en otros órganos, lo cual facilita su diagnóstico, y tienen de forma mayoritaria una herencia autosómica dominante <sup>25</sup>. En las dos últimas décadas, los estudios de familias con carcinoma de células renales heredado han sentado las bases para la identificación de varios síndromes hereditarios de cáncer renal y se han identificado los genes de los síndromes mejor caracterizados: Síndrome de von Hippel-Lindau (gen VHL), Carcinoma Papilar Renal Hereditario (gen c-met), Leiomiomatosis Hereditaria-Cáncer Renal (gen FH), Síndrome de Birt-Hogg-Dubé (gen BHD), y Complejo de la Esclerosis Tuberosa (genes TSC1 y TSC2) <sup>23-27</sup>. La naturaleza enormemente diversa de los genes causales implica a una gran variedad de mecanismos y vías biológicas en la tumorogénesis del cáncer renal <sup>28</sup>.

### **2.1.3 Tipos histológicos y factores pronósticos**

El carcinoma renal engloba a un grupo heterogéneo de neoplasias, existiendo diferentes formas histológicas: el carcinoma de células claras (también denominado hipernefroma o tumor de Grawitz) representa hasta el 75% de los

casos, el carcinoma papilar (tipo 1 y tipo 2) representa alrededor del 15%, el cromófobo supone un 5%, y el carcinoma de ductos colectores (de Bellini) representa un 1%. Se han descrito también otros tipos histológicos poco frecuentes como sarcomas, linfomas y tumores carcinoides. Cada tipo histológico tiene una evolución y agresividad diferente, con diferentes genes implicados en su etiología y desarrollo <sup>25, 26</sup>.

Se han establecido una serie de factores pronósticos para los diferentes subgrupos de pacientes (localizados, metastásicos) que nos permiten predecir la evolución de la enfermedad y sus posibles complicaciones. Podemos diferenciar tres categorías de factores pronósticos:

1.- Relacionados con el tumor: estadio (el más importante, determinado mediante la clasificación de Robson o mediante la clasificación TNM), grado nuclear de Führman, y subtipo histológico. Tamaño tumoral, necrosis histológica y rasgos sarcomatoideos son también otros factores, aunque con una relación menos clara.

2.- Relacionados con el paciente: estado general o *Performance Status* (el más importante), asintomático *versus* síntomas locales *versus* síntomas sistémicos, intervalo libre de metástasis, pérdida ponderal significativa, presencia de síndrome paraneoplásico, nefrectomía previa.

3.- Valores analíticos: anemia, trombocitosis, hipercalcemia, niveles elevados de LDH <sup>26</sup>. En los últimos años, la neutrofilia se ha postulado también como un nuevo factor pronóstico, en sustitución de los valores elevados de LDH <sup>29</sup>.

Se han validado diferentes algoritmos pronósticos y predictivos que incorporan estos factores y que nos ayudan tanto en la estimación del pronóstico, más allá del estadio tumoral, como en la toma de decisiones. Entre estos algoritmos destacan el del Memorial Sloan Kettering Cancer Center o Clasificación de Motzer, aplicado al estadio IV<sup>30</sup>, así como los de UCLA y la Clínica Mayo<sup>31</sup>

## 2.2.- MOLÉCULA HLA-G

El antígeno leucocitario humano G (HLA-G) pertenece a la familia de los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) clase I no clásicos. A diferencia de las moléculas HLA clase I clásicas, HLA-G presenta un reducido polimorfismo de 27 alelos que se expresan y 1 alelo que no se transcribe<sup>40-42</sup>. Se diferencia además de las moléculas HLA clase I clásicas por su distribución restringida a localizaciones inmunoprivilegiadas, como los trofoblastos placentarios<sup>43</sup>, timo<sup>44</sup>, córnea<sup>45</sup> y páncreas<sup>46</sup>, y precursores eritroides y endoteliales<sup>47</sup>. El amplio espectro de funciones inmunosupresoras del HLA-G incluye tanto la inhibición directa de células efectoras como la prevención indirecta de respuestas inmunes a través de interacciones entre células presentadoras de antígenos, células reguladoras y HLA-G<sup>48</sup>.

En el contexto de su expresión en los citotrofoblastos extravellosos, HLA-G juega un papel fundamental en la tolerancia materno-fetal<sup>1</sup> a través de la prevención de la lisis inducida por las células NK deciduales y periféricas<sup>49, 50</sup>, linfocitos T citotóxicos antígeno-específicos, así como por respuestas

proliferativas alogénicas <sup>51</sup>, suponiendo unos niveles reducidos en plasma complicaciones durante el embarazo como preeclampsia, abortos espontáneos recurrentes o dificultad de gestación en fertilización *in vitro*. Además, HLA-G contribuye a la aceptación de los aloinjertos en los pacientes transplantados como consecuencia de sus propiedades tolerogénicas <sup>2, 3</sup>, y la alteración de la expresión, función y estructura del HLA se ha demostrado como un evento frecuente en el desarrollo y progresión del cáncer <sup>52</sup>. Otros como el HLA-G5 se han mostrado como un buen predictor de la evolución del *shock* séptico <sup>53</sup>.

De la transcripción de HLA-G primario por *splicing* alternativo se generan siete isoformas, cuatro de ellas (HLA-G1,-G2,-G3 y -G4) están unidas a la superficie celular, mientras que las otras tres restantes (HLA-G5, -G6 y -G7) son solubles, siendo las homólogas de HLA-G1, -G2 y -G3 respectivamente. La única isoforma derivada de la translación de la transcripción total de HLA-G es HLA-G1, ya que el resto de isoformas unidas a la membrana carecen de uno o dos dominios globulares. La estructura de las isoformas solubles coincide en la parte extracelular con las correspondientes isoformas unidas a la membrana, difiriendo en el extremo C. El dominio extracelular y la parte intracitoplasmática que está presente en las formas unidas a la membrana está sustituido en las isoformas secretadas por una porción hidrofílica corta. Estas diferencias proporcionan un marcador para distinguir las isoformas de HLA-G modificadas o fragmentadas mediante proteólisis de las isoformas de HLA-G secretadas. Las principales isoformas son HLA-G1 y HLA-G5, que desarrollan una actividad inmunosupresora mediada por su unión a los receptores CD85j (ILT-2), CD85d (ILT-4), CD158d (KIR2DL4), y CD160 (BY55). Estos receptores tienen una

distribución celular diferencial: CD85j (ILT-2) está expresado por las células B, T y NK, CD160 (BY55) está expresado por las células T, NK y endoteliales, mientras que CD85d (ILT-4) está expresado únicamente por los macrófagos, y CD158d (KIR2DL4) sólo por las células NK.

El dominio  $\alpha 1$  de HLA-G es probablemente responsable de la función de inhibición directa <sup>54, 55</sup>, ya que es común a todas las isoformas unidas a membrana (HLA-G1-4), exhibiendo propiedades inhibitorias. Las funciones inmunomoduladoras directas de HLA-G están mediadas por la interacción con receptores inhibitorios como KIR2DL4 (p49) expresados en células natural killer (NK) <sup>56</sup>, ILT2 en células linfoides y monocíticas, e ILT4 en células dendríticas, monocitos y macrófago <sup>50</sup>; el receptor KIR2DL4 se une específicamente a moléculas HLA-G, mientras que ILT2/ILT4 también reconoce otros ligandos HLA clase I (aunque HLA-G es el que presenta una mayor afinidad de unión a ILT2/ILT4 <sup>57, 58</sup>). En cuanto al efecto inmunosupresor indirecto de HLA-G, está mediado por la expresión de HLA-E, una molécula HLA clase Ib no clásica que interacciona con el receptor inhibitorio NKG2A (CD94) en células NK y T <sup>59</sup>.

## 2.3.- HLA-G Y CARCINOMA RENAL

### 2.3.1.- Expresión de HLA-G en el carcinoma renal

Existen, como ya se ha dicho, diferentes resultados acerca de la expresión de HLA-G en los tumores de diferentes orígenes <sup>4, 8, 9</sup>, de forma que la *up-regulation* de la expresión de HLA-G se ha encontrado tanto en tumores sólidos como en enfermedades hematológicas <sup>10, 11</sup>. Además, existen variaciones

significativas en la frecuencia de la expresión de HLA-G entre los diferentes tipos tumorales analizados y también entre un mismo tumor dependiendo del estudio, lo cual podría deberse fundamentalmente a los diferentes anticuerpos utilizados para realizar la inmunohistoquímica.

Existen cuatro publicaciones fundamentales en el análisis del papel de la expresión de HLA-G en el carcinoma renal, en las que se han utilizado piezas tumorales y/o líneas celulares tumorales junto a tejido renal normal. En conjunto, se han estudiado 86 lesiones tumorales de diferentes subtipos histológicos junto a los correspondientes tejidos renales normales y 25 líneas celulares de carcinoma renal han sido investigadas acerca de la transcripción y/o translación del HLA-G utilizando diferentes pares de *primers* HLA-G-específicos y varios anticuerpos HLA-G-específicos<sup>5,13-15</sup>. En estos estudios, se ha encontrado expresión del RNAm y de la proteína de HLA-G en aproximadamente un 45-60% de las lesiones de carcinoma renal, en función de los diferentes estudios, pero no se ha encontrado expresión en el tejido renal normal, siendo la frecuencia de la expresión de HLA-G mayor en el carcinoma renal en comparación con otros tipos tumorales<sup>4,8</sup>. Se ha estudiado también la existencia de una posible correlación entre la expresión de HLA-G y ciertos parámetros clínicos (tipo histológico, localización tumoral, sexo, edad, grado nuclear, estadio de la enfermedad, y clasificación TNM), sin encontrar hasta el momento relación<sup>5, 12, 13</sup>. Sin embargo, la expresión de HLA-G sí parece ser subtipo celular-específica, ya que su expresión se ha encontrado fundamentalmente en el subtipo de células claras<sup>5, 13</sup>, mientras que otros tipos histológicos de CCR, como el papilar, cromófobo, o de los ductos colectores

(de Bellini) eran negativos en la mayoría de los estudios para la expresión por IHQ de HLA-G<sup>13, 14</sup>. La expresión selectiva de HLA-G en el subtipo de células claras podría ser debida a mecanismos específicos implicados en la transformación maligna de este subtipo histológico que controlan muchos genes que regulan la expresión de HLA-G. Además, dado que HLA-G no se ha detectado en tejido renal embrionario ni fetal, se puede excluir una reactivación de la expresión de genes durante el desarrollo del riñón<sup>14</sup>. Sin embargo, en un estudio reciente<sup>12</sup>, se ha observado expresión de HLA-G también en los subtipos cromófobo y de los ductos colectores, debiéndose esta discrepancia probablemente al mayor tamaño muestral, y siendo necesarios por tanto otros estudios con una mayor cohorte de estas histologías para aclarar esta controversia. Es interesante también el hecho de que existen diferentes modos de expresión de las isoformas HLA-G-específicas en las lesiones de carcinoma renal, y así se ha visto como las más prominentes son las isoformas HLA-G1-5 y -3. En algunos casos, el RNAm y la proteína de HLA-G no se expresan de forma coordinada; de esta forma, la frecuencia de la expresión del HLA-G de superficie está reducida cuando la comparamos con la transcripción de HLA-G, sugiriendo una regulación post-transcripcional de HLA-G en las lesiones tumorales renales.

En cuanto a los resultados obtenidos en las 25 líneas celulares de cáncer renal, son similares: 13 de las 25 líneas celulares expresaron RNAm de HLA-G, mientras que la expresión y secreción de HLA-G de superficie se ha encontrado en 11 de las 25 líneas estudiadas. Además, cultivos a corto plazo de células renales epiteliales normales presentan una ausencia total de HLA-G,

tanto de RNA como de proteína. La reducida frecuencia de la transcripción de HLA-G encontrada en las líneas celulares respecto a las lesiones tumorales parece ser debida a la ausencia de los factores del microambiente tumoral, y esto se ha demostrado por la pérdida del HLA-G durante el cultivo del tejido. La significativa expresión de HLA-G de superficie en algunas líneas celulares se acompaña de la detección tanto de formas unidas a membrana como de HLA-G soluble, en particular del sHLA-G1 implicado en la secreción de HLA-G1 y sHLA-G5, representando la forma secretada del intrón 4, así, la inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo monoclonal MEM-G/9 ha detectado HLA-G1 y sHLA-G1<sup>13, 15</sup>.

### **2.3.2.- Mecanismos moleculares de la regulación de HLA-G**

La expresión del gen de HLA-G implica complejos mecanismos reguladores y se ha visto que ocurre tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. En el promotor de HLA-G, el HLA-G clase I *acting regulatory elements* son interrumpidos y a pesar de que *X1 box* está intacto, el HLA-G no responde al factor RFX5<sup>53</sup>. La regulación de HLA-G mediada por CREB/ATF se debe a tres elementos CRE/TRE identificados en la región promotora de HLA-G y, además, existe evidencia de una región reguladora positiva 1 kb por encima del ATG del gen de HLA-G<sup>53</sup>.

El elemento respuesta estimulado por el IFN en el promotor de HLA-G es responsable de la *up-regulation* del HLA-G mediada por IFN<sup>54</sup>. Detrás del control transcripcional, la expresión del gen de HLA-G está regulada

estrechamente a nivel epigenético <sup>55</sup>, de forma que ha sido demostrada en tumores la hipermetilación del sitio CpG de la región reguladora 5' 400 bp por encima del codón de inicio del HLA-G y alteraciones en la acetilación de histonas que pueden ser revertidas por medio de agentes demetilantes y deacetilantes <sup>61, 62</sup>. Además de la silenciación de la histona *metilación-mediada*, la acetilación del promotor de HLA-G también afecta a la regulación del gen de HLA-G.

Se ha demostrado también la metilación del promotor de HLA-G en varias líneas celulares y piezas tumorales de carcinoma renal. La expresión del RNAm y de la proteína de HLA-G podrían ser inducidas mediante el tratamiento de células tumorales renales con el agente demetilante desoxiazacitidina (DAC). La demetilación del promotor estaba acompañada por un incremento en la expresión de HLA-G en la superficie celular, en particular de la isoforma proteica HLA-G1, lo cual se vio como independiente de la expresión de los antígenos de superficie del HLA clásico clase I.

### **2.3.3.- Alteraciones en la estructura del HLA-G: polimorfismos del HLA-G en el carcinoma renal**

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) han sido descritos en regiones no codificantes del gen HLA-G <sup>62</sup> y están representados por 18 SNPs en la región promotora y un polimorfismo delección/inscripción 14-bp en el exón 8, codificando para la región no traducida 3' del gen HLA-G en la posición 3741 <sup>61, 62</sup>. Este polimorfismo influye en la estabilidad del RNAm de HLA-G y en el

*splicing* de la isoforma, modulando así el nivel de expresión de HLA-G, lo que se ha visto que podría jugar un papel inmunomodulador durante la implantación, embarazo, autoinmunidad y desarrollo tumoral <sup>63, 64</sup>. De hecho, las variantes polimórficas de HLA-G caracterizadas por el polimorfismo delección/inserción 14-bp están asociadas con abortos recurrentes y otros desórdenes gestacionales; este polimorfismo de HLA-G dependería de la población, ya que la frecuencia de la delección/inserción 14-bp de los alelos de HLA-G podría ser igual en muchos caucasianos, pero no en las poblaciones brasileña y africana <sup>64</sup>. Debido al aumento de la expresión de HLA-G en el carcinoma renal, se podría especular que el polimorfismo de la delección 14-bp podría influenciar en la actividad transcripcional de HLA-G y tendría por tanto una relevancia funcional en esta enfermedad. El análisis de este polimorfismo en piezas tumorales renales y en epitelio renal normal ha demostrado que el polimorfismo de la delección 14-bp ocurre con una frecuencia elevada; sin embargo, no ha sido posible relacionar este polimorfismo con diferentes expresiones y funciones de HLA-G. Se ha sugerido que estos datos suponen que este polimorfismo no tiene una significación funcional para el carcinoma renal, aunque no se podría excluir que otros polimorfismos ligados al polimorfismo 14-bp pudieran también contribuir a la patogénesis inmune de esta enfermedad <sup>60</sup>.

### 2.3.4.- Efecto de la expresión de HLA-G en la respuesta inmune en el carcinoma renal

Se ha comunicado que la *up-regulation* de la expresión del antígeno HLA no clásico puede modular respuesta inmunes en situaciones de enfermedad como infecciones por citomegalovirus, transplantes, y tumores. Además, el *switch* de las isoformas de HLA-G puede alterar la sensibilidad a las células efectoras inmunes<sup>58, 64</sup>. La expresión del HLA-G constitutivo y de las células tumorales renales afecta a la actividad de las células efectoras inmunes; de hecho, las células tumorales renales HLA-G<sup>+</sup> son protegidas del *MHC-restricted* de la lisis antígeno-específica mediada por linfocitos T citotóxicos, mientras que las células renales HLA-G<sup>-</sup> son reconocidas<sup>64</sup>. La susceptibilidad de la célula tumoral renal afectada no es debida a la reducida expresión en superficie del MHC clase I ni está asociada con el HLA-E, ya que tanto las células renales normales como las tumorales expresan niveles comparables de antígenos de superficie HLA-E; además, la expresión de HLA-G también afecta a la función de la célula inmune. Se ha visto como las células LAK reconocen de forma eficiente las células renales normales HLA-G<sup>-</sup> y las células K562, mientras que en contraste, la lisis de las líneas celulares de cáncer renal HLA-G<sup>+</sup> estaba reducida de forma significativa. La actividad LAK podría ser restaurada utilizando el mAb W6/32 pan-HLA clase I que reacciona con el HLA clase I, HLA-G, y la molécula inmune de regulación negativa HLA-E; sin embargo, la implementación de este anticuerpo no tendría efecto en la lisis de las células renales. Además, las células renales HLA-G<sup>+</sup> son resistentes a la lisis mediada por las células NK, aunque existe una diferencia significativa entre el nivel de protección utilizando células LAK y NK<sup>15, 64</sup>.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. Pacientes

###### 3.1.1.1. Universo poblacional

Los pacientes incluidos en este trabajo proceden del Área 3 del mapa sanitario de Aragón (**Figura 1**) que recoge el Sector Zaragoza III y el Sector Calatayud, los cuales incluyen: población urbana de Zaragoza ciudad y ciertos barrios, y población rural de las comarcas de las Cinco Villas, Zaragoza, Ribera Alta del Ebro, Campo de Cariñena, Valle del Alagón, Campo de Borja, Tarazona y el Moncayo, Calatayud, Campo de Daroca, Valdejalón y Aranda.



**Figura 1.** Mapa sanitario de Aragón.

### **3.1.1.2. Criterios de inclusión y exclusión. Universo muestral.**

Sobre el universo poblacional descrito en el apartado previo se consideró candidatos a estudio a todos los pacientes tratados en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de edad
- Diagnóstico histológico de carcinoma renal obtenido por nefrectomía o biopsia
- Se admiten todos los subtipos histológicos
- Se admiten todos los estadios
- Se admiten nuevos diagnósticos y recaídas
- Todos los pacientes incluidos en este estudio cumplirán los requisitos exigidos por el Comité Ético de investigación Clínica de Aragón (CEICA), quien con fecha 27/6/2012 y en su acta 12/2012 emitió dictamen favorable a nombre de la Dra M Berta Sáez Gutiérrez (ANEXO I).

El período de obtención de las muestras histológicas fue el comprendido entre Julio de 2008 y Diciembre de 2009. El período de recogida de datos finalizó en Julio del 2014.

### **3.1.1.3. Muestras**

Se utilizó tejido tumoral y sano adyacente procedente de biopsias y piezas de nefrectomías realizadas a pacientes afectos de carcinoma de células renales, entre Julio de 2008 y Diciembre de 2009, en el Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Para el procesado inmediato del tejido fresco obtenido se utilizó un bisturí para cortar las muestras, Paraformaldehído (PFA) al 4% , alcohol, parafina para la posterior inclusión de parte de la muestra en la misma, nitrógeno líquido y un congelador de -80° C para el almacenamiento en el Banco de Tumores (I+CS). Además, se sometió a un procesado con DMSO (Dimetilsulfóxido) a la porción de tejido destinada a la realización de cultivo celular.

Asimismo, se obtuvo suero procedente de sangre periférica de estos mismos pacientes que se almacenó en el Banco de Tumores del centro (I+CS) con la intención de valorar futuras investigaciones. La recogida de las muestras de sangre periférica se realizó en tubos de heparina de litio y en tubos secos para la recolección de suero; en ambos casos de BD Vacutainer.

### **3.1.2. Material para estudio inmunohistoquímico**

#### **3.1.2.1. Anticuerpos**

Se utilizaron los siguientes anticuerpos: Ki-67 (*mouse anti human monoclonal*, clon MIB-1, Dako, Denmark), Citoqueratina AE1/AE3 (*mouse anti human monoclonal*, clon AE1/AE3, Dako, Denmark), Citoqueratina HMW (*mouse anti*

*human monoclonal*, clon 34 $\beta$ E12, Dako, Denmark), HLA-G (*mouse anti human monoclonal*, clon MEM-G/2, ExBio), y Vimentina (*mouse anti human monoclonal*, clon V9, Dako, Denmark).

### **3.1.2.2. Otros materiales**

Como material de fijación PFA al 4% (Panreac 141451.1210) y Alcohol a 100° diluido con agua MilliQ (Biocel-Millipore).

Como material de lavado se utilizó: PT-Link (Dako, Denmark), *buffer* con pH ácido o básico en función del anticuerpo (Target Retrieval Solution, High pH or Low pH, Dako, Denmark), y *buffer* de lavado (Dako, Denmark).

Para realizar el estudio IHQ se utilizó Dako EnVision FLEX+ Mouse Kit y peroxidasa endógena (Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™, Dako, Denmark), EnVision FLEX + Mouse *linker* seguidos del polímero marcado con peroxidasa de *horseradish* EnVision™/HRP para la incubación, y la reacción de color fue desarrollada por DAB + cromógeno en *buffer* de sustrato (Dako, Denmark). Para tratar las secciones se utilizó hematoxilina de Mayer, alcohol y xileno.

### **3.1.3. Material para estudio ELISA**

Para la realización del estudio ELISA se utiliza el material contenido en el Kit de ELISA de la marca BioVendor que contiene como material principal suministrado: microplacas recubiertas de Anticuerpos, solución conjugada concentrada, un calibrador, diluyente conjugado, Buffer de dilución (se incluyen 2 tipos de buffer, uno recomendado para líquido amniótico y el otro principalmente para plasma), solución de lavado, solución de sustrato y solución de parada. Este kit está disponible para el estudio de sHLA-G mediante la técnica de ELISA en plasma, líquido amniótico o en cultivos celulares.

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Recogida de datos y Estadiaje de los pacientes**

El estadiaje de los pacientes incluidos en el estudio se ha realizado en base a la 7<sup>a</sup> edición de la clasificación de la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) <sup>152</sup>. La agrupación de los pacientes por estadios se ha realizado en función de las tasas de supervivencia observadas durante los años 2001-2002 por el *National Cancer Data Base (Commission on Cancer of the American College of Surgeons and the American Cancer Society)*, con estos datos, se agrupó a los pacientes en tres grupos: estadios I-II, estadio III, y estadio IV (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Estadios en cáncer renal (7<sup>th</sup> edition AJCC classification) <sup>31</sup>.**

Estadios		
Estadio I	T1 M0	N0
Estadio II	T2 M0	N0
Estadio III	T1 o T2 M0	N1
	T3 M0	N0 o N1
Estadio IV	T4 M0	N0-1
	T1-4 M1	N0-1

### **3.2.2. Procesado de las muestras**

El procesado de las muestras se realizó de forma inmediata tras la extracción quirúrgica de la pieza, para que el tejido fresco obtenido conservara su morfología intacta. En todos los casos se realizaron tres piezas, mediante corte con bisturí de la muestra obtenida, para los siguientes fines:

1.- Estudio IHQ: se realizó inclusión en PFA al 4% durante 24 horas, pasándose posteriormente a una gradación de alcoholes para rehidratar la muestra previamente a inclusión en parafina.

2.- Conservación en nitrógeno líquido para colección de Banco de Tumores (I+CS).

3.- Muestras séricas, se obtuvo mediante punción endovenosa de una muestra de sangre periférica de los pacientes. Como ya se ha indicado, la recogida de la sangre se realizó en tubos de heparina de litio (que favorece la separación del plasma) y en tubos secos (que contienen un gel de sílice que favorece la formación del coágulo) para la recolección de suero. La muestra se procesó dentro de las primeras 24 horas tras la extracción, realizándose para la recogida del suero centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos. Se recogió entonces la parte sérica por decantación y se congeló a -20°C hasta analizar dichos sueros en placa de ELISA.

### **3.2.2.1.- Inmunohistoquímica**

Se realizó deparafinización e hidratación de las muestras en series de alcohol graduales desde el 100% al 70% y agua corriente, durante 5 minutos. Se recuperó el antígeno mediante PT-Link (Dako, Denmark) a través del calentamiento de las piezas a 92°C en *buffer*, con pH ácido o básico en función del anticuerpo (Target Retrieval Solution, High pH or Low pH, Dako, Denmark) durante 20 minutos. Se lavó entonces en *buffer* de lavado (Dako, Denmark) y se utilizó Dako EnVision FLEX+ Mouse Kit para realizar el estudio IHQ. A continuación, se añadió brevemente peroxidasa endógena (Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™, Dako, Denmark) seguida de los anticuerpos primarios de Ki-67 (*mouse anti human monoclonal*, clon MIB-1, Dako, Denmark), Citoqueratina AE1/AE3 (*mouse anti human monoclonal*, clon AE1/AE3, Dako, Denmark), Citoqueratina HMW (*mouse anti human monoclonal*, clon 34βE12, Dako, Denmark), HLA-G (*mouse anti human monoclonal*, clon MEM-G/2, ExBio) o Vimentina (*mouse anti human*

*monoclonal*, clon V9, Dako, Denmark), los cuales se utilizaron tanto en las secciones de tejido renal tumoral como sano adyacente obtenidas de cada paciente. Se incubaron entonces las secciones obtenidas de cada paciente con EnVision FLEX + *Mouse linker* seguidos del polímero marcado con peroxidasa de *horseradish EnVision™/HRP*. La reacción de color fue desarrollada por DAB + cromógeno en *buffer* de sustrato (Dako, Denmark), resultando en un producto de reacción marrón. Las secciones fueron tratadas con hematoxilina de Mayer, deshidratadas en series gradientes de alcohol, aclaradas con xileno y montadas para observar en microscopio. En los controles negativos, se omitió el anticuerpo primario.

### **3.3 MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS Y CARCINOMA RENAL**

#### **3.3.1 UTILIDADES DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS**

En los últimos años, en la práctica clínica, la inmunohistoquímica se ha hecho indispensable. Sus principales utilidades son:

- 1- Diagnóstico diferencial entre neoplasias de células renales y neoplasias de otros orígenes (p.ej. angiomiolipoma, linfoma, carcinoma urotelial o carcinoma metastático), tanto en lesiones a nivel renal como en otras localizaciones metastásicas.
- 2- Diagnóstico diferencial de los diferentes subtipos histológicos de carcinoma de células renales.

### **3.3.2 TIPOS DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS**

#### **3.3.2.1. Citoqueratinas**

Los principales subtipos de carcinoma renal expresan CK18, mientras que la CK20 es negativa en todos ellos. Otras observaciones importantes son la positividad de CK5/6 en el 75% de los carcinomas uroteliales y en el 15% de los carcinomas de ductos colectores, que no se da en otros tipos. Además, la CK7 es positiva en la mayoría de los carcinomas papilares, de ductos colectores, y en el carcinoma urotelial (87%-100%), pero es también positivo en un porcentaje significativo de otros tumores. Por otra parte, las CKs de alto peso molecular (HMW) son positivas en la mayoría de carcinomas de ductos colectores (67%) y en los carcinomas uroteliales (100%), pero su expresión es menos frecuente en otros tumores; la expresión de CKs para el subtipo sarcomatoide no ha sido adecuadamente evaluada. Nos sirven habitualmente para confirmar el diagnóstico de carcinoma, utilizándose a menudo un anticuerpo anti-CK de amplio espectro, de los que el más común es el Ac AE1/AE3, que carece de especificidad para la CK18. Por tanto, para confirmar si se trata de un carcinoma, deberemos utilizar una amplia batería de anticuerpos anti-CK, incluyendo tanto los de amplio espectro como los específicos para CKs de bajo y alto peso molecular.

#### **3.3.2.2. Vimentina**

La vimentina es un marcador mesenquimal, que se expresa en la mayoría de subtipos de CCR, a menudo con un patrón difuso. La mayoría de tumores de células claras y papilares (87%-100%) la expresan, pero raramente lo hacen

los cromófobos y oncocitomas. Sin embargo, la positividad de vimentina no excluye de forma completa la posibilidad de que se trate de un oncocitoma, especialmente si la muestra es escasa.

### **3.3.2.3 Ki-67**

El anticuerpo monoclonal Ki67 detecta un antígeno nuclear que está solo en las células proliferadoras. La Presencia de este anticuerpo da información sobre la velocidad de crecimiento de células tanto normales como neoplásicas, por lo que es muy usado como valor pronóstico de crecimiento celular en procesos tumorales.

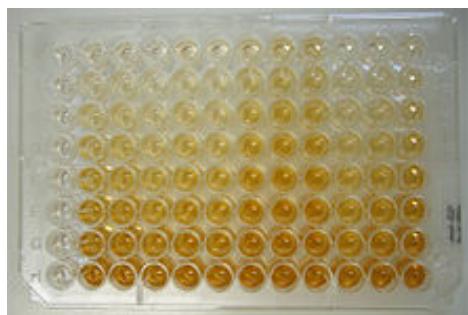
Se encuentra en todas las fases del ciclo celular, excepto en G0 (fase en reposo), lo que explica su función en el crecimiento celular.

### **3.3.2.4 HLA-G**

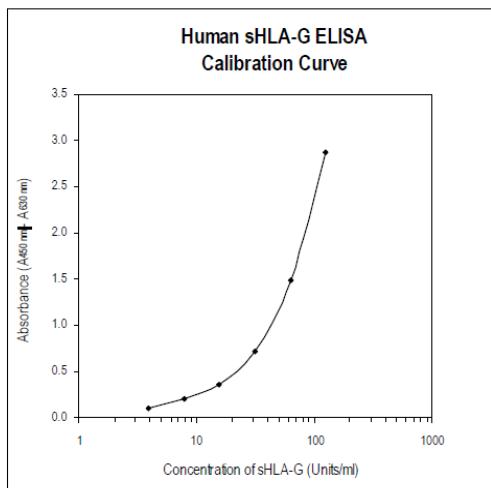
Se ha encontrado expresión de HLA-G tanto en tumores sólidos como en desórdenes linfoproliferativos, asociándose esta expresión a una disminución o pérdida de las respuestas inmunes mediadas por células NK y T, y a menudo a un aumento de la tumorogenicidad. Mediante una tinción de inmunohistoquímica se puede apreciar como en los procesos tumorales presenta un aumento de expresión de HLA-G. Esto ocurre principalmente en los carcinomas renales.

### 3.2.2.2.- ELISA

La cuantificación de la proteína HLA-G soluble en los sueros de pacientes con CCR y donantes sanos se realizó por ELISA. Para ello utilizamos el Kit de ELISA de la marca BioVendor.

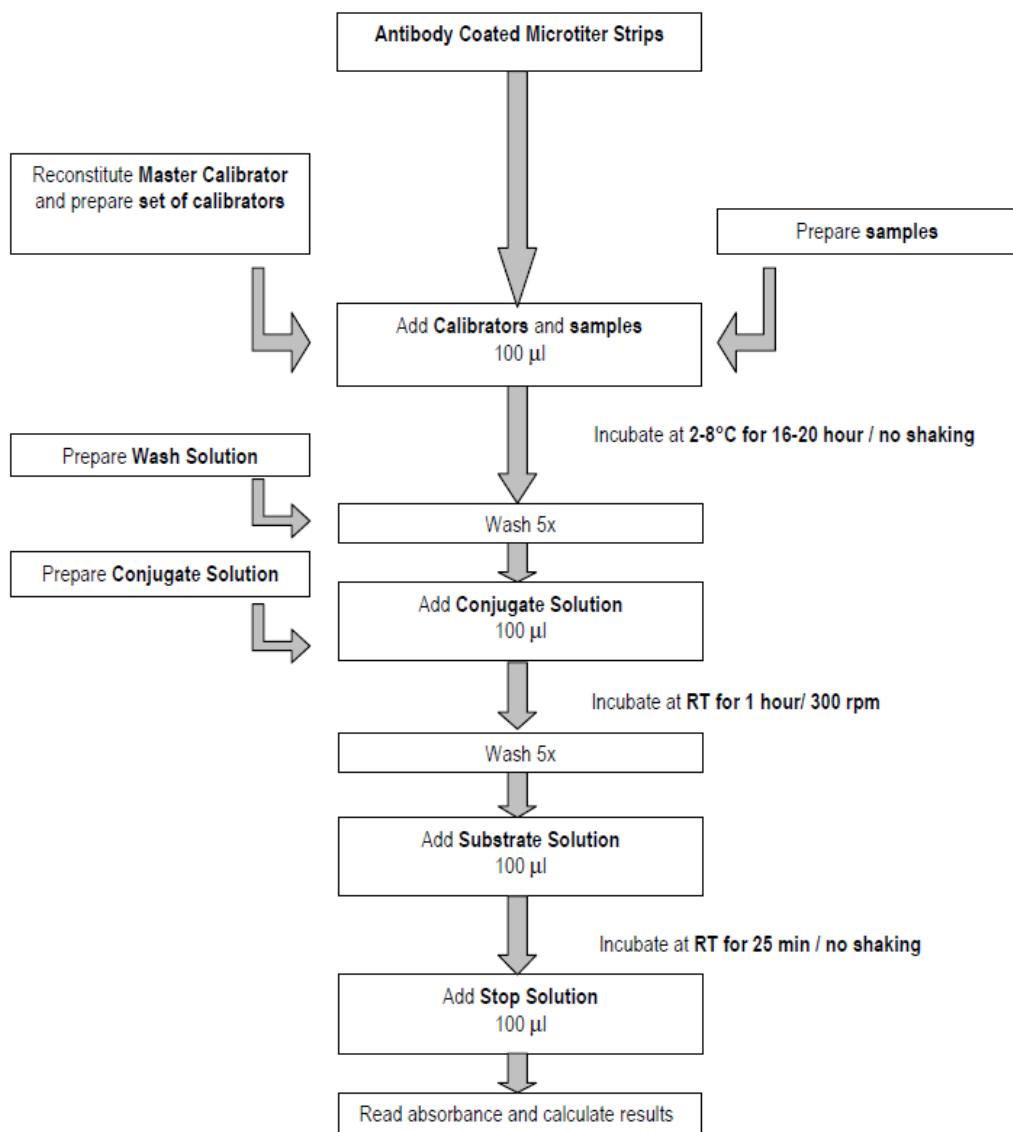


Los calibradores y las muestras se incuban en los pocillos pre-revestidos con anticuerpo monoclonal anti-sHLA-G, e incubamos durante toda la noche a 37°C. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Seguidamente, se adiciona el anticuerpo monoclonal anti-β2-microglobulina humana marcada con peroxidasa de rábano (HRP) se añade a los pocillos y se incubaron durante 60 minutos. Después de otra de etapa de lavado, se permite que el conjugado HRP reaccione con la solución de sustrato (TMB). La reacción se detuvo por adición de solución ácida y la absorbancia del producto amarillo resultante se midió en un lector de placas (Hiperion Microreader 4 Plus)



La absorbancia es proporcional a la concentración de sHLA-G. La curva de calibración se construye representando los valores de absorbancia contra la concentración de los calibradores, y las concentraciones de muestras desconocidas se determinan utilizando esta curva de calibración

## Assay Procedure Summary



## 4.- RESULTADOS

### 4.1 Descripción de la muestra

#### 4.1.1 Edad y sexo

La muestra consta de 34 pacientes, de los cuales 23 son hombres (67'6%) y 11 mujeres (32'3%) (fig. 1). El rango de edad comprendido, en el momento del diagnóstico, se sitúa entre los 37 años y los 85 años de edad, con una media de 68'7 años y una mediana de edad de 72 años (fig. 2).

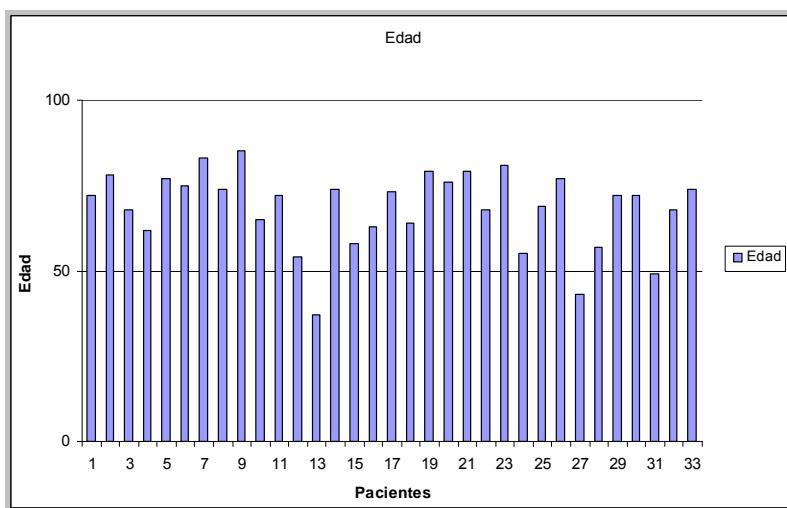


Fig. 1 Edad de los pacientes de la muestra

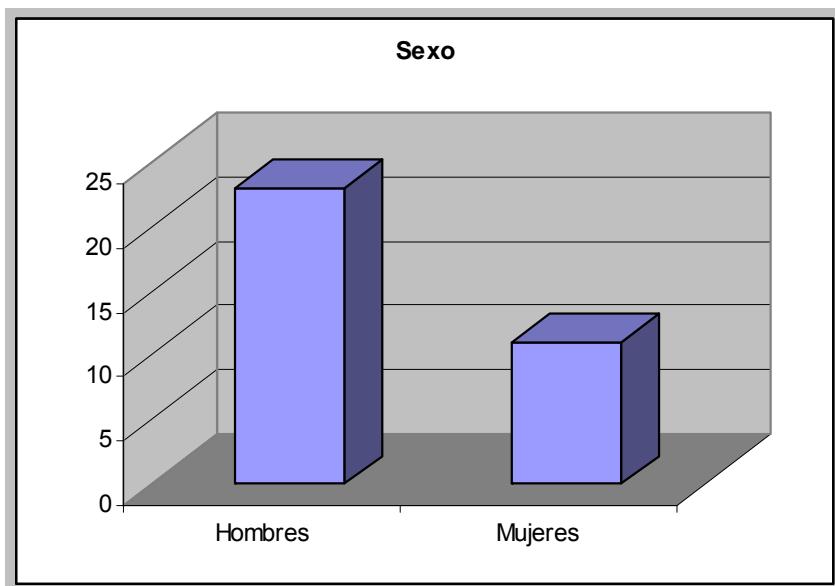


Fig. 2 Sexo de la muestra

#### 4.1.2 Estadio Tumoral

En cuanto al Estadio tumoral de los pacientes de la muestra, encontramos los siguientes datos referidos en el siguiente gráfico (fig. 3). Se puede apreciar que el Estadio tumoral predominante es el Estadio III.

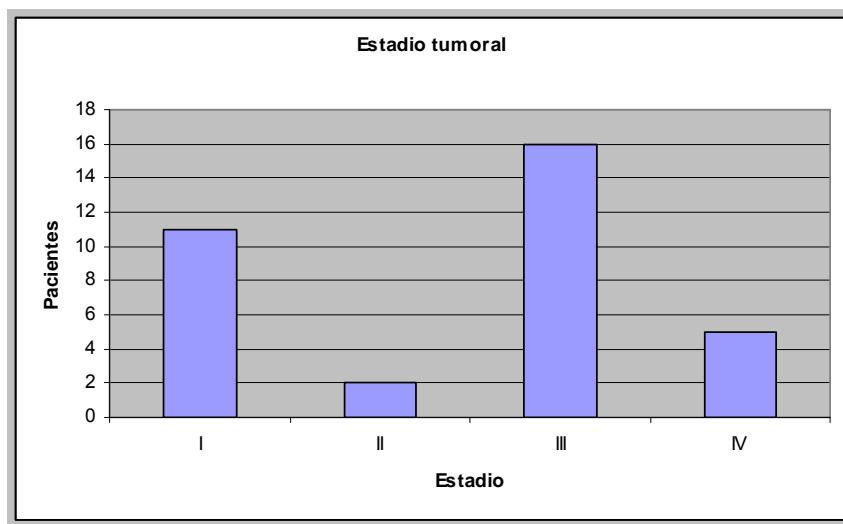


Fig. 3 Estadio tumoral

#### 4.1.3 Metástasis al diagnóstico y localización

En la muestra obtenida se obtienen los datos de metástasis al diagnóstico, ofreciendo los datos abajo descritos, siendo la mayor parte de ellos (85%) no metastáticos al diagnóstico (fig. 4).

En cuanto a las localizaciones más frecuentes de las metástasis en el momento del diagnóstico, resultó ser la localización hepática (en un 66% de la muestra), frente a otras localizaciones. (fig. 5)

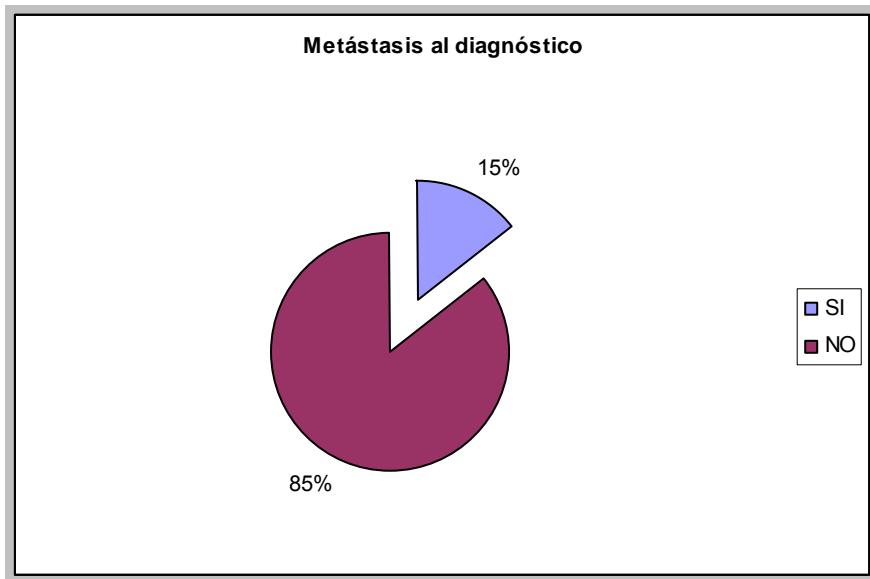


Fig. 4 Metástasis en el momento del diagnóstico

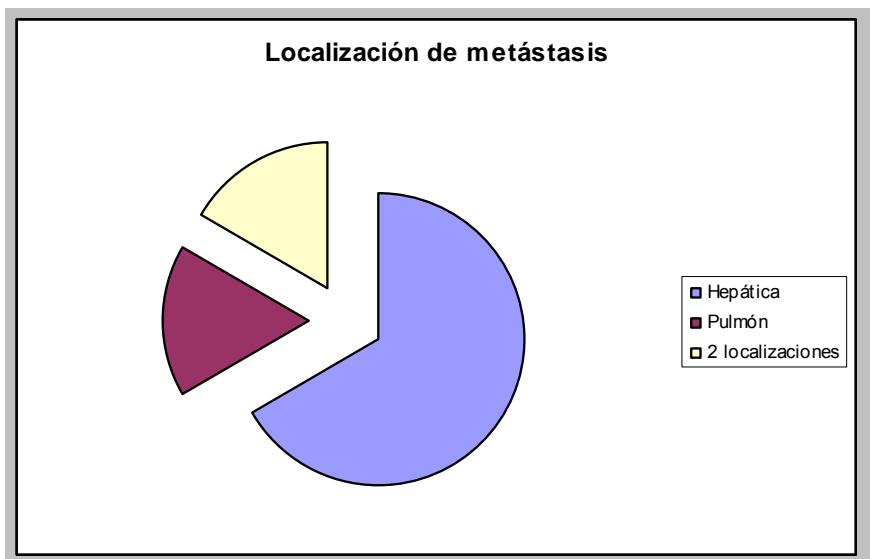


Fig. 5 localizaciones de las metástasis

#### 4.1.4 Progresión de la enfermedad y localización

En la muestra obtenida se aprecia un índice de progresión del 20% de los pacientes (9 de los pacientes estudiados progresaron) a lo largo de la enfermedad hasta el momento actual en el que se recogen los datos clínicos de la muestra (fig. 6).

La localización más frecuente en la progresión resultó ser el pulmón (en un 30% de los pacientes que han progresado), seguido muy de cerca por los casos en los que la progresión se realizó a 2 niveles diferentes (21%), entre los cuales también se encuentra afectado el pulmón. En el gráfico presentado a continuación se aprecia la diversidad de las localizaciones presentadas en la progresión (fig.7).

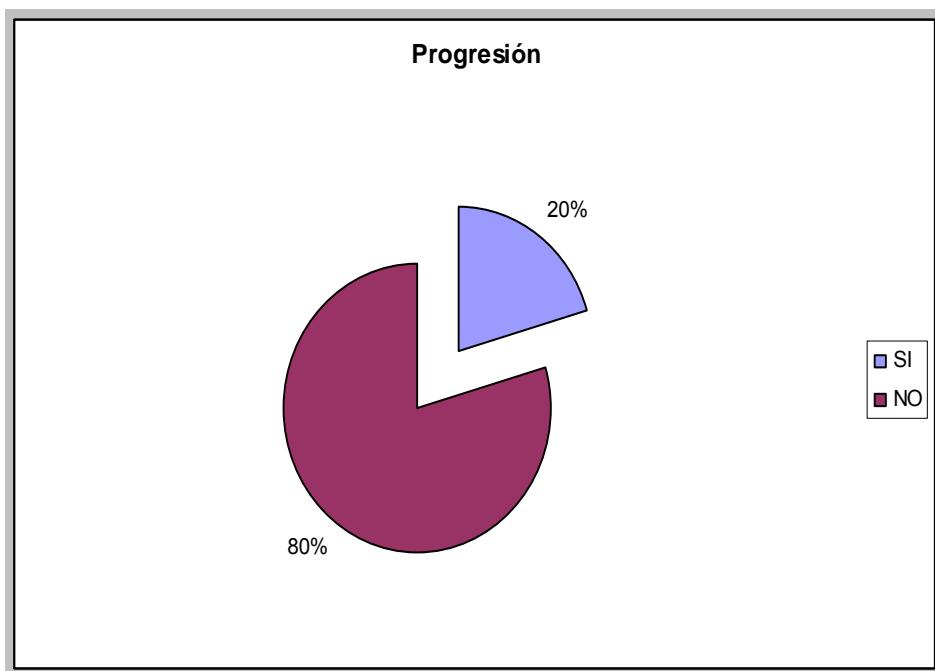


Fig. 6 Pacientes que han presentado progresión

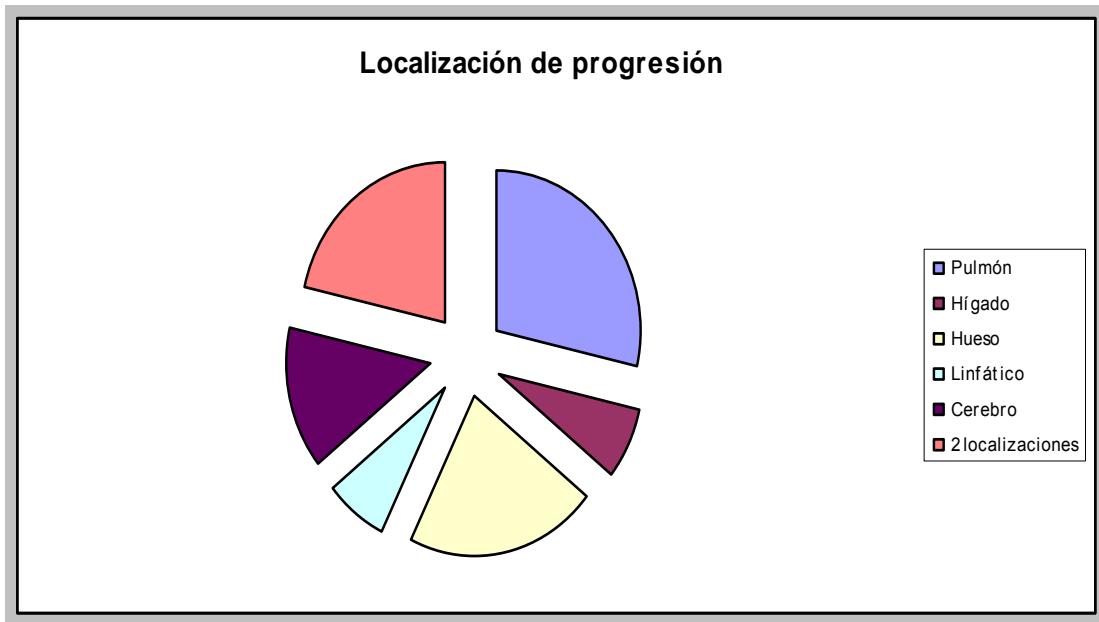


Fig. 7 Localizaciones a la progresión

#### 4.1.5 Subtipo histológico

El subtipo histológico más frecuente en el Carcinoma Renal es el Carcinoma de Células Claras, como se puede apreciar en nuestra muestra (79% de los pacientes recogidos). El resto de subtipos histológicos obtenidos mantienen una distribución muy similar (fig. 8).

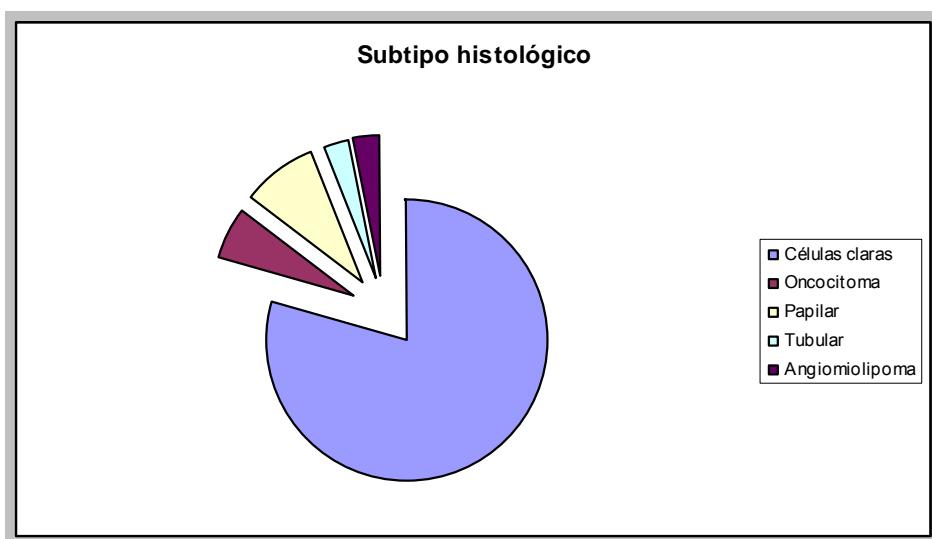


Fig. 8 Subtipos histológicos

#### 4.1.6 Exitus

En los datos clínicos recogidos de la muestra, se observan a fecha de recogida de datos en 2014 que se han producido 10 fallecimientos del total de los pacientes, de los cuales 2 de ellos fueron por causas ajenas al proceso tumoral, siendo 8 de ellos fallecidos a causa del Carcinoma Renal y la posterior progresión (fig. 9).



Fig. 9 Pacientes fallecidos

#### **4.2 Resultados de Inmunohistoquímica según Subtipo histológico.**

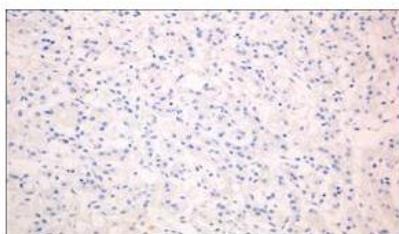
Se toman las siguientes definiciones del grado de expresión del marcador de inmunohistoquímica según los porcentajes de expresión en la muestra por Consenso Internacional. Se expresa en grados de 0+, 1+, 2+ y 3+ según el porcentaje de expresión de cada marcador de la manera que se detalla a continuación.

- 0: negativo o ausencia de expresión**
- 1+: expresión débil (1-30% de las células tumorales)**
- 2+: expresión moderada (31-70% de las células tumorales)**
- 3+: expresión intensa (71-100% de las células tumorales)**

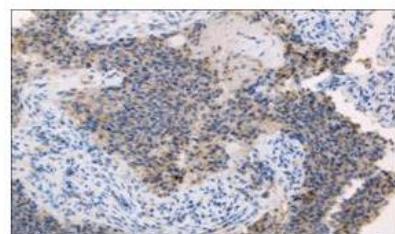
#### 4.2.1 HLA-G

HLA-G	C. CLARAS	ONCOCITOMA	PAPILAR	TUBULAR
N=34	27	2	3	1
0+	0	0	0	0
1+	11'1%	0	0	100%
2+	51'8%	50%	66%	0
3+	40'7%	50%	33%	0

Tabla: Representación de HLA-G según el subtipo histológico



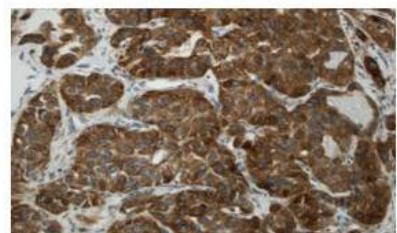
0: Ausencia de expresión (20X)



1+: Expresión débil (20X)  
(1%-30% céls .tumorales)



2+: Expresión moderada (20X)  
(31%-70% céls. tumorales)



3+: Expresión intensa (20X)  
(71%-100% céls. tumorales)

Imágenes con objetivo de 20X de inmunohistoquímica frente a HLA-G

## 4.2.2 EXPRESIÓN DE CITOQUERATINAS

### 4.2.2.1 Pancyto

PANCYTO	C. CLARAS	ONCOCITOMA	PAPILAR	TUBULAR
N=34	27	2	3	1
0+	3'8%	0	0	0
1+	11'6%	0	0	0
2+	41%	54%	0	0
3+	25%	27%	100%	100%

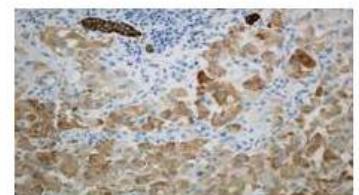
Tabla: Representación de Pancyto según el subtipo histológico



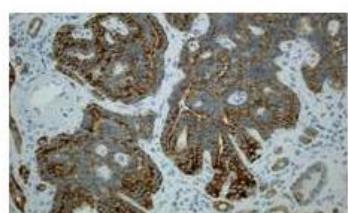
0: Ausencia de expresión (20X)



1: Expresión débil (20X)



2: Expresión moderada (20X)



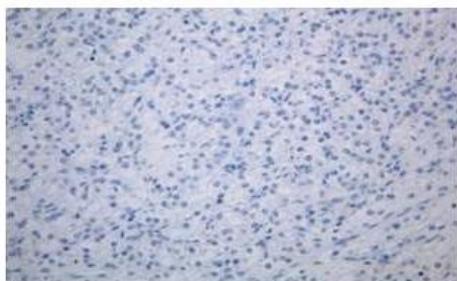
3: Expresión intensa (20X)

Imágenes con objetivo de 20X de inmunohistoquímica frente a Pancyto

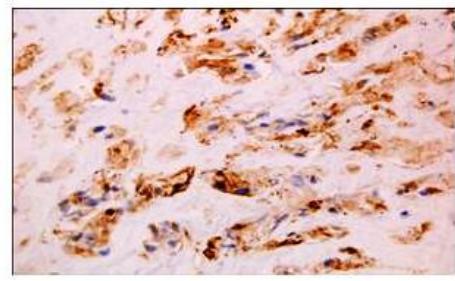
#### 4.2.2.2 HMW

HMW	C. CLARAS	ONCOCITOMA	PAPILAR	TUBULAR
N=34	27	2	3	1
0+	100%	44'5%	100%	100%
1+	0	0	0	0
2+	0	22%	0	0
3+	0	0	0	0

Tabla: Representación de HMW según el subtipo histológico



0: Ausencia de expresión (20X)



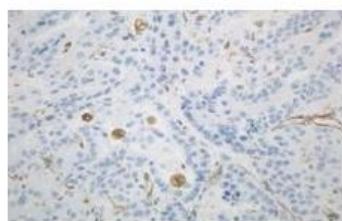
2: Expresión moderada (20X)

Imágenes con objetivo de 20X de inmunohistoquímica frente a HMW

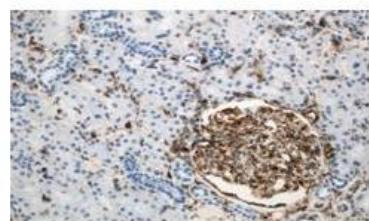
#### 4.2.3 EXPRESIÓN DE VIMENTINA

VIMENTINA	C. CLARAS	ONCOCITOMA	PAPILAR	TUBULAR
N=34	27	2	3	1
0+	0	0	0	0
1+	2%	0	0	0
2+	19'3%	0	22%	0
3+	60%	100%	54%	100%

Tabla: Representación de Vimentina según el subtipo histológico



1: Expresión débil (20X)



2: Expresión moderada (20X)

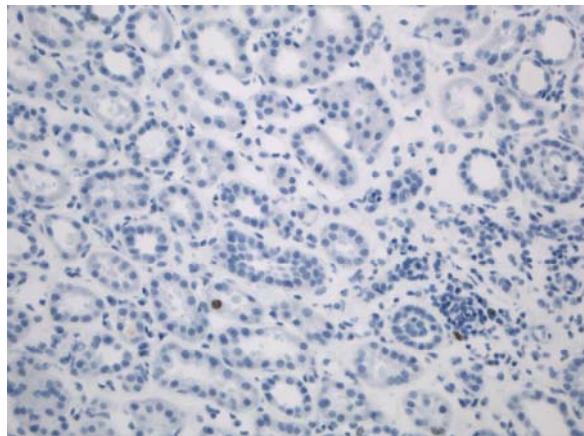


3: Expresión intensa (20X)

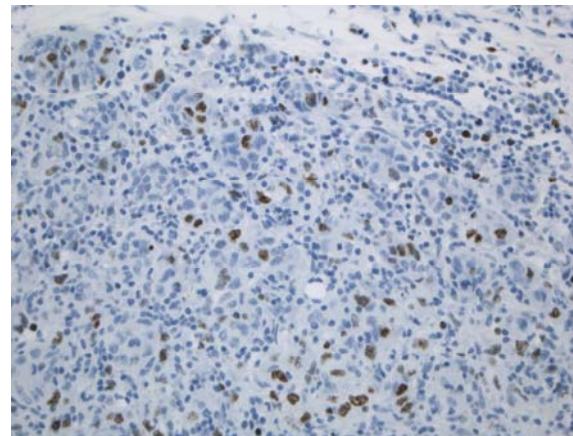
Imágenes con objetivo de 20X de inmunohistoquímica frente a HMW

#### 4.2.4 EXPRESIÓN DE Ki-67

Normal



Tumoral



Imágenes con objetivo de 20X de Ki67 tumoral y no tumoral

#### 4.3 RESULTADOS SÉRICOS

En cuanto a los datos serológicos, se aprecia un aumento de los niveles de sHLA-G (HLA-G soluble en plasma) con respecto a los controles sanos. Los controles sanos resultan del análisis de donantes de sangre en el Banco de Sangre de Aragón, que han sido testados para diferentes serologías y resultaron negativos, por tanto se trata de pacientes sin ningún tipo de enfermedad que pueda verse alterado el nivel de HLA-G en sangre.

Como se puede apreciar en las gráficas posteriormente presentadas, los niveles de sHLA-G en pacientes con Carcinoma Renal resulta elevado con respecto a los controles sanos (media de niveles séricos de 46'6 frente a 18'3 en los controles). Se puede apreciar en la figura 11 la diferencia de rangos de ambos valores.

Niveles séricos sHLA-G (UI/ml)	
sanos	18,3
tumorales	46,6

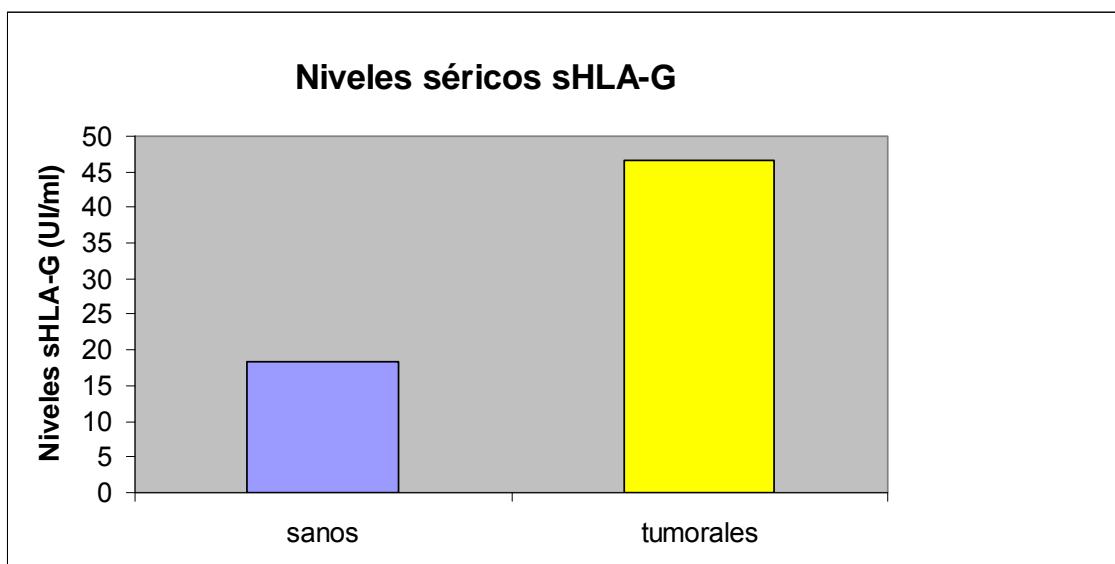


Fig. 10 niveles séricos de sHLA-G en donantes sanos y pacientes tumorales

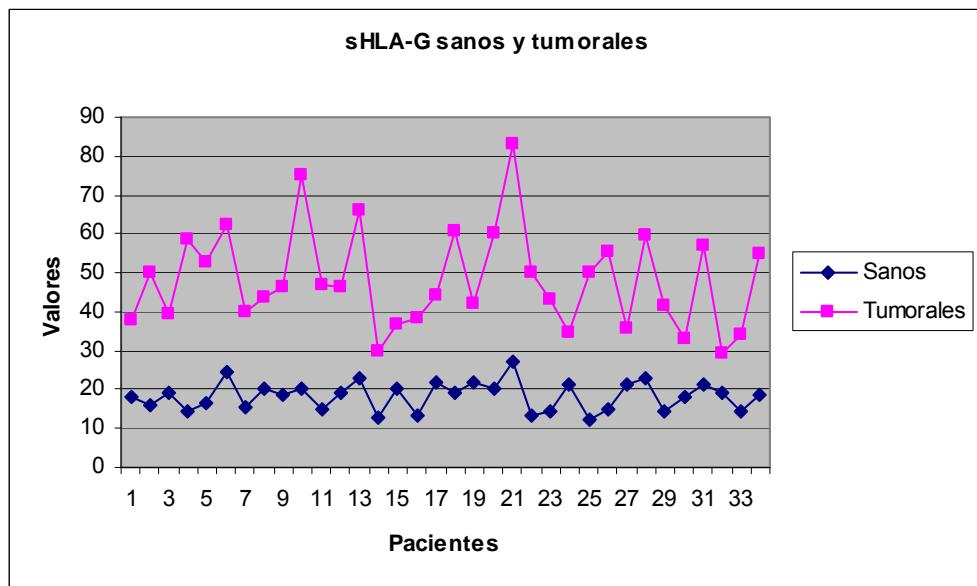


Fig. 11 sHLA-G en donantes sanos y pacientes enfermos

#### **4.4 ANALISIS DE DATOS**

Una vez comprobado que los rangos de valores de sHLA-G tanto en pacientes sanos como en pacientes con enfermedad tumoral se comportan dentro del rango de la normalidad. Se realiza un test paramétrico de Coeficiente de Correlación de Pearson entre los valores de sHLA-G en controles sanos y pacientes con carcinoma renal para constatar la existencia de relación de estas 2 variables cuantitativas. El resultado obtenido es de 0'41, por lo que se aprecia una relación positiva entre ambos resultados.

- Test de Pearson (sHLA-G en donantes sanos y en pacientes)= 0'41

Dado que tanto la expresión de HLA-G como Pancyto, Vimentina, HMW y Ki67, en el estudio inmunohistoquímico, así como los parámetros clínicos, son variables ordinales, no siguen una distribución normal, por ello se aplica al estudio una estadística de tipo no paramétrico, la cual es mas restrictiva e independiente de la distribución, y se emplea para el análisis de estos datos el Coeficiente de Rho de Spearman; comparando ambas entre sí y con los diferentes valores de sHLA-G.

- Test de Rho de Spearman (sHLA-G en pacientes enfermos y HLA-G en pieza tumoral)= 0'4533

De la comparación de sHLA-G en pacientes con Carcinoma Renal y HLA-G en piezas de nefrectomía, se realiza el Test de Rho de Spearman con resultado de 0'4533. Se aprecia, por tanto, una relación positiva entre ambos valores, siendo que cuanto mayor son los valores de sHLA-G, mayores son también en tejido tumoral.

- Test de Rho de Spearman (sHLA-G en pacientes enfermos y Estadio tumoral)= 0'2550

En cuanto a la comparativa mediante el Test de Rho de Spearman de los valores de sHLA-G en pacientes enfermos y el estadio tumoral presentado al diagnóstico, se aprecia una débil relación positiva, siendo por tanto, un estadio tumoral más avanzado cuanto mayor sean los valores de sHLA-G en plasma.

- Test de Rho de Spearman (sHLA-G en pacientes enfermos y progresión)=  
0'6589

Se realiza un test de correlación de datos no paramétricos, el Test de Rho de Spearman, para relacionar los valores de expresión de sHLA-G con el estado de progresión de los pacientes de la muestra, siendo este último un valor dicotómico. Se obtiene un resultado de 0'6589, apreciándose por tanto una fuerte correlación positiva entre ambos parámetros, lo que puede concluir que existe una relación entre los valores de HLA-G soluble en suero y los datos de progresión de la enfermedad en dichos pacientes.

## 5.- DISCUSIÓN

En la literatura hasta la fecha, en tumores sólidos, se ha visto un aumento de la expresión de HLA-G en tejido tumoral frente a tejido sano, con una disminución de respuesta inmune y un aumento de tumorogenicidad cuanto mayor era su expresión. Por ellos podemos decir con lo observado en esta serie que el grado de expresión de HLA-G en el tejido tumoral del Carcinoma de Células Renales podría influir en la evolución de dicha patología como consecuencia de su efecto sobre la respuesta inmune del paciente afecto.

Podría ser, por tanto, un marcador útil en la toma de decisiones en la práctica clínica habitual.

Observamos expresión de HLA-G independientemente del subtipo tumoral (no hay ninguna muestra tumoral de ningún subtipo que no tenga expresión para HLA-G), por lo que se trata de una expresión no subtipo específica. Por lo tanto podemos decir que la expresión de HLA-G puede estar presente en el momento del diagnóstico en cualquier estadio y subtipo histológico.

En cuanto a los resultados obtenidos para el resto de marcadores analizados Pancyto, Vimentina, HMW y Ki67, se obtuvieron patrones de expresión por subtipos histológicos concordantes con lo ya reportado en la literatura.

Se ha realizado una comparación de sHLA-G en pacientes nefrectomizados frente a muestras de suero de sHLA-G de donantes sanos, encontrando una clara elevación en los valores de pacientes con Carcinoma Renal con respecto a los sanos. Dicho lo cual, se concluye que sHLA-G se encuentra elevado en pacientes con Carcinoma Renal frente a donantes sanos, lo que nos lleva a

pensar en este valor como un buen marcador a tener en cuenta en el estudio de estos pacientes y el desarrollo de dicha enfermedad.

Se ha analizado en el estudio la relación desarrollada entre sHLA-G en plasma y HLA-G en piezas de nefrectomía, encontrando una relación positiva en ambos valores, por lo tanto tras observar esta relación podemos concluir que los valores encontrados en la pieza de nefrectomía pueden ser correlacionados en muestras de sangre periférica, las cuales se obtienen de una maneras más sencilla, y nos ofrece la posibilidad de incluirlo en la práctica clínica habitual.

Una vez observada esta relación hemos realizados diversos test no paramétricos de correlación y hemos analizado si existe una relación entre los valores de sHLA-G en plasma y los factores pronósticos principales en la enfermedad oncológica como son el estadio tumoral al diagnóstico y la progresión de la enfermedad. Tras la realización de los diversos análisis observamos una relación positiva con estos factores, indicándonos que a mayor valor de sHLA-G encontramos estadios tumorales más avanzados y mayor probabilidad de progresión a lo largo de la enfermedad. Todo esto nos permite pensar en sHLA-G como un buen factor pronóstico a tener en cuenta en estos pacientes.

Sin embargo, para poder asegurar estos datos obtenidos y trasladarlos a la práctica clínica habitual no bastaría con este estudio, sino que se requiere de un estudio de mayor tamaño muestral y con un análisis estadístico más exhaustivo.

No obstante, este estudio realizado nos permite dilucidar la opción de sHLA-G como un buen factor pronóstico de fácil acceso (una muestra de sangre periférica) para el Carcinoma de Células Renales y nos abre una puerta a las posibilidades de estudio en esta enfermedad y a continuar con la línea de estudio de HLA-G y sHLA-G como marcador de factor pronóstico en esta patología y su uso en la práctica clínica habitual de cara a facilitar el diagnóstico y manejo de estos pacientes.

## 6.- CONCLUSIONES

- Existe expresión de HLA-G en el tejido tumoral de Carcinoma de Células Renales independientemente del Estadio al diagnóstico.
- Existe expresión de HLA-G en el tejido tumoral de Carcinoma de Células Renales independientemente del subtipo celular.
- Existe una relación entre los valores de sHLA-G y HLA-G en pieza tumoral de nefrectomía.
- La expresión de sHLA-G en muestras tumorales es mayor que en muestras sanas y existe una correlación positiva entre ambos, con lo cual podríamos emplear dicho marcador para su uso en el diagnóstico de dicha enfermedad.
- Existe relación entre sHLA-G y factores pronósticos como Estadio tumoral y progresión, pudiendo ser utilizado este marcador como factor pronóstico de fácil acceso.
- Es necesario ampliar la muestra en el estudio, así como la realización de un estudio estadístico más exhaustivo, para obtener resultados más claros y fiables de dicho marcador.

## **ANEXO I**

He de hacer constar que todos los procedimientos realizados en este trabajo de investigación, cumplen co la normativa legal vigente, tal y como ha sido constatado por los dictámenes favorables del Comité Etico de Investigación Clinica de Aragon(CEICA):

- Dr Sanchez Zalabardo, con fecha 09 de julio de 2008, correspondiente al acta CP09/07/08.
- Dra. Berta Sáez Gutiérrez, con fecha 27 de Junio de 2012, correspondiente al acta 12/2012 CP. PI08/0050.

**A continuación se adjunta la hoja de consentimiento informado, y la información adicional para el paciente incluido en el estudio.**

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

### TITULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**Estudio de marcadores tumorales y diversas proteínas en pacientes diagnosticados de hipernefroma.**

Yo,

D.

---

He \_\_\_\_\_ sido \_\_\_\_\_ informado \_\_\_\_\_ por \_\_\_\_\_ el \_\_\_\_\_ Dr. \_\_\_\_\_

de las características y metodología empleadas en la realización del presente estudio.

He sido informado de que se me extraerá una muestra durante el tratamiento quirúrgico, muestra en la que se realizarán las determinaciones planteadas en el estudio.

Autorizo el tratamiento informatizado de mis antecedentes médicos, habiendo sido informado de que los mismos se utilizarán únicamente para la realización del presente estudio y con criterios de confidencialidad.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y se me han contestado



Departamento de Salud, Consumo  
y Servicios Sociales



HOSPITAL CLINICO  
UNIVERSITARIO

“LOZANO BLESA”

Comprendo que mi participación en este estudio es voluntaria y sé que en cualquier momento puedo revocarla, sin dar explicaciones y sin que ello repercuta en mis cuidados médicos.

PRESTO LIBREMENTE MI CONFORMIDAD PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Zaragoza a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008

Firma del médico responsable

Firma del Paciente

CODIGO DEL PACIENTE \_\_\_\_\_

## INFORMACION ADICIONAL PARA EL PACIENTE SOMETIDO AL ESTUDIO

Con el presente documento, pretendemos informar a quien proceda de que: el proyecto que lleva por título,

AISLAMIENTO, EXPANSIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE ADULTAS DE RIÑÓN HUMANO: UNA NUEVA HERRAMIENTA TERAPEÚTICA.

- Supone única y exclusivamente un proyecto de investigación en el que se pretende identificar nuevos marcadores pronósticos y/o diagnósticos que nos ayuden en el tratamiento de la enfermedad renal crónica.
- Se prevé una duración de al menos 4 años para la realización de dicho estudio.
- Los pacientes que den su consentimiento para participar en el estudio, lo harán de forma voluntaria, y podrán abandonar el estudio cuando crean oportuno, sin que esto tenga repercusión alguna en la atención sanitaria del paciente.
- Los participantes en el estudio no habrán de someterse a tratamiento alguno, únicamente se obtendrá una muestra de sangre o tejido (en aquellos casos en los que tenga lugar el procedimiento quirúrgico).
- Se asegura la confidencialidad y garantía del anonimato, para lo cual se utilizará para identificar a cada uno de los individuos un código disociado conocido únicamente por el investigador.
- Está prevista la realización de un estudio genético de los pacientes sometidos al estudio lo cual no implica repercusión alguna, además de que los datos obtenidos podrán estar dispuestos para el paciente en cualquier momento.

Versión Marzo de 2008

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- 1- Rouass-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11520-5
- 2- Rouas-Freiss N, LeMaoult J, Moreau P et al. HLA-G in transplantation: a relevant molecule for inhibition of graft rejection? *Am J Transplant* 2003;3: 11-6
- 3- Rouass-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumour cells with an escape mechanism? *Cancer Res* 2005;65:10139-44
- 4- Ibrahim EC, Guerra N, Lacombe MJ, Angevin E, Chouaib S, Carosella ED, Caignard A, Paul P. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:6838-45
- 5- (6)Tripathi P, Agrawal S. Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. *Cancer Invest* 2006;24:178-86
- 6- (7)Polakova K, Krcova M, Kuba D, Russ G. Analysis of HLA-G expression in malignant hematopoietic cells from leukaemia patients. *Leuk Res* 2003;27:643-8
- 7- (8)Urosevic M, Willers J, Mueller B, Kempf W, Burg G, Dummer R. HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is

- associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* 2002;99:609-17
- 8- Li B-L, Lin A, Zhang X-J, Zhang X, Zhang J-G, Wang Q, Zhou W-J, Chen H-X, Wang T-J, Yan W-H. Characterization of HLA-G expression in renal cell carcinoma. *Tissue Antigens* 2009;74:213-21.
- 9- Rouass-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cell cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(21):11520-5.
- 10-Rouass-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumour cells with an escape mechanism? *Cancer Res.* 2005;65(22):10139-44.
- 11-Ibrahim EC, Guerra N, Lacombe MJ, Angevin E, Chouaib S, Carosella ED, et al. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res.* 2001;61:6838-45.
- 12-Seliger B, Abken H, Ferrone S. HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol.* 2003;24(2):82-7.
- 13-Tripathi P, Agrawal S. Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. *Cancer Invest.* 2006;24(2):178-86.

- 14-Poláková K, Krcová M, Kuba D, Russ G. Analysis of HLA-G expression in malignant hematopoietic cells from leukaemia patients. *Leuk Res.* 2003;27(7):643-8.
- 15-Urosevic M, Willers J, Mueller B, Kempf W, Burg G, Dummer R. HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood.* 2002;99(2):609-17.
- 16-Li B-L, Lin A, Zhang X-J, Zhang X, Zhang J-G, Wang Q, et al. Characterization of HLA-G expression in renal cell carcinoma. *Tissue Antigens.* 2009;74(3):213-21.
- 17-Bukur J, Rebmann V, Grosse-Wilde H, Luboldt H, Ruebben H, Drexler I, et al. Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(14):4107-11.
- 18-Ibrahim EC, Allory Y, Commo F, Gattegno B, Callard P, Paul P. Altered pattern of major histocompatibility complex expression in renal carcinoma: tumor-specific expression of the non-classical human leukocyte antigen-G molecule is restricted to clear cell carcinoma while up-regulation of other major histocompatibility complex antigens is primarily distributed in all subtypes of renal carcinoma. *Am J Pathol.* 2003;162(2):501-8.
- 19-Bukur J, Seliger B. The role of HLA-G for protection of human renal cell-carcinoma cells from immune-mediated lysis: implications for immunotherapies. *Semin Cancer Biol.* 2003;13(5):353-9.

- 20-Chen HX, Lin A, Shen CJ, Zhen R, Chen BG, Zhang X, et al. Upregulation of human leukocyte antigen-G expression and its clinical significance in ductal breast cancer. *Hum Immunol.* 2010;71(9):892-98.
- 21-Mackay J, Jemal A, Lee NC, Parkin DM. *The cancer atlas.* Atlanta: American Cancer Society; 2006.
- 22-Linehan WM, Rini BI, Yang JC. Cancer of the kidney. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer Principles and Practice of Oncology.* 8th ed. Philadelphia; 2008. p. 1331-58.
- 23-Mellado González B, Martínez Bueno A, Ribal Caparrós MJ. Carcinoma renal. In: Cortés-Funes H, Colomer Bosch R, editors. *Tratado de Oncología.* 1st ed. Barcelona: P. Permanyer; 2009. p. 53-73.
- 24-Arranz Arija JA, Elez Fernández E, García del Muro Solans X, Jiménes Colomo L, López López JJ, Maroto Rey P. *Cáncer de Riñón.* 1st ed. Madrid: Arán Ediciones; 2008.
- 25-Cohen HT, Mc Govern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2005;353(23):2477-90.
- 26-Pavlovich CP, Schmidt LS, Phillips JL. The genetic basis of renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am.* 2003;30(3):437-54, vii.
- 27-Heng DYC, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-

- targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol.* 2009;27(34):5794-99.
- 28-Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 1999;17(8):2530-40.
- 29-Kidney. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th edition. New York: Springer; 2010. p. 479-83.
- 30-Neumann HP, Wiestler OD. Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. *Lancet.* 1991;337(8749):1052-4.
- 31-Schmidt LS, Pawlovich CP. Síndromes hereditarios de carcinoma de células renales. In: Alonso Sánchez AM, Benavides Orgaz MM, Blanco Guillermo I, Brunet Vidal J, García-Foncillas López J, Mayordomo Cámara JI, Pérez Segura P, Urioste Azcorra M, editors. *Cáncer Hereditario*. Madrid: SEOM; 2006. p. 531-61.
- 32-Le Discorde M, Moreau P, Sabatier P, Legeais JM, Carosella ED. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol.* 2003;64(11):1039-44.
- 33-Cirulli V, Zalatan J, McMaster M, Prinsen R, Salomon DR, Ricordi C, et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes.* 2006;55(5):1214-22.

34-Menier C, Rabreau M, Challier JC, Le Discorde M, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood*. 2004;104(10):3153-60.

35-Dunker K, Schlaf G, Bukur J, Altermann WW, Handke D, Seliger B. Expression and regulation of non-classical HLA-G in renal cell carcinoma. *Tissue Antigens*. 2008;72(2):137-48.

36-Ponte M, Cantoni C, Biassoni R, Tradori-Cappai A, Bentivoglio G, Vitale C, et al. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1- specific receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(10):5674-9.

37-Navarro F, Llano M, Bellon T, Colonna M, Geraghty DE, Lopez-Botet M. The ILT2 (LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol*. 1999;29(1):277-83.

38-Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I, Sedlik C, Dausset J, Rouas-Freiss N, et al. HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J Reprod Immunol*. 1999;43(2):203-11.

39-Algarra I, García-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53(10):904-10.

40-Monneret G, Voirin N, Krawice-Radanne I, Bohé J, Lepape A, Rouas-Freiss N, et al. Soluble human leukocyte antigen-G5 in septic shock: marked and persisting elevation as a predictor of survival. *Crit Care Med.* 2007;35(8):1942-7.

41-Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED. The alpha 1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits citotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(10):5249-54.

42-Carosella ED, Paul P, Moreau P, Rouas-Freiss N. HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. *Immunol Today.* 2000;21(11):532-4.

43-Cantoni C, Verdiani S, Falco M, Pessino A, Cilli M, Conte R, et al. p49, a putative HLA-class I specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur J Immunol.* 1998;28(6):1980-90. Erratum in: *Eur J Immunol* 1998;28(10):3398.

44-Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M, Braud VM, et al. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(15): 8856-61.

45-Clements CS, Kjer-Nielsen L, Kostenko L, Hoare HL, Dunstone MA, Moses E, et al. Crystal structure of HLA-G: a non classical MHC class I molecule at the fetal-maternal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(9):3360-5.

- 46-Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell CD94/Nkg2A, B and C. *Nature*. 1998;391(6669):795-9.
- 47-Bahri R, Hirsch F, Josse A, Rouas-Freiss N, Bidere N, Vasquez A, et al. Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *J Immunol*. 2006;176(3):1331-9.
- 48-Le Maoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(18):7064-9.
- 49-Le Rond S, Azema C, Krawice-Radanne I, Durrbach A, Guettier C, Carosella ED, et al. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. *J Immunol*. 2006; 176(5):3266-76.
- 50-Urosevic M, Kurrer MO, Kamarashev J, Mueller B, Weder W, Burg G, et al. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am J Pathol*. 2001;159(3):817-24.
- 51-Nuckel H, Rebmann V, Durig J, Duhrsen U, Grosse-Wilde H. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105(4):1694-8.
- 52-Shido F, Ito T, Nomura S, Yamamoto E, Sunigama S, Ino K, et al. Endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 mediates leukemia inhibitory

- factor-induced cell surface human leukocyte antigen-G expression in JEG-3 choriocarcinoma cells. *Endocrinology*. 2006;147(4):1780-8.
- 53-Moreau P, Faure O, Lefebvre S, Ibrahim EC, O'Brien M, Gouraud L, et al. Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. *Transplant Proc*. 2001;33(3):2277-80.
- 54-Yan WH, Lin AF, Chang CC, Ferrone S. Induction of HLA-G expression in a melanoma cell line OCM-1A following the treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cell Res*. 2005;15(7):523-31.
- 55-Seliger B, Schlaf G. Structure, expression and function of HLA-G in renal cell carcinoma. *Sem Cancer Biol*. 2007;17(6):444-50.
- 56-Pyo CW, Williams LM, Moore Y, Hyodo H, Li SS, Zhao LP, et al. HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines I genes. *Immunogenetics*. 2006;58(4):241-51.
- 57-Harrison GA, Humphrey KE, Jakobsen IB, Cooper DW. A 14-bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. *Hum Mol Genet*. 1993;2(12):2200.
- 58-Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, et al. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet*. 2003;72(6):1425-35.
- 59-Hara N, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y. Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with

- anti-HLA-G specific antibody 87G and anti-cytokeratin antibody CAM 5.2. *Am J Reprod Immunol.* 1996;36(6):349-58.
- 60-Glas J, Torok HP, Tonenchi L, Wetzke M, Beynon V, Teshome MY, et al. The 14-bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Chron's disease and is associated with ileocecal resection in Chron's disease. *Int Immunol.* 2007;19(5):621-6.
- 61-Bukur J, Malenica B, Huber C, Seliger B. Altered expression of nonclassical HLA class Ib antigens in human renal cell carcinoma and its association with impaired immune response. *Hum Immunol.* 2003;64(11):1081-92.
- 62-Truong LD, Shen SS. Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(1):92-109.
- 63-Hes O, Michal M, Kuroda N, Martignoni G, Brunelli M, Lu Y, et al. Vimentin reactivity in renal oncocytoma: immunohistochemical study of 234 cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(12):1782-88.
- 64-Vaquero M. Manual de calidad de inmunohistoquímica en anatomía patológica. Donosita: Hospital Donosita Osakidetza; 2007.