



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

Departamento de Patología

Facultad de Medicina y Odontología

**EFFECTO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE PERSISTENTE A BAJAS DOSIS
EN LA ANGIOGÉNESIS DEL CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS
CLARAS. ESTUDIO MORFOMÉTRICO COMPARATIVO DE TUMORES
PROCEDENTES DE TRES REGIONES GEOGRÁFICAS.**

Tesis doctoral presentada por Gerardo José Valencia Villa, para optar al título de
Doctor en Medicina y Cirugía por la Universitat de València

Directores de tesis:

Prof. Antonio Llombart Bosch

Profa. Amparo Ruiz Sauri

Profa. Carmen Carda Batalla

Valencia, Diciembre 2012

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi soporte y mi guía.

A mis padres por su inagotable apoyo a mi vida.

A mi familia por el constante y casi fanático respaldo a este trayecto de mi superación.

Al Dr. Antonio Llombart Bosch por permitirme hacer parte de su excelente grupo de trabajo, enseñarme innumerables conocimientos y darme consejos importantes de vida.

A las Dras. Amparo Ruiz-Sauri y Carmen Carda por su apoyo indescriptible tanto académico como personal, las llevo en el corazón.

A la Dra. Alina Romanenko por su invaluable contribución a la tesis.

Al Dr. Antonio Ferrández y la Dra. Adriana Canoso por facilitarme, como un padre y una hermana respectivamente, el aprendizaje de conocimientos en anatomía patológica.

A los Dres. Jesús Pérez, Raúl García y Heidy García con sus respectivos asistentes por su inagotable ayuda en la consecución y preparación de las muestras desde Colombia.

A los Dres. Miguel Pérez y Humberto Abello QEPD, por su constante apoyo y disposición.

A la Dra. María Sancho-Tello, el Dr. Sergio Almenar Medina, el Dr. Javier Martín de Llano, el Dr. Javier Boix, el Dr. Francisco Vera y el Dr. Santiago Peydró por sus valiosos aportes al desarrollo de mi trabajo y a mi crecimiento personal.

A todo el grupo de Docentes y Becarios del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia de los que siempre recibí apoyo y amistad.

A Laura López por la realización de las técnicas de inmunohistoquímica de mi tesis y su amistad sin condición.

A Elisa Alonso, Amparo Solaz, Alejo Sempere y todo el personal de laboratorio de Anatomía patológica del Hospital clínico de Valencia por todo lo que aprendí de su admirable trabajo.

A José Benavent por todo el incondicional apoyo recibido de su parte, durante toda mi estancia académica en la Facultad.

A Manolo Pino quien en compañía de Vicen Beltrán, y Augusto Fernández fueron mis ángeles administrativos en el Departamento de Patología.

A las Dras. Nelly Lecompte, Lila Visbal, Beatriz de Torres y el Dr. Hernando Baquero porque sin su apoyo este sueño no hubiese sido realizable.

A mi segunda familia, los verdaderos amigos.

A Camilo José Valencia A.

*Este trabajo ha sido efectuado con una beca de la **Universidad del Norte** (Barranquilla, Colombia) así como con ayuda de la junta provincial asociada de la **AECC**, Valencia y de la **Fundación Instituto Valenciano de Oncología (IVO)**.
Valencia, España.*

INDICE DE CONTENIDOS

1 INTRODUCCIÓN GENERAL	15
1.1 Origen de los vasos	15
1.1.1 Tipos de angiogénesis.....	16
1.1.2 Adaptaciones postnatales.....	17
1.1.3 Angiogénesis en los procesos neoplásicos	17
1.1.4 Aplicaciones actuales del concepto de angiogénesis.....	26
1.2 Carcinoma de células renales	27
1.2.1 Definición y epidemiología	27
1.2.2 Clasificación histopatológica.....	28
1.2.3 Carcinoma renal de células claras (ccRCC)	29
1.3 Radiaciones ionizantes y neoplasia	33
1.3.1 Efectos generales	33
1.3.2 Bajos dosis por larga duración de radiaciones ionizantes (CPLDIR).....	34
1.3.3 CPLDIR en RCC	37
1.4 Técnicas de inmunohistoquímica	43
1.4.1 Generalidades	43
1.4.2 Marcaje de procesos angiogénicos	44
1.5 Métodos de cuantificación. Morfometría	47
1.5.1 Generalidades	47
1.5.2 Cuantificación de vasos: Densidad microvascular	50
1.5.3 Cuantificación de factores en procesos angiogénicos	52
1.6 Hipótesis y objetivos	55
1.6.1 Hipótesis	55
1.6.2 Objetivos.....	56
2 METODOLOGÍA	59
2.1 Material	59
2.1.1 Selección del material.....	59
2.1.2 Construcción y organización de las micromatrices de tejidos (TMA)	60
2.1.3 Diagnóstico histopatológico	63
2.1.4 Identificación de zonas normales y tumorales para TMA.....	64
2.2 Métodos	64
2.2.1 Análisis de la angiogénesis por inmunohistoquímica	64
2.2.2 Cuantificación morfométrica.....	66
2.3 Análisis estadístico	75

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
3.1 Resultados	79
3.1.1 Caracterización general de la población del estudio	79
3.1.2 Mecanismos de angiogénesis	84
3.1.3 Correlación entre las características generales de los grupos.....	113
3.1.4 Relación entre las características generales y los mecanismos de angiogénesis	117
3.1.5 Relación entre los mecanismos de angiogénesis entre sí	131
3.2 Discusión	141
3.2.1 Patrones de las distintas características clínicas	143
3.2.2 Densidad microvascular en población de estudio	145
3.2.3 Expresión de factores	153
3.2.4 Patrones de expresión celular	161
4 CONCLUSIONES	167
5 BIBLIOGRAFÍA	171

ABREVIATURAS Y SIGLAS

- ACTH: hormona adrenocorticotropa.
- AgNOR: proteínas asociadas a las regiones organizadoras nucleolares argirófilas.
- ALLB: Antonio Llombart-Bosch.
- AR: Alina Romanenko.
- ARS: Amparo Ruiz-Saurí.
- bHLH: doble hélice de tipo básico.
- CAIX: anhidrasa carbónica IX.
- CAM: molécula de adhesión celular.
- ccRCC: carcinoma renal de células claras.
- CIS: Carcinoma in situ.
- CPLDIR: exposición por largo tiempo a bajas dosis de radiaciones ionizantes
- DIABLO: proteína con bajo pI de unión directa a las proteínas inhibidoras de apoptosis.
- MVD: densidad microvascular.
- ECOG: grupo cooperativo oncológico oriental.
- EE: error estándar.
- EGF: factor de crecimiento epidérmico.
- EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico.
- FAK: quinasa de adhesión focal.
- FGF: factor de crecimiento de los fibroblastos.
- FH: fumarato hidratasa.
- FHIT: tríada de la histidina frágil.
- FPTC-PRN: carcinoma papilar familiar tiroideo - tumor papilar renal.
- GTP: glutamil transpeptidasa.
- GV: Gerardo Valencia Villa.
- HGFR: receptor del factor de crecimiento del hepatocito.
- HIF: factor inducido por hipoxia.
- HLRCC: leiomiomatosis hereditaria y cáncer renal familiar, síndrome de.
- HPH: hidroxilasa de la prolina.
- HPT-JT: síndrome de hiperparatiroidismo-tumor mandibular.
- HR: razón de tasas.
- IAP: proteínas inhibidoras de apoptosis.
- IC: intervalo de confianza.
- IFN: interferón.
- IGF: factor de crecimiento de insulina.
- IGFR: receptor del factor de crecimiento de insulina.
- IL: interleukina.
- ILE: intervalo libre de enfermedad.
- iNOS: sintasa inducible del ácido nítrico.
- IR: radiaciones ionizantes.
- JP: Jesús Pérez García.
- KS: escala de Karnofsky.
- LOH: pérdida de heterocigosidad.
- MAPK: proteína quinasa mitógeno-activada.
- MDR: gen de resistencia a múltiples drogas.
- MMP: metaloproteasa de matriz.
- m-TOR: diana de la rapamicina en mamíferos.

- NGF: factor de crecimiento derivado de neuronas.
- ODD: dominio de degradación dependiente de oxígeno.
- OMS: organización mundial de la Salud.
- PAS: Per/ARNT (aryl hydrocarbon nuclear transporter)/Sim.
- PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular nuclear.
- PCR: reacción de polimerasa en cadena.
- PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PIP: fosfatidil-inositol-fosfato.
- PKB: proteína kinasa B (AKT).
- PLAU: activador del plasminógeno de tipo uroquinasa.
- PLAUR: receptor del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa.
- PIGF: factor de crecimiento placentario.
- PET: tomografía por emisión de positrones.
- PTEN: fosfatasa y homólogo de tensina con delección en el cromosoma 10.
- PTH: paratohormona.
- pVHL: proteína Von Hippel Lindau.
- RCC: carcinoma de células renales.
- RG: Raul García Toloza.
- RSPAN: Nefropatía atípica proliferativa esclerosante por radiación.
- RTK: receptores tirosin-kinasa.
- STAT: proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción.
- TAC: tomografía axial computarizada.
- TMA: tissue microarrays/ microseries de tejido.
- TCR: receptores de células T.
- TGF: factor de crecimiento transformante.
- TK: tirosin-kinasa.
- TSC: complejo esclerosis tuberosa.
- VEGF: factor de crecimiento vascular del endotelio.
- VEGFR: receptor del factor de crecimiento vascular del endotelio.
- VHL: Von Hippel Lindau.
- VPF: factor de permeabilidad vascular (VEGF).

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Origen de los vasos

La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos capilares a partir de vasos preexistentes; mientras que la formación de nuevos vasos sin un precedente vascular, es denominado vasculogénesis [1,75,76]. La angiogénesis es esencial en los procesos de crecimiento y diferenciación en la etapa prenatal humana. Sin embargo, en la etapa postnatal la neoformación vascular es poco frecuente y está limitada a ciertos procesos normales y patológicos [1,144,145].

Durante el periodo embrionario, la acción inductora de sustancias secretadas por el endodermo subyacente hace que algunas células del mesodermo se diferencien en angioblastos, de estos se desarrollan las células endoteliales que se unen para formar largos tubos o vasos llamados cordones angioblásticos. La coalescencia de estos tubos forma una red penetrante de plexos angioblásticos, que establecen la configuración inicial del sistema circulatorio [1]. A partir de la permeabilización de los cordones se inicia el proceso de formación de vasos de novo o vasculogénesis (fig. 1.1A). A consecuencia del aumento de las necesidades nutricionales y de oxígeno, el tejido secreta sustancias que promueven la aparición de la angiogénesis (fig. 1.1B) [75,76].

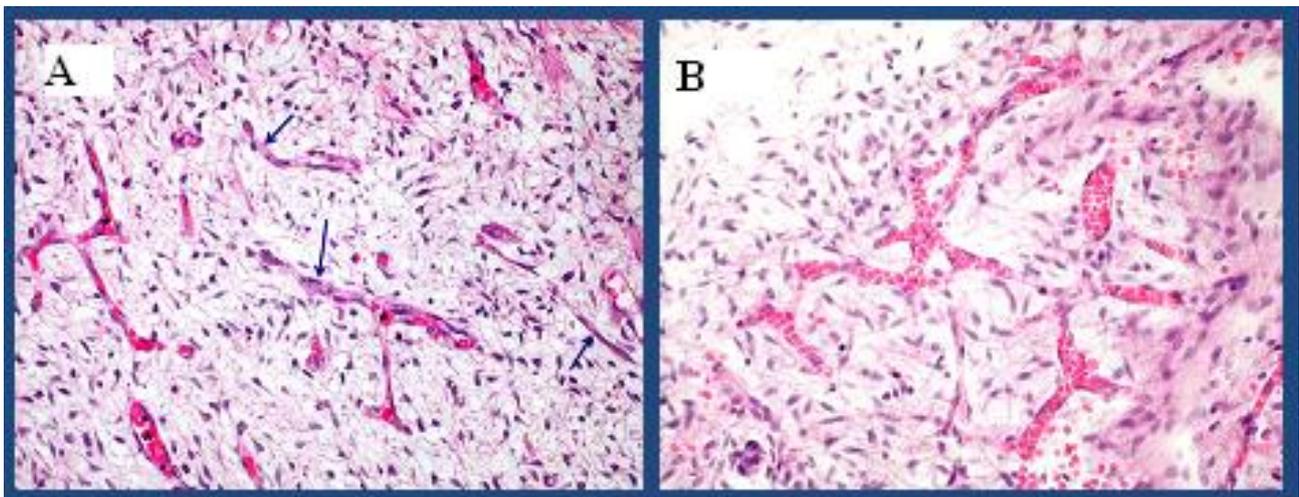


Figura 1.1 Formación de vasos: tejido embrionario teñido con H-E. Se observa (A) vasculogénesis, las flecha señalan los cordones de angioblastos (B) angiogénesis, nuevos vasos saliendo de vasos pre-existentes.

Los procesos de angiogénesis se esquematizan en etapas sucesivas [145,146]:

1. **Desestabilización:** en esta etapa los vasos experimentan una disociación de las células endoteliales con hidrólisis de la membrana basal y disociación de las células de la pared vascular.
2. **Proliferación:** los elementos celulares disociados inician su proliferación.
3. **Asociación:** las células endoteliales se disponen delimitando estructuras tubulares y forman la membrana basal.
4. **Estabilización:** finalmente los vasos neo-formados maduran y se estabilizan gracias a las interacciones de las células de la pared vascular y a la resistencia de las células a la apoptosis.

1.1.1 Tipos de angiogénesis

Existen dos tipos de angiogénesis conocidos en inglés como: “sprouting” y “splitting”. Cualquiera de los dos proviene de un canal (o red de canales) endotelial ya formado, a partir de donde se desarrollaran los vasos “hijos”. En el “sprouting” se originan nuevos vasos a partir de brotes formados en vasos pre-existentes, mientras que en el “splitting”, la pared capilar de un vaso ya existente se invagina hacia su luz para dividir este vaso en dos [1].

El “**sprouting**” ocurre en varias etapas bien caracterizadas [1, 75,76]:

- 1- Diferentes factores de crecimiento angiogénicos activan a las células endoteliales de los vasos preexistentes.
- 2- Las células endoteliales activadas expresan proteasas que degradan la membrana basal con la finalidad de migrar de las paredes del vaso original “matriz”.
- 3- Estas células endoteliales proliferan dentro del mesénquima circundante y forman una protrusión sólida que conecta con el vaso original mediante algún vaso vecino preexistente o también neoformado previamente.
- 4- Al alargarse la protrusión, las células endoteliales migran linealmente usando integrinas avb3. La luz del vaso se forma durante esta migración celular.

En el “**splitting**” o división angiogénica, se presentan cuatro etapas [1, 75, 76]:

- 1- En primer lugar, las dos paredes opuestas del capilar establecen una zona de contacto.
- 2- En segundo lugar, las uniones de las células endoteliales se reorganizan y el vaso se perfora para permitir que los factores de crecimiento y las células penetren en la luz.
- 3- En tercer lugar, se forma un brote entre los dos nuevos vasos en la zona de contacto que puede contener pericitos y miofibroblastos. Estas células empiezan a sintetizar las fibras de

colágeno, las glicoproteínas y los proteoglicanos del tejido conjuntivo en el brote, a fin de proporcionar una matriz extracelular para el crecimiento de la luz del vaso.

4- Finalmente, el brote crece adoptando una arquitectura vascular.

Los dos modelos de formación de nuevos vasos se observan simultáneamente y la predominancia de cada uno en el proceso angiogénico parece depender del tejido y sus necesidades. El “splitting” permite un gran aumento en el número de capilares sin el correspondiente aumento en el número de células endoteliales, que es de especial trascendencia en el desarrollo embrionario, ya que no hay recursos suficientes para crear una estructura microvascular rica en células nuevas, cada vez que un nuevo vaso se desarrolla [7]. Mientras el “sprouting” además de ser el primero en ser descrito en la formación vascular embrionaria, ha sido predominante en la evidencia de procesos angiogénicos de tejidos en remodelación y tumores en crecimiento [127].

1.1.2 Adaptaciones postnatales

En la vida postnatal las células endoteliales se encuentran en estado de reposo (G0) y tienen una vida promedio de 1.200 días [102], por lo que forman una red vascular bastante estable, pudiéndose observar procesos de remodelación y elongación de redes vasculares como adaptación a las transformaciones sistémicas. En condiciones normales existe un equilibrio entre los factores pro/anti angiogénicos, manteniéndose el control de los procesos angiogénicos, pero este se modifica como respuesta a diferentes causas patológicas. Ellas van desde la angiogénesis reactiva a un estímulo inflamatorio (episodio angiogénico de la reparación tisular), los procesos reactivos inflamatorios autoinmunitarios, los episodios de crecimiento tisular hamartomatoso disgenético no maligno (hemangiomas), hasta la angiogénesis tumoral [9].

1.1.3 Angiogénesis en los procesos neoplásicos

La angiogénesis tumoral consiste en la proliferación de una red de vasos sanguíneos que penetra en la masa neoplásica, proporcionando nutrientes y oxígeno y eliminando productos de desecho. En las neoplasias, las fases de crecimiento tumoral y metástasis dependen de la angiogénesis “in situ”. La neovascularización que se presenta facilita la proliferación acelerada y desmedida de las células tumorales [3,73,74].

La morfología de la neovascularización tumoral se caracteriza por mostrar vasos tortuosos, de calibre aumentado e irregular y un exceso de ramificaciones e interconexiones vasculares (fig. 1.2); mientras que funcionalmente el flujo sanguíneo es insuficiente, lo que da como resultado zonas hipóxicas y

con disminución del pH [78,79,142]. Además los vasos tumorales son anormalmente permeables por sus fenestraciones, las numerosas vesículas y poros transcelulares [77]. Con poco tiempo para su organización y maduración, su membrana basal es discontinua o inexistente, sus células endoteliales se superponen y proyectan prolongaciones hacia la luz vascular. A consecuencia del aumento de la permeabilidad se produce edema y microhemorragias [80,85].

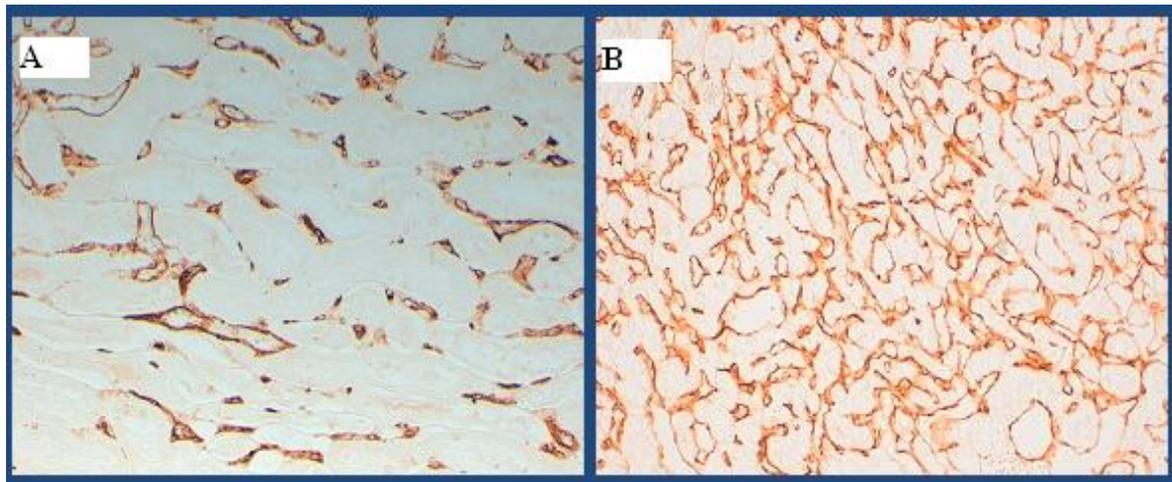


Figura 1.2 Angiogénesis neoplásica en RCC vs vascularización renal normal. A- Muestra la trama vascular inmunomarcada con Cd31 en tejido renal normal. B- Muestra la trama vascular abundante y de estructura irregular marcada con Cd 31 en tejido renal con ccRCC.

En las neoplasias, además del “sprouting” y “splitting” como formas de angiogénesis, ocurre la llamada mimetización vascular o “vascular mimicry” y el mosaicismo vascular o “mosaic vessels”. La “vascular mimicry” se produce por la transformación de algunas células tumorales en un fenotipo celular endotelial (seudoendotelio) y su progresiva incorporación a la red vascular del tumor. Mientras que en el “mosaic vessels” las células tumorales clásicas se ponen en contacto con la luz vascular y se intercalan entre células endoteliales neoformadas, formando así mosaicos en la superficie de los capilares intratumorales (fig. 1.3).

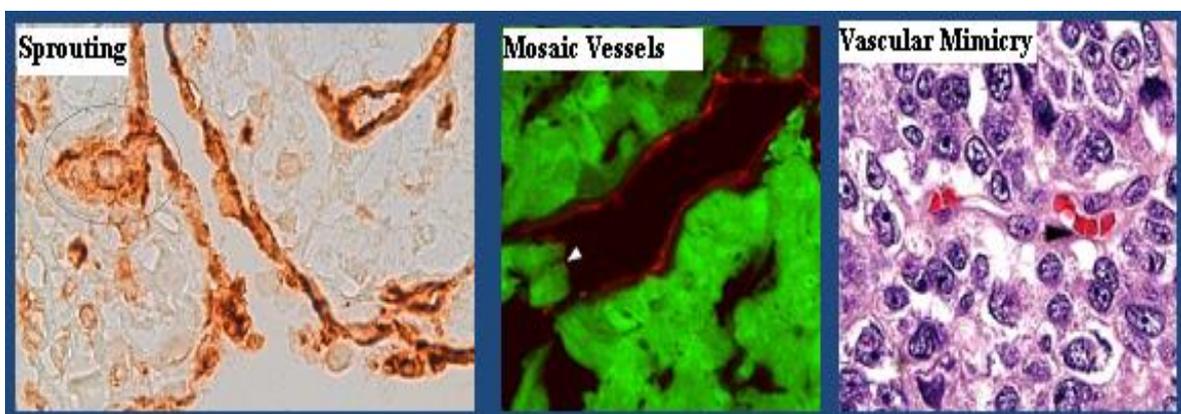


Figura 1.3 Tipos de vascularización en la neoplasia

1.1.3.1 Fase de crecimiento tumoral

La proliferación incontrolada de células neoplásicas induce una neovascularización. Esta se produce porque las células tumorales liberan moléculas que actúan sobre el estroma peritumoral normal, cuyas células responden produciendo proteínas que estimulan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, imprescindibles para que continúe el crecimiento tumoral [2]. El equilibrio normal pro/anti angiogénico mantenido en el tejido normal, se altera por un aumento de los factores pro-angiogénicos provenientes del tumor y su periferia. En general se acepta que para que un tumor sólido pueda crecer por encima de un tamaño crítico de 2 mm^3 o más de 10 millones de células, necesita de la formación de nuevos vasos [10].

En la angiogénesis tumoral se da primero una fase avascular, en la que los tumores alcanzan un diámetro inferior a 2 mm^3 permaneciendo como tumores latentes, siendo este el resultado del equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis. Algunos de estos pequeños tumores logran pasar a una segunda fase denominada vascular, en la que el tumor crece de forma exponencial (fig. 1.4) [2]. Sabemos que el oxígeno y los nutrientes llegan por difusión a las células tumorales, por lo que éstas y los vasos no pueden estar separados por una distancia superior a los $100\text{-}200 \mu\text{m}$ [73,74]. Estas dos fases están separadas por el llamado "angiogenic switch" y consiste en la aparición de un desequilibrio entre los factores pro y anti angiogénicos, a favor de los factores proangiogénicos [3,146,147].

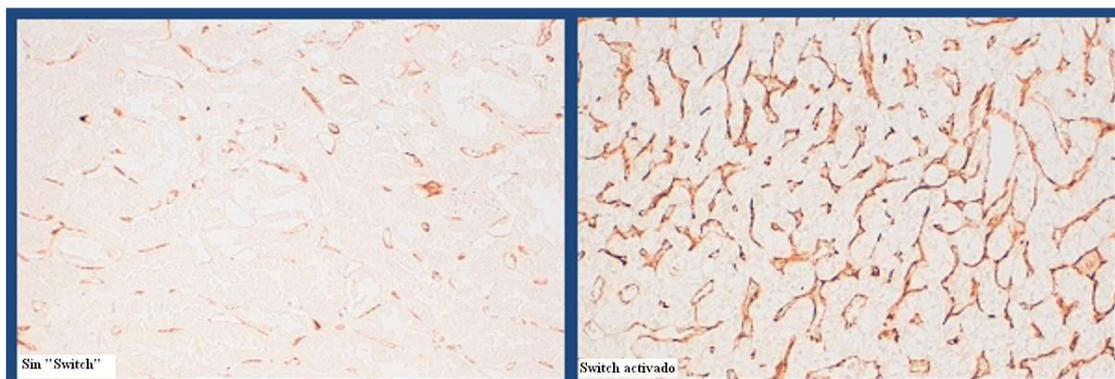


Figura 1.4 "Switch Angiogénico". Tejido renal con ccRCC sin y con su activación

1.1.3.2 Fase metastásica

El mecanismo de invasión tumoral y metástasis es extremadamente complejo y solo parcialmente conocido, sin embargo, hoy sabemos que el establecimiento y crecimiento de las metástasis son influenciados por factores solubles secretados por el tumor sólido original [148]. Entre estos factores al principio predominan los inhibidores endógenos, lo que mantiene al tumor primario o a la

metástasis en un estado de crecimiento mínimo o de reposo. Este estado de latencia se caracteriza simultáneamente, por la proliferación anormal, el aumento de la apoptosis y la neo-vascularización insuficiente. Posteriormente, se produce un desequilibrio local entre los factores angiogénicos y sus inhibidores, que conduce al crecimiento de la neoplasia [148]. En estas fases iniciales las células tumorales se parecen bastante al tejido normal y por consiguiente conservan su afinidad homofílica, es decir, afinidad por las estructuras tisulares con las que habitualmente se relacionan. Conforme el tumor va creciendo, se van produciendo mutaciones que hacen que las células pierdan la mencionada afinidad y coherencia con el resto del tejido.

Numerosas quimiocinas cumplen un rol importante en la angiogénesis tumoral y por consiguiente en la preparación para la fase metastásica. En este caso, estas son producidas al parecer por las células tumorales (tumor primario) y prepararían a los órganos diana para atraer por quimiotaxis a las células tumorales [149].

1.1.3.3 Factores que regulan la angiogénesis neoplásica

Actualmente se han identificado numerosas sustancias que inducen la angiogénesis (tabla 1.1), muchas de estas son secretadas por los tumores o por las células inmunes que han infiltrado la zona. La angiogénesis también es estimulada por algunos péptidos derivados de la proteólisis de la membrana basal y algunos oligosacáridos derivados del ácido hialurónico [148]. Los estímulos para que estos promotores funcionen son el estrés metabólico, como la hipoxia, acidosis e hipoglucemia, así como la tensión por el crecimiento tumoral, la inflamación o la respuesta inmune en el tejido [146,148]. Muchos son factores de crecimiento y citocinas con efectos ya conocidos sobre una gran variedad de tipos celulares [146,149]. Otros como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tienen receptores principalmente situados sobre la célula endotelial y funciona casi exclusivamente como regulador de la angiogénesis [40].

- **El VEGF** actúa específicamente sobre el endotelio induciendo la proliferación y supervivencia de las células endoteliales. Su expresión en la etapa embrionaria es muy amplia, detectándose en pulmón, glándula adrenal, testículo, riñón y cerebro [99,100]; resultando esencial para la vasculogénesis y para la angiogénesis [85,86]. En el adulto en condiciones normales la expresión del VEGF es baja o inexistente en la mayoría de los tejidos, y está limitada a órganos que poseen capilares con endotelio fenestrado como los glomérulos renales y los plexos coroides [100].

La familia de factores de crecimiento VEGF incluye cinco miembros: el VEGF (o VEGF-A), factor de crecimiento placentario (PlGF), el VEGF-B, el VEGF-C y el VEGF-D. Los homólogos del VEGF producidos por virus Orf se denominan colectivamente VEGF-E, y un homólogo aislado del veneno de serpiente se llama VEGF-F. El VEGF-A es una glicoproteína dimérica, cuyas isoformas difieren en su afinidad por algunos componentes de la matriz extracelular, afectando principalmente a su biodisponibilidad [150].

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF o VEGF-A) ha demostrado desempeñar un papel fundamental en la regulación de la angiogénesis normal y patológica. “In vitro” el VEGF-A es un potente mitógeno para las células endoteliales micro y macrovasculares. Sin embargo, carece de actividad mitogénica para otros tipos de células. “In vivo” el VEGF-A está involucrado en el desarrollo de los vasos sanguíneos y es también un potente inductor de la permeabilidad vascular [38,152].

Los ligandos del VEGF se unen a los diferentes sitios de los tres receptores tirosina-quinasa transmembrana, en su mayoría endoteliales. Todos los VEGFRs tienen un dominio intracelular para tirosinquinasa y una serie de dominios extracelulares parecidos a una inmunoglobulina en la parte extracelular. Además, algunas isoformas del VEGF-A se unen a sitios de la matriz extracelular. Algunas integrinas, también forman complejos con los VEGFs y los VEGFRs [36,38]. La actividad angiogénica del VEGF-A está mediada por receptores tirosinquinasa de alta afinidad, del VEGFR-1 y el VEGFR-2. Estos son Co-expresados en la mayoría de las células endoteliales, aunque se sabe que los VEGFR-2 dominan la respuesta angiogénica (fig. 1.5) [37].

El factor de crecimiento placentario (PlGF) se une al VEGFR-1, pero no al VEGFR-2 y aunque no es mitogénico, puede potenciar la acción del VEGF-A “in vitro” e “in vivo”. El VEGF-B se une selectivamente al VEGFR-1 y está implicado en la regulación de la degradación de la matriz extracelular, adhesión y migración celular. El VEGF-C y el VEGF-D tienen extensiones N- y C-terminal que no están presentes en otros miembros de la familia VEGF. El VEGF-C y VEGF-D no son afines al VEGFR-1, mientras que los dos funcionan como ligandos para el VEGFR-2 y el VEGFR-3 (fig. 1.5) [37].

El VEGFR-3 es un receptor tirosinquinasa expresado en las células precursoras endoteliales y más tarde en el desarrollo de las células endoteliales linfáticas. Tanto el VEGF-C y el VEGF-D se sabe

que afectan principalmente el desarrollo de los vasos linfáticos (linfangiogénesis) a través de la activación del VEGFR-3 (fig. 1.5) [37,154].

En general la falta de genes para la expresión del VEGF y/o la falta o ausencia del VEGFR-2 resultan letales en la embriogénesis, hacen difícil el desarrollo postnatal inmediato e interfieren en el desarrollo de tejidos activos en angiogénesis (tejido óseo en crecimiento, ovario y testículo) [73,74,82,83,84]. Mientras que la expresión del VEGF no es esencial en la mayoría de los tejidos del animal adulto.

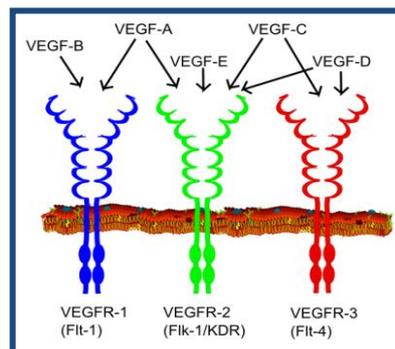


Figura 1.5 Familia del VEGF y sus VEGFRs

- **Las angiopoyetinas (Ang)** son glicoproteínas secretadas de forma autocrina por las células endoteliales y de forma paracrina por otras células. Estas se unen al receptor tirosinquinasa transmembrana Tie-2 específica de las células endoteliales. Las Ang participan en la remodelación angiogénica que conduce a la formación de vasos maduros. La Ang-1 se expresa en todos los tejidos y promueve la supervivencia del endotelio y la maduración de los vasos; mientras la Ang-2 tiene una expresión muy delimitada a tejidos que experimentan remodelación vascular y a tejidos tumorales. La secreción de Ang-2 provoca una desestabilización de los vasos, así estos pueden evolucionar hacia una regresión vascular (apoptosis de las células disociadas) si están en ausencia del VEGF ó hacia la angiogénesis (proliferación de las células disociadas) si están en presencia del VEGF [87,88].

- **El factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1)** es considerado un regulador maestro de la angiogénesis como respuesta a la hipoxia [11,222]. La hipoxia resulta esencial en el proceso de la angiogénesis tumoral, puesto que la expresión del ARNm del VEGF se estimula rápida y reversiblemente por la exposición a una presión parcial de oxígeno baja, tanto en células normales como transformadas; este efecto es mediado principalmente por el HIF-1 [223].

El HIF-1 es un heterodímero de 120 kDa constituido por tres sub-unidades α : las HIF-1 α , HIF-2 α y la HIF-3 α [70], más una subunidad β conocida con el nombre de translocador nuclear del receptor Ah, Arnt, de 80 kDa, los cuales organizan proteínas nucleares constitutivas [71]. Ambas subunidades contienen un dominio denominado bHLH (basic Helix-Loop-Helix), y un dominio de interacción proteína-proteína PAS (Per Arnt Sim) [72]. Los miembros de la familia bHLH, HIF-1 α y HIF-1 β se dimerizan para formar un complejo que se une al ADN en una secuencia conocida como elemento de respuesta a la hipoxia (HRE).

La hipoxia provoca una disminución del potencial energético de las células y hace que el O² necesario para la fosforilación oxidativa disminuya a nivel celular [67]. Esta disminución es detectada por un complejo mecanismo de reacciones sensibles a su descenso, cuyo resultado final es la estabilización del factor de transcripción denominado (HIF-1), el cual estimulará la expresión de un gran número de genes que harán posible la adaptación a las condiciones de hipoxia [6,68,69].

La actividad de HIF está implicada en la angiogénesis necesaria para el crecimiento de la neoplasia. Es así como ciertos inhibidores de HIF como el fenetil isotiocianato (PEITC) están bajo investigación por los posibles efectos antineoplásicos [64,65,66].

- **El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)** es una familia que hasta la fecha está formada al menos por 22 miembros, siendo los más conocidos el FGF-1 (FGF ácido) y el FGF-2 (FGF básico) [150]. La mayoría son péptidos de cadena simple de 16-18 kDa y muestran una elevada afinidad al heparán sulfato y a la heparina. Los FGF estimulan una variedad de funciones celulares mediante la unión a sus FGFR-1 en la superficie celular en presencia de proteoglicanos compuestos de heparán [151].

La familia de FGFRs se compone de siete miembros y son simples receptores tirosinquinasa que se activan a través de la autofosforilación inducida por un mecanismo de la dimerización del FGF mediada por el mismo receptor. La activación del receptor da lugar a una cascada de transducción de señal que conduce a la activación de genes y diversas respuestas biológicas, incluyendo la diferenciación celular, proliferación y disolución de la matriz; iniciando así la actividad mitogénica, básica para las células endoteliales, los fibroblastos y las células musculares lisas [150,157].

El FGF-1, es el único de los miembros de la familia del FGF en poder unirse a los siete subtipos de receptores del FGF, mostrando así más funciones que el resto de tipos del FGF. Estimula la proliferación y diferenciación de todos los tipos de células necesarias para la construcción de un vaso arterial, incluyendo las células endoteliales y células musculares lisas; este hecho distingue al FGF-1 de otros factores de crecimiento pro-angiogénicos, tales como el VEGF, que sobre todo impulsa la formación de nuevos capilares [150,157].

Una de las funciones más importantes del factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2 o bFGF) es la inducción de la proliferación de células endoteliales y la organización física de las células endoteliales en estructuras tubulares, promoviendo así la angiogénesis. El FGF-2 es un factor angiogénico más potente que el VEGF o el PDGF, sin embargo, menos potente que el FGF-1 [151]. El FGF-1 y el FGF-2, además de estimular el crecimiento del vaso sanguíneo, son actores importantes en la cicatrización de heridas, estimulando el desarrollo de tejido de granulación, el aumento del aporte de sangre y el llenado del espacio de la herida [150,157].

Hasta el año 2007 se han completado con éxito tres ensayos clínicos en humanos, inyectando el FGF-1 directamente en el músculo cardíaco dañado. Además, en otro ensayo en humanos se promueve la cicatrización de heridas crónicas en diabéticos con el FGF-1 [5,153].

El FGF-2 también es usado como componente esencial de medio de cultivos de células madres embrionarias humanas, siendo necesario para que las células se conserven en estado indiferenciado, sin embargo sus mecanismos de acción no están bien definidos [5,155].

- **El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)** es importante en la formación y el crecimiento de los vasos sanguíneos [89]. Se conocen cinco diferentes isoformas del PDGF, incluyendo el PDGF-A, B, C, D y un heterodímero AB [90]. El PDGF actúa a través de un receptor tirosinquinasa de superficie celular (PDGFR). Han sido identificados dos tipos de PDGFR: El PDGFR- α y el PDGFR- β . Al tipo α se le une el PDGF-AA, PDGF-BB y PDGF-AB, mientras que al PDGFR tipo β se une con alta afinidad el PDGF-BB y el PDGF-AB. El PDGF se conoce como un importante mitógeno para los fibroblastos en la cicatrización de heridas. Sin embargo, el PDGF actúa tanto en el desarrollo embrionario, la proliferación celular, la migración celular y la angiogénesis [89,90].

La angiogénesis es un proceso muy complejo, donde intervienen además de los ya mencionados, otros reconocidos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) [4], y aunque es bien conocida la función individual de cada factor, todavía se desconoce en profundidad su interrelación en vivo y los condicionantes de cambios.

También se ha demostrado la participación fundamental en estos procesos angiogénicos de otras moléculas como las integrinas, las moléculas de adhesión y las proteasas [99].

- **La interacción de la integrina α y β** del endotelio con la matriz extracelular (MEC) es necesaria para la supervivencia de los vasos neoformados. La integrina participa en la activación del receptor VEGFR-2 por el VEGF-A [91]. Los antagonistas de la integrina α y β muestran un efecto antiangiogénico [92,93]. Algunas moléculas de la MEC usan las integrinas para transmitir señales al interior de la célula endotelial.

- **Otras moléculas de adhesión como los dos tipos de cadherinas** expresados por la célula endotelial: la VE-cadherina y la N-cadherina, sufren modificaciones en la angiogénesis. La VE-cadherina participa normalmente en la asociación de las células endoteliales y la fosforilación en tirosinas de la VE-cadherina inducida por el VEGF provoca la desestabilización de los contactos entre las células endoteliales [95]. La N-cadherina media la unión de las células endoteliales y periendotheliales están son inducidas por el PDGF a través de su receptor β [94].

- **La expresión de proteasas es característico de la angiogénesis.** Los factores proangiogénicos como el VEGF aumentan la permeabilidad de los vasos, lo que determina la salida del fibrinógeno del plasma sanguíneo al medio intersticial. En el líquido intersticial el fibrinógeno se polimeriza y, mediante una serie de entrecruzamientos, forma una red tridimensional densa de fibrina. El gel de fibrina sirve por una parte de andamio estructural, en él se anclan las células endoteliales disociadas que van a formar nuevos vasos. Pero al mismo tiempo el gel limita el movimiento de estas células.

Las células endoteliales para invadir el estroma necesitan de unas enzimas proteolíticas, que al degradar la fibrina y otras proteínas de la matriz, forman túneles delimitados por las células endoteliales. Los túneles constituirán la luz de los nuevos vasos. La actividad fibrinolítica de las células endoteliales ha sido atribuida a tres serinproteasas: el plasminógeno y dos activadores del mismo tPA y el uPA, pero esencialmente a la metaloproteinasa de la membrana endotelial tipo I [96].

Las metaloproteinasas ancladas en la membrana celular son capaces de hidrolizar otros componentes de la MEC, además de la fibrina y resultan esenciales para la actividad invasiva de las células normales y neoplásicas.

- **Otros factores determinantes de la activación de la angiogénesis** son una serie de parámetros del microambiente que rodea a las células tumorales como la hipoxia, la disminución del pH, la hipoglucemia, el aumento de presión en el tumor por exceso de proliferación y la presencia de células inflamatorias. También hay que destacar otros factores intracelulares promotores de angiogénesis como la expresión de oncogenes o la falta de expresión de genes supresores [146,155].

En la regulación de la angiogénesis y la pérdida del conocido equilibrio en el “switch angiogénico” de la evolución tumoral son muy importantes **los inhibidores endógenos de la angiogénesis**. La trombospondina-1, el interferón α β , un fragmento de la prolactina, la angiostatina y la endostatina, entre otros, actúan como inhibidores de la angiogénesis. En muchos casos los inhibidores endógenos son fragmentos de proteínas de la matriz extracelular/membrana basal o de proteínas implicadas en la coagulación. Así, la endostatina es un fragmento del colágeno tipo XVIII y la angiostatina, un fragmento del plasminógeno [97]. En la tabla 1.1 se resumen algunos de los citados factores pro y anti angiogénicos.

Factores activadores o proangiogénicos	Reguladores inhibidores o antiangiogénicos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Familia del VEGF (diversas isoformas) ▪ FGF-1, FGF-2 (ácido y básico) ▪ PDGF (AA, AB, BB) ▪ Angiopoyetinas ▪ Ephrinas ▪ Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) ▪ Interleuquinas 1, 6 y 8· Angiogenina ▪ Factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1) ▪ Factor de crecimiento transformante tipo b (TGFb) ▪ Factor de necrosis tumoral-a (bajas dosis) ▪ MMP 2, 9, 14, 15, 16, 17, 19 y 26 ▪ Integrinas avb3, avb5 y a5b1 ▪ VE-cadherinas, PECAM (CD31) ▪ NOS, COX-2 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Interferones a y b ▪ Interleuquinas 12 y 18· Factor de plaquetas 4 (PF-4) ▪ factor inducible por interferón (IP-10) ▪ Trombospondina ▪ Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP 1, 2, 3, 4) ▪ Inhibidores de los activadores de plasminógeno ▪ Angiostatina (fragm. int. de plasminógeno) ▪ Endostatina (fragm. C-term. de colágeno XVIII) ▪ Canstatin (fragm. de colágeno IV) ▪ Antitrombina antiangiogénica ▪ Metalospondinas ▪ Factor derivado del epitelio pigmentado ▪ VEGFR-1, VEGFR-1 soluble, NP1 soluble ▪ Prolactina

Tabla 1.1 Factores reguladores de angiogénesis

1.1.4 Aplicaciones actuales del concepto de angiogénesis

Las aplicaciones clínicas del estudio de la angiogénesis están dirigidas en la actualidad en tres direcciones [1,156,250]:

- Diagnóstico y pronóstico de procesos patológicos. La dependencia de procesos angiogénicos por parte de una gran variedad de neoplasias (su crecimiento, invasión y metástasis), permite utilizar el

estudio de la neovascularización para pronosticar su posible evolución y su respuesta a diferentes tratamientos [156].

- Terapéutica en cicatrización. Se intenta conseguir una aceleración terapéutica de la reparación tisular, aprovechando su conocida participación en la etapa angiogénica de la cicatrización de los tejidos [156].

- Terapéutica antiangiogénica antineoplásica. Se está probando el uso de la inhibición angiogénica como tratamiento, para el control de patologías neoplásicas y no neoplásicas, cuyo crecimiento, malignización e invasión son angiodependientes [156, 250].

1.2 Carcinoma de células renales (RCC)

1.2.1 Definición y epidemiología

Se define como una neoplasia derivada de las células del epitelio tubular renal, a diferencia de otros tumores renales que provienen del estroma o del urotelio. Es uno de los tumores urológicos más comunes y representa el 3,8% de los tumores malignos en adultos, con una incidencia actualmente en aumento [12]. Las tasas de incidencia mundial oscilan entre 0,6 a 14,7 por 100.000 habitantes [18]. En el año 2000 se diagnosticaron más de 30.000 casos nuevos en USA y más de 20.000 en Europa [13]. Es el tumor urológico que presenta una mayor mortalidad, produciendo el 2,3% de las muertes por cáncer en USA [12]. Además, se estima que entre 25 y 30% de los pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico. La recurrencia tumoral, posterior a la resección completa del tumor primario con nefrectomía radical, es del 30 a 40% en USA [12,14]. La supervivencia a 5 años es menor al 10% en pacientes con metástasis [13].

El riesgo de padecer RCC aumenta con la edad, de manera que más del 90% de los casos son diagnosticados después de los 45 años. La mayoría de los tumores se presentan entre la quinta y la séptima década de la vida, con una edad media al diagnóstico de 66 años y la edad promedio al momento de la muerte de 70 años. La incidencia es ligeramente mayor en individuos de raza negra que en caucásicos y de 2,5:1 más en hombres que en mujeres [19]. En general, el tumor suele ser solitario, pero puede ser multifocal en el 25,6% de los pacientes, y la enfermedad bilateral se diagnostica en un 4% de todos los pacientes con RCC [12].

La herencia es un factor de riesgo para algunos casos de RCC relacionados con cambios en la estructura genética (ADN) de las células, incluyendo enfermedad de Von Hippel-Lindau, el carcinoma renal papilar hereditario y posiblemente la esclerosis tuberosa [13]. En general, se sugieren entre otros los siguientes factores de riesgo [19,20,21]:

- tabaquismo
- obesidad
- uso de diuréticos
- exposición a productos derivados del petróleo
- disolventes clorados
- cadmio, plomo y amianto
- radiación ionizante
- dietas altas en proteínas
- hipertensión
- trasplante de riñón
- infección por VIH.

Clínicamente el RCC se caracteriza por la falta de signos de alerta temprana, por la resistencia a la radiación, a la quimioterapia, a los agentes de inmunoterapia, como el interferón alfa (INF-a) y la interleucina (IL-2) y a medicamentos más nuevos como los inhibidores de la tirosinquinasa, como el sorafenib^R y el sunitinib^R que interfieren con el PDGFR y el VEGF, respectivamente [15,16]. Lo mismo sucede con el temsirolimus^R (inhibidor de mTOR), recientemente aprobado por la FDA para el tratamiento de RCC [17].

El desarrollo tecnológico en las pruebas diagnósticas de imagen ha incrementado el hallazgo casual de masas intrarrenales asintomáticas que corresponden a RCC en etapas de crecimiento. El carcinoma de células renales también se observa en un 2% de necropsias de manera casual [22,23].

1.2.2 Clasificación histopatológica

El RCC representa un 80-85% de todos los tumores malignos renales. Típicamente se origina en la corteza renal y presenta varios subtipos histológicos de acuerdo con la clasificación de Heidelberg, la cual fue modificada por la OMS 2004 sumándole características genéticas y moleculares de estas neoplasias [24,25,251]:

- **Carcinoma de células claras (CCRCC):** es el más frecuente, con un 80% de los CCR. Se denomina carcinoma renal convencional, y por ser objeto de esta investigación, profundizaremos en próximos párrafos.

- **Carcinoma papilar:** representa un 15% del total de RCC y se caracteriza por presentar un patrón de crecimiento papilar, observándose una distribución de las células tumorales alrededor de ejes capilares en un 50 a 70 % del tumor.
- **Carcinoma cromóforo:** constituye el 5% de los carcinomas renales y presenta un patrón sólido de láminas con células de gran tamaño, poliédricas, con citoplasma reticular pálido y buena delimitación de su membrana citoplasmática.
- **Carcinoma de los conductos colectores:** una rara variante de carcinoma renal, presentándose en menos del 1% de las neoplasias renales. Microscópicamente se observan células con alto grado nuclear, citoplasma eosinófilo, patrón tubular acodado y presencia de células en tachuela, con marcada desmoplasia.
- **Carcinoma no clasificado:** actualmente hay un pequeño número (4%) de CCR que por la revisión microscópica o por la evaluación molecular genética aún no pueden clasificarse.

La variante sarcomatoide de los CCR puede coexistir con cualquiera de los subtipos anteriores y se relaciona con un comportamiento más agresivo del tumor [25].

1.2.3 Carcinoma renal de células claras (ccRCC)

Esta neoplasia es llamada así por mostrar predominantemente células de citoplasma claro debido a su gran contenido en glucógeno y lípidos que se disuelven durante el procesamiento histológico. En menor proporción, algunas células contienen abundante cantidad de mitocondrias, lo que le da un aspecto eosinófilo o granular [29,30,31]. La distribución de las células suele ser en masas sólidas con un estroma vascular muy abundante, mostrando raramente un patrón tubular. Se observan focos de tipo papilar y en un 5 % de los casos es de predominio fusocelular o sarcomatoide. Los núcleos son redondeados y sus características dependen del grado de diferenciación. Este último, produce diferencias biológicas que se utilizan como factor pronóstico, es el caso del grado nuclear de Fuhrman [25,31].

La tumoración suele ser única, solo en un 4% de pacientes es multifocal y en un 3% bilateral. Se postula que su origen específico está en las células epiteliales de los túbulos proximales de la nefrona [26,27], generalmente en la corteza del polo superior del riñón. Suele estar bien delimitada por una banda fibrosa o capsula tumoral, producida por la compresión de los tejidos peritumorales. Por las

características citoplasmáticas y tisulares, la superficie de corte es de color amarillento, debido a la abundancia de lípidos. Además, se observan áreas de hemorragia debido a una vascularización abundante e irregular. Ocasionalmente hay áreas cicatriciales, e incluso con calcificación. La observación de necrosis se relaciona con las neoplasias más agresivas [25]. En ocasiones presenta aspecto quístico. Este puede ser por necrosis (pseudoquistes), o por estar constituida por verdaderos quistes neoplásicos, llegando a proporcionar un aspecto macroscópico que obliga a diferenciarlo de un quiste multilocular [27].

El perfil inmunohistoquímico que caracteriza el ccRCC se describe a continuación en la tabla 1.2 [190,75]:

Positividades	Negatividades
✓ Vimentina (+),	✓ AMACR (-), CD117 (-),
✓ EMA (+),	✓ CK7 (-), E-cadherina (-),
✓ CD10 (+),	✓ CK20 (-), Cathepsina K (-),
✓ marcador CCR (+),	✓ CK19 (-), PMelan A (-),
✓ RCC (+),	✓ 34BE12 (-), P63 (-),
✓ CAM 5.2 (+),	✓ Parvalbumin (-), TFE (-),
✓ S100A1 (+),	✓ C-Kit (-), TFEB (-).
✓ AX 2 (+),	

Tabla 1.2 Perfil inmunohistoquímico del ccRCC

El carcinoma de células claras posee una expresión mucho más frecuente de citoqueratinas de bajo peso molecular (CAM 5.2 alrededor del 60%), que las de alto peso molecular (CK19 y CK14 un 3,7 %) [28]. La vimentina se expresa en un 82,6%, el CD10 en el 94% y el anticuerpo monoclonal RCC en el 85% [25, 28].

1.2.3.1 Grado nuclear de Fuhrman

Esta clasificación se basa en las características nucleares y se utiliza actualmente para clasificar CCRCC. Por su relación significativa entre los altos grados de esta y la agresividad del tumor, el oncólogo se apoya en ella para tomar una decisión terapéutica y dar un adecuado pronóstico. Los grados se valoran de la siguiente manera (fig. 1.6) [25,31]:

Grado 1: núcleos pequeños (<10µm) y redondos, con cromatina densa y nucléolos discretos

Grado 2: núcleos ligeramente más grandes (15 µm), con cromatina finamente granular y nucléolos pequeños

Grado 3: núcleos de 20 µm de tamaño y pueden tener forma oval, con cromatina grumosa y nucléolos prominentes

Grado 4: núcleos pleomórficos, con cromatina dispersa y uno o varios macronúcleolos.

Los grados nuclear 3 y 4 se asocian con características histológicas de agresividad tumoral, por ejemplo: la mayor proporción de células eosinófilas y glóbulos hialinos [25, 31]; la necrosis coagulativa tisular [31] y células con diferenciación sarcomatoide o rabdoide. Todas ellas asociadas con agresividad tumoral y capacidad metastásica [32,33,34].

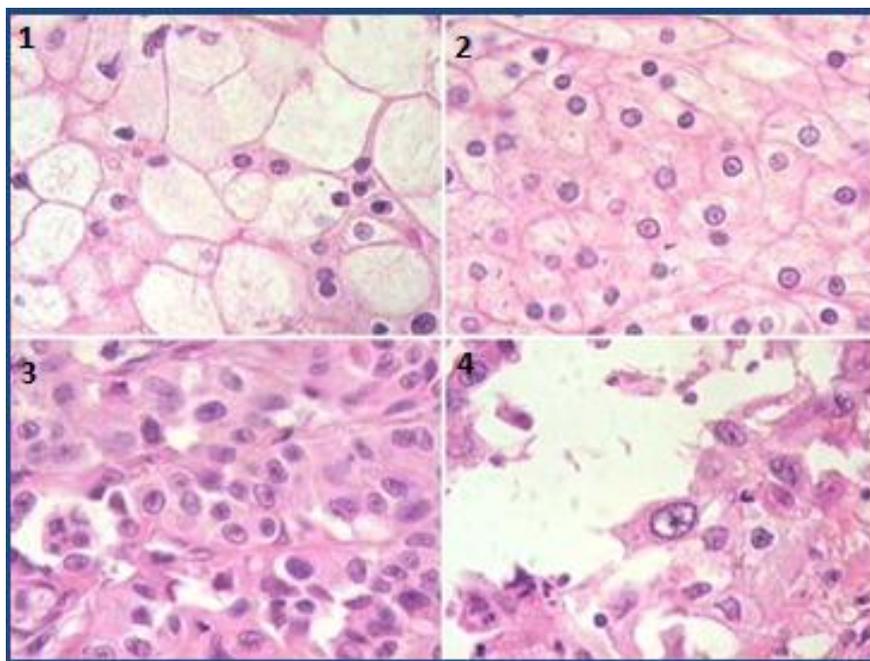


Figura 1.6 Grados de Fuhrman. 1): grado 1: núcleos pequeños, uniformes, sin nucléolos visibles. 2): grado 2: núcleos de aproximadamente 15 micras, con nucléolos visibles. 3): grado 3: núcleos más grandes e irregulares con nucléolos prominentes. 4): núcleos más pleomórficos y nucléolos grandes

1.2.3.2 Estadios tumorales en el RCC

El sistema TNM es usado por cada especialidad médica como método principal para la estadificación de las neoplasias, en este caso para los RCC. Este tipo de valoración se basa en el tamaño del tumor (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N), y la presencia de metástasis a distancia (M). A cada letra se le añade un número para indicar el tamaño o extensión del tumor y el grado de diseminación de la neoplasia (tabla 1.3).

Crterios	Valoración
T1	Tumor \leq 7.0 cm en dimensión, limitado a riñón
T2	Tumor < 7.0 cm en dimensión, limitado a riñón
T3	El tumor se extiende a los vasos principales o invade la glándula suprarrenal o los tejidos circundantes sin invadir la fascia de Gerota
T4	Tumor invade más allá de la fascia de Gerota
N0	Ausencia de metástasis en ganglios linfáticos
N1	Metástasis en un único ganglio linfático
N2	Metástasis en > 1 ganglio linfático
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

Tabla 1.3 Valoración TNM para RCC. Datos tomados de: www.seom.org.es, Sociedad Española de Oncología Médica

Después de valorado un tumor por el sistema TNM, se pasa a clasificarlo en uno de los estadios o etapas que han sido acordados por la UICC-OMS, en base a los conocimientos científicos sobre el RCC. Actualmente se clasifican en los siguientes cuatro estadios (tabla 1.4) [9]:

Estadio I: el tumor mide 7 cm o menos y se encuentra limitado al riñón.

Estadio II: el tumor mide más de 7 cm y se encuentra limitado al riñón.

Estadio III: el tumor invade la glándula suprarrenal situada justo encima del riñón o la capa de tejido graso que rodea al riñón o los vasos sanguíneos principales del riñón (como la vena cava) y puede invadir los ganglios linfáticos abdominales.

Estadio IV: el cáncer se extendido a otros órganos como los intestinos, el páncreas, los pulmones, el hígado o los huesos, provocando metástasis a distancia.

Estadios TNM	Valoración
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T1 N1 M0; T2 N1 M0; T3 N0 M0; T3 N1 M0
IV	T4 N0 M0; T4 N1 M0; T4 N0 M0; T4 N1 M0; T4 N2 M0; Cualquier T cualquier N M1

Tabla 1.4 Estadios TNM. Datos tomados de: www.seom.org.es, Sociedad Española de Oncología Médica

Establecer el estadio del tumor facilita al oncólogo la toma de decisiones en cuanto a las alternativas terapéuticas y el posible pronóstico del paciente. Para tipificar el carcinoma renal de células claras, la valoración del TNM y el grado de Fuhrman son fundamentales.

1.2.3.3 Angiogénesis en ccRCC

Estos tumores pueden crecer hasta un tamaño de aproximadamente 2 a 3 mm³, antes de que sus demandas metabólicas estén restringidas debido al límite de la difusión de oxígeno y nutrientes. Con el fin de crecer más allá de este tamaño, el tumor cambia a un fenotipo angiogénico y atrae a los vasos sanguíneos del estroma circundante. Este proceso está regulado por una variedad de factores pro y anti angiogénicos, y su desequilibrio es un requisito previo para el crecimiento adicional del tumor [36]. La angiogénesis es un factor indispensable, no solo en el crecimiento progresivo, sino en la metástasis del cáncer renal. Por ello, el tratamiento actual del cáncer renal primario y metastásico está dirigido hacia la inhibición de este proceso biológico [158,159]. El crecimiento tumoral dependiente de angiogénesis y el aumento de la vascularización en el carcinoma renal han sido demostrados experimentalmente. Una investigación con ratones inoculados con líneas celulares de RCC, mostró una disminución significativa del crecimiento tumoral e inhibición de la metástasis al administrarles un inhibidor de la angiogénesis, el TNP-470 [3].

Algunas características de la angiogénesis en pacientes con ccRCC han sido descritas por nuestro grupo de investigación, en un trabajo recientemente publicado, donde se describe la morfología de los vasos neoformados, como abundantes, de trama irregular y desordenada. Romanenko y nuestro grupo evidenciaron un incremento de la MVD, especialmente a partir de capilares, en pacientes con grados tumorales altos 3+4 [142].

1.3 Radiaciones ionizantes y neoplasia

1.3.1 Efectos generales

Las radiaciones ionizantes producen efectos biológicos de forma directa o bien de forma indirecta, al generar radicales libres. Los daños biológicos de las radiaciones ionizantes se dan esencialmente sobre el núcleo de las células, en particular sobre su material genético [143a]. Básicamente, al incidir una radiación ionizante sobre una célula acontecen numerosas posibilidades expresadas de modo resumido en la siguiente figura (fig. 1.7).

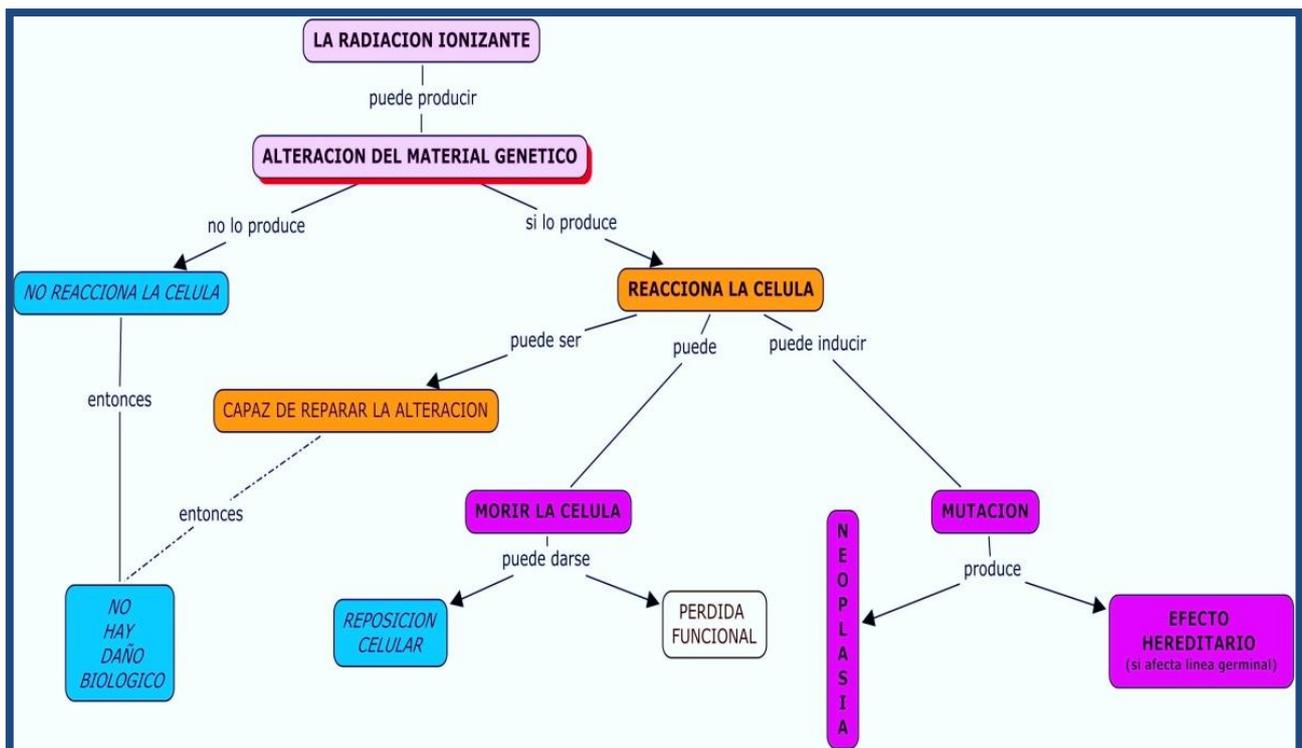


Figura 1.7 Respuesta biológica a las radiaciones ionizantes

Se ha establecido una relación íntima entre las respuestas de daño en el DNA, la mutación somática y el desarrollo del cáncer, esta relación se aplica a una amplia gama de tipos de tumores humanos que surgen de forma espontánea o inducida por ciertos carcinógenos ambientales [143a].

En el proceso de desarrollo del cáncer se reconoce la participación de múltiples cambios en los genes implicados en la señalización celular y la regulación del crecimiento, control del ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación, la angiogénesis, y la respuesta de daño en el ADN o la reparación. Los cambios en estos genes puede implicar mutaciones de genes o reordenaciones de ADN, que dan como resultado una ganancia de función como en el caso de la conversión de los proto-oncogenes a los oncogenes, [141] mutaciones o deleciones de ADN o reordenamientos, que se traducen en pérdida la función de genes como en el caso de genes supresores tumorales [143b].

1.3.2 Bajas dosis por larga duración de radiaciones ionizantes (CPLDIR)

La exposición crónica a bajas dosis de radiación ionizante, induce un tipo de inestabilidad genética en las células, produciendo mutaciones en múltiples locus responsables del desarrollo del cáncer [128]. Los efectos de la inestabilidad genética causada, aparecen cuando la saturación de la dosis recibida está a niveles de 2 a 4 Gy (Grey), e inclusive son posibles con niveles bajos como 0,18 Gy [143a]. Si bien por ley física el efecto es proporcional a la dosis recibida, se asume que este puede ocurrir incluso con una pequeña cantidad de radiación, es decir, no hay umbral. Un ejemplo claro de este concepto es el cáncer; basta una célula con mutación para generar un tumor [58, 128].

El largo periodo de latencia entre la exposición a la radiación y el desarrollo del cáncer, junto con la naturaleza de varias etapas de la génesis tumoral, hacen que sea difícil distinguir entre los cambios inducidos por la radiación de aquellas alteraciones que se producen una vez que el proceso ha sido iniciado. No parece haber una identificación específica o única de las lesiones inducidas por la radiación de los cánceres [143d]. Las mutaciones en los tumores y sus características de crecimiento, no hacen fácilmente distinguir entre los tumores espontáneos o los inducidos por otros agentes cancerígenos en el mismo órgano [143c]. Los intentos para identificar cambios específicos inducidos por IR en los tumores humanos han sido particularmente infructuosos. Sin embargo hay indicios de posibles mecanismos cancerígenos subyacentes inducidos por la IR, que se desprenden de investigaciones epidemiológicas y experimentales [143e].

Basados principalmente en estudios experimentales se cree que las formas complejas de rotura del ADN de doble hebra es el tipo de lesión inducida por la IR de mayor importancia biológica; esas formas complejas son las posibles responsables de la aparición posterior de efectos moleculares y celulares. Los intentos de reparar lesiones complejas de ADN de doble hebra son considerados procesos muy susceptibles a errores, sin embargo no hay evidencia certera de que este proceso pueda conducir a defectos cromosómicos y mutagénesis. En los análisis moleculares de las mutaciones

inducidas por la IR se han encontrado una amplia gama de mutaciones que incluyen sustituciones de pares de bases, las mutaciones con cambio de pauta de lectura (“frameshift”) y deleciones [143c].

Es importante destacar que las más frecuentes mutaciones inducidas por las IR son las deleciones en el ADN. Por lo tanto, las teorías de cáncer inducido por radiación en general se han centrado en la inactivación de genes supresores tumorales post-irradiación, que se esperaba se produjeran a través de la deleción de ADN, ó a través de la inducción de mutaciones puntuales. Otro candidato asociado a la inducción por IR es la activación de oncogenes a través de formas específicas de translocación cromosómica, observadas especialmente para la leucemia y el linfoma [143c]. Por lo tanto, diversos mecanismos de participación de los genes y/o reordenamientos cromosómicos y la pérdida de heterocigosidad son considerados como los más probables cambios inducidos por las IR que contribuyen al desarrollo del cáncer [143c]. Más recientemente, los estudios experimentales se han planteado si los sucesos iniciadores producidos por la radiación son los verdaderos efectos directos sobre los genes específicos [143b]. Se propone entonces que el gen o mutaciones cromosómicas implicadas en la génesis del tumor por IR surgen indirectamente como resultado de la inestabilidad genómica persistente inducida por la exposición a la radiación [143b].

Los datos cuantitativos de la génesis tumoral en animales [143d] y los estudios epidemiológicos humanos [143e] implican que a baja LET (transferencia lineal de energía) la radiación ionizante actúa principalmente como un agente inductor de tumor. En concreto, en los seres humanos y animales, las dosis individuales agudas de radiación con LET baja producen un aumento dosis-dependiente en el riesgo de cáncer con la evidencia de que las exposiciones crónicas y fraccionadas por lo general disminuyen ese riesgo. Además, los datos experimentales en animales muestran que la radiación sólo promueve débilmente el desarrollo de tumores iniciados químicamente, y la sensibilidad generadora de tumores, generalmente mayor en los seres humanos expuestos a la irradiación aguda en edades tempranas es más consistente con los efectos sobre la iniciación del tumor, que como promotor del desarrollo de las neoplasias preexistentes [143c].

El desarrollo espontáneo de los tumores suele ir acompañado por la adquisición de los fenotipos de la inestabilidad genómica, que sirven para promover la evolución por mutación de clones de células tumorales más agresivos. La identificación de estas formas de inestabilidad genómica es cada vez mayor, al igual que las mutaciones de los genes responsables de tumores. Hay gran cantidad de datos que muestran que las lesiones iniciales inducidas por la radiación se procesan rápidamente y se expresan como aberraciones cromosómicas en las mitosis post-irradiación [143b]. Además, durante

la última década, se ha acumulado evidencia de que bajo ciertas condiciones experimentales, la progenie de las células sobrevivientes a la radiación parece expresar un exceso de nuevas mutaciones cromosómicas y genes a lo largo de muchas generaciones de células post-irradiación. Esta característica de la respuesta celular se denomina genéricamente, inestabilidad genómica persistente inducida por la IR. Hay una variedad de diferentes manifestaciones de este fenómeno, y el campo de desarrollo es objeto de una serie de revisiones recientes [143f]. Los datos disponibles no permiten hacer generalizaciones sobre el inicio y la duración de tales fenómenos.

Sobre la base de estos datos y los informes previos de transformación de células neoplásicas por alta frecuencia, se ha sugerido que los cambios epigenéticos que afectan a una fracción sustancial de las células irradiadas puede servir para desestabilizar sus genomas y que las elevadas tasas de mutación en progenie de células post-irradiación, ubicadas en genes específicos al inicio, actúan para impulsar la génesis del tumor por radiación [143a]. Sobre la base de este modelo, se predijo que la relación dosis-respuesta después de una tasa de exposición a dosis bajas sería lineal, con la misma pendiente que la parte lineal del modelo de respuesta a la dosis aguda. En otras palabras, a dosis bajas, el riesgo de cáncer inducido por la radiación es independiente del tiempo durante el cual ocurre la exposición y es una función acumulativa de dosis.

Por lo tanto, incluso en estudios con ratones en los que hay suficiente poder estadístico para abordar las cuestiones de efectos de dosis bajas y las relaciones dosis-tiempo, los datos se limitan a las cepas de ratón que son altamente susceptibles a formas específicas de las neoplasias. Mientras que las variaciones en la susceptibilidad se debe considerar los posibles factores de confusión en la aplicación de los datos de animales a los riesgos humanos, el análisis cuidadoso de los datos en humanos y en animales sugieren que los datos de los animales, de hecho, tienen valor predictivo, por ejemplo, que pueden orientar decisiones sobre la elección de los modelos de riesgo de cáncer [143f].

Los estudios en animales sugieren que la radiación LET baja actúa principalmente como iniciador de la génesis neoplásica y es un promotor tumoral débil. El conocimiento actual implica lo siguiente: a dosis bajas, la radiación actúa principalmente como un iniciador del cáncer, y muchos de los factores de riesgo conocidos del cáncer, como los factores hormonales o reproductivos, en particular para el cáncer de mama y la inflamación crónica asociada a la infección microbiana o vírica, para el cáncer de estómago y de hígado, tenderían a actuar en las etapas posteriores a la génesis tumoral. En estos últimos casos, la modificación del riesgo de cáncer se cree que está asociado en gran medida con la expansión clonal de células postiniciación preneoplásica o malignas [143g].

1.3.3 CPLDIR en RCC

En las primeras investigaciones de los efectos de las IR en el riñón se pensó que tenía una baja sensibilidad en relación a la inducción de cáncer. Más recientemente se ha documentado el riesgo significativo experimental, de inducción de RCC por las IR [143e]. Hay más de cuatro casos descritos con características clínicas de RCC inducidos por IR en humanos post-radioterapia, antes usadas como base de la oncoterapia [143g].

Un ejemplo cuasi-experimental, ha sido la evolución de la tragedia donde explotó un reactor nuclear en Chernóbil, Ucrania. Allí, aproximadamente 10 millones de personas han sido expuestos crónicamente a bajas dosis de radiación con Cs 137 todavía existente (fig. 1.8). Veinte años más tarde ha venido siendo descrito en la literatura, un aumento dramático en la tasa de morbilidad por cáncer. La presentación de tumores renales malignos en Ucrania se ha incrementado del 4,7 al 10,7 por 100.000 de la población total (2002) [192]. Esto ha dado como resultado, que los efectos biológicos de las dosis bajas de radiación ionizante (CPLDIR), durante largo tiempo y su relación íntima con la carcinogénesis, hayan sido tenidos muy en cuenta en los últimos cinco años.

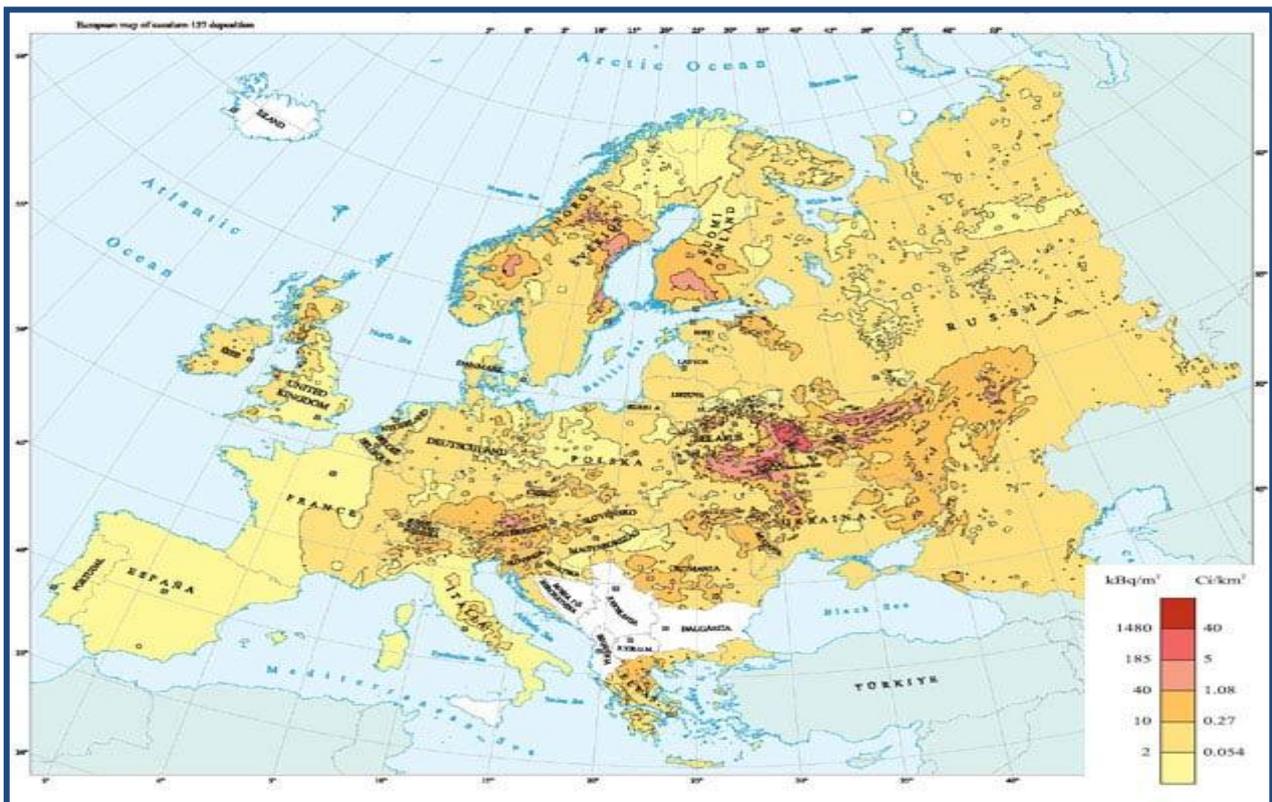


Figura 1.8. Depósito en suelo europeo de Cs 137 post-accidente de Chernóbil

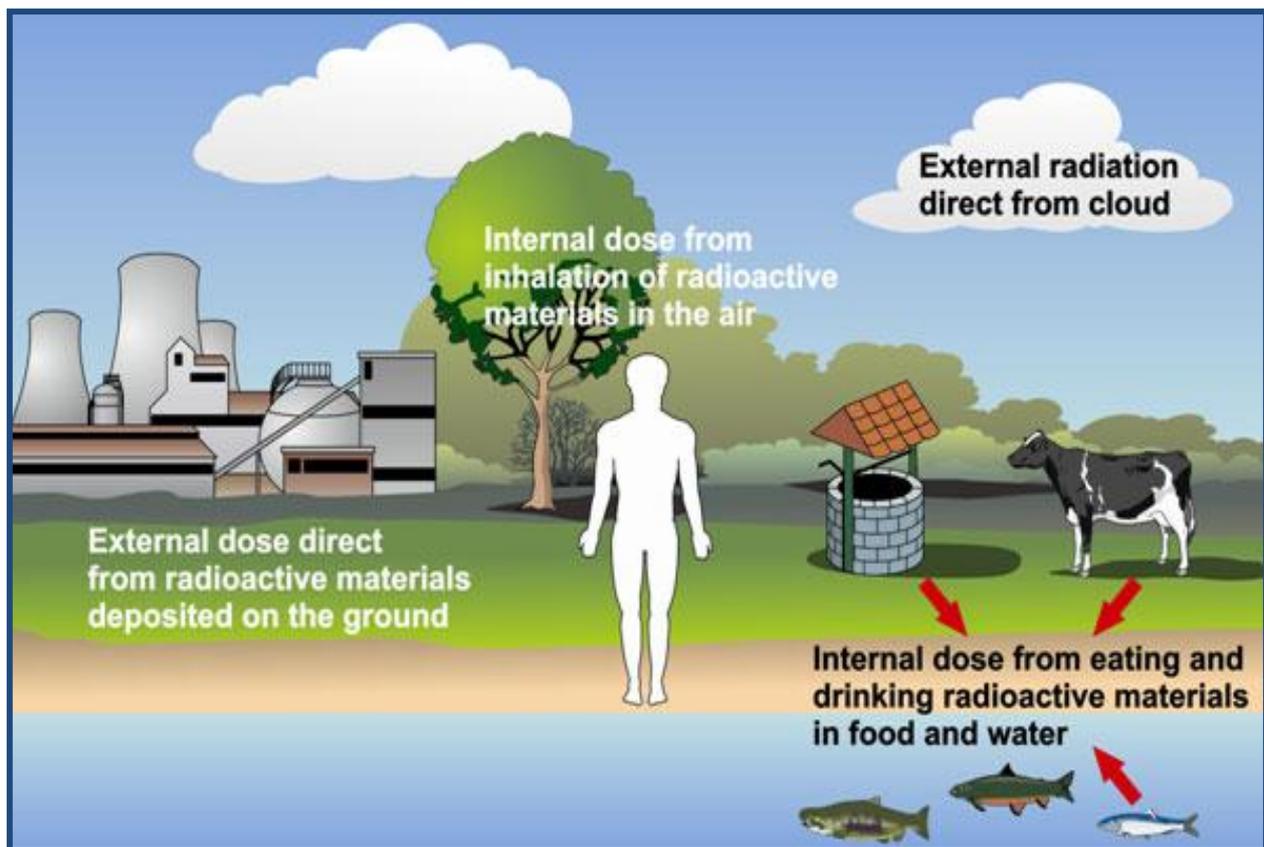


Figura 1.9 Contaminación del medio ambiente

El Cs 137, es el 90 % de la radioactividad interna en la población ucraniana expuesta a dosis bajas por largo tiempo y el 90 % de este radioisótopo, pasa por los riñones al ser excretado [143g] (fig. 1.9). En 1996 se inició una amplia cooperación científica, entre los Departamentos de Patología del Instituto de Urología en Kiev y el de la Universidad de Valencia, con el fin de investigar los efectos de la irradiación ionizante en las patologías renales tumorales y no tumorales. Alina Romanenko y Antonio Llombart-Bosch lideran el grupo que ha publicado las siguientes investigaciones en el tema:

- ✓ Romanenko A, Morell-Quadreny L, Nepomnyaschy V, Vozianov A, Llombart-Bosch A. Pathology and proliferative activity of renal-cell carcinomas (RCCS) and renal oncocytomas in patients with different radiation exposure after the Chernobyl accident in Ukraine. *Int Journal Cancer* 2000;87(6):880-883.
- ✓ Romanenko A, Morell-Quadreny L, Llombart-Bosch A, et al. Radiation sclerosing proliferative atypical nephropathy of peritumoral tissue of renal-cell carcinomas after the Chernobyl accident in Ukraine. *Virchows Archiv* 2001; 438(2):146-153.
- ✓ Romanenko A, Morell-Quadreny L, Pellin A, et al. P16 INK4A and p15 INK4B gene alteration associated with oxidative stress in renal cell carcinomas after the Chernobyl accident (pilot study). *Diagn Mol Pathol* 2002;11(3):163-169.
- ✓ Romanenko A, Morell-Quadreny L, López-Guerrero JA, et al. The INK4a /ARF locus: role in cell cycle control for renal cell epithelial tumor growth after the Chernobyl accident. *Virchows Arch* 2004;445(3):298-304.

- ✓ Romanenko A, Morell-Quadreny L, Ramos D, Llombart-Bosch, et al. Alteration of Apoptotic Regulatory Molecules in Conventional Renal Cell Carcinoma Influenced by Chronic Long-term Low-dose Ionizing Radiation Exposure in Humans Revealed by Tissue Microarray. *Cancer Genomics and Proteomics* 2006;3 (2):107-112.
- ✓ Romanenko A, Morell-Quadreny L, Ramos D, Llombart-Bosch, et al. Extracellular matrix alterations in conventional renal cell carcinomas by tissue microarray profiling influenced by the persistent, long term, low dose ionizing radiation exposure in humans. *Virchows Archiv* 2006. 448:584-590.
- ✓ Yurakh AO, Ramos D, Calabuig-Fariñas S, López-Guerrero JA, et al. Molecular and immunohistochemical analysis of the prognostic value of cell-cycle regulators in urothelial neoplasms of the bladder. *Eur Urol* 2006;50(3):506-515.
- ✓ Morell-Quadreny L, Romanenko A, López-Guerrero JA, Calabuig S, Vozianov A, Llombart-Bosch A. Alterations of ubiquitylation and sumoylation in conventional renal cell carcinomas after the Chernobyl accident: a comparison with Spanish cases. *Virchows Arch* 2011;459(3):307-313.
- ✓ Romanenko A, Ruiz-Sauri A, Morell-Quadreny L, Valencia G, et al. Microvessel Density is high in Clear-Cell Renal Cell Carcinomas of Ukrainian Patients Exposed to Chronic Persistent Low Dose Ionizing Radiation After The Chernobyl Accident. *Virchows Archiv* 2012; 460 (6):611-619.

Estos estudios mostraron un incremento en la morbilidad, agresividad y actividad proliferativa de los RCC en pacientes que vivieron expuestos de forma permanente a cesio 137, en áreas contaminadas de ucrania [133,140]. En general los resultados del grupo de investigación sugirieron por primera vez que la exposición crónica o de larga duración (más de 14 años) de dosis bajas de radiaciones ionizantes podría influir en humanos sobre la génesis de RCC. Los datos proporcionaron pruebas concluyentes de un incremento dramático en la incidencia de atipia epitelial nuclear y del carcinoma in situ (CIS) del tejido peritumoral cortical y medular, especialmente en asociación con la nefropatía crónica por radiación en pacientes que viven en las zonas con mayor radio-contaminación [133]. La tabla 1.5 resume las evidencias más representativas de estas investigaciones.

Evidencias significativas de la Influencia de CPLDIR en RCC	a. Nefropatía esclerosante atípica por radiación
	b. Grandes alteraciones nucleares y cambios sarcomatoides
	c. Aumento del estrés oxidativo
	d. Alteración en los mecanismos reguladores de apoptosis
	e. Penetración al estroma periférico al epitelio y su membrana basal con remodelación global de la matriz extracelular
	f. Desregulación del ciclo celular que afecta principalmente a los locus p16 ^{INK4A} /p14 ^{ARF}
	g. Alteraciones de los mecanismos de ubiquitinación celular
	h. Mayor densidad microvascular

Tabla 1.5 Evidencias de CPLDIR en RCC. Síntesis de investigaciones. Grupo Universidad de Valencia / Instituto de Urología de Kiev (2000-2012)

a. Nefropatía atípica esclerosante por radiación

La predominancia de cambios como la proliferación y regeneración de túbulos y conductos colectores de la nefropatía atípica proliferativa esclerosante por radiación (RSPAN) de los pacientes ucranianos, se asociaron con un aumento dramático de la expresión PCNA y K-ras en comparación con el grupo control de pacientes españoles analógicos [133].

b. Grandes alteraciones nucleares y cambios sarcomatoides

Se estudiaron los patrones histológicos de RCC, la atipia nuclear tubular y el carcinoma in situ (CIS) de tejido renal peritumoral, en la población ucraniana, usando un grupo control de pacientes con CCR análogos de Valencia (España). Los resultados de la investigación evidenciaron una estrecha relación entre el nivel de radiación de la nefropatía peritumoral, asociada con predominio de atipias nucleares múltiples del epitelio en las áreas medulares, y expresión de K-ras en los RCC [140]. El espectacular aumento de la agresividad y la actividad proliferativa, apoyado por una fuerte expresión del antígeno de proliferación celular nuclear (PCNA) y del K-ras de los RCC de los grupos ucranianos, especialmente los de estadios III y IV, mostraron una buena correlación con la duración de la CPLDIR en la carcinogénesis renal [140].

Además, en varios trabajos del mismo grupo, la transformación sarcomatoide se detectó sólo en los tumores de los pacientes ucranianos, aunque no hubo diferencias entre los provenientes de zonas contaminadas y zonas aparentemente limpias. Dichos cambios mostraron una distribución especialmente perivascular y se evidenciaron en menos de 10% del volumen total del tumor [137].

c. Aumento del estrés oxidativo

El grupo estudió la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX2) y la proteína inducida por la sintetasa de óxido nítrico (iNOS), buscando comprender mejor el papel de las anomalías de transición G1 / S en la progresión maligna del RCC expuestos a CPLDIR de pacientes que viven en zonas radiocontaminadas de Ucrania después del accidente de Chernóbil. Se observó Hipermetilación aberrante en 7 (32%) y 5 (23%) de los casos acompañado, con la pérdida de la expresión de inmunohistoquímica de los genes p16INK4a y p15INK4B, siendo especialmente sobresaliente para el gen p16INK4A. Una asociación con la sobreexpresión de COX2 y menos iNOS en los mismos tumores se observó. Estos datos sugieren que la inactivación del gen p16INK4A, pero no p15INK4B, inducida por el aumento de estrés

oxidativo asociado con un aumento dramático de COX2 generado por la CPLDIR podría ser una de las principales vías responsables de la progresión maligna de estos RCC [135]. Este resultado se asimila a los resultados de un estudio reciente en ratas donde se sugiere que los RCC pueden ser inducidos por el estrés oxidativo, y que la inactivación de los genes supresores de tumores p16INK4a p15INK4B podría ser una de las principales vías responsables de los RCC en ratas con inducción de estrés oxidativo inducidas [141].

d. Alteración en los mecanismos reguladores de apoptosis

Se demostró que en los pacientes ucranianos ccRCC DR5 + que viven en la zona de radiocontaminada la expresión de BAX tuvo una mayor tendencia a aumentar, junto con la supresión de (Bcl-2 y Bcl-x) moléculas antiapoptóticas y la sobreexpresión de p65 y p50 en los mismos tumores. Este estudio sugiere que la CPLDIR puede inducir la alteración de los mecanismos apoptóticos reguladores, lo que a su vez podría conducir a la mayor progresión del tumor y su resistencia a la apoptosis [136].

e. Penetración del tumor al estroma periférico al epitelio y su membrana basal con remodelación global de la matriz extracelular

Romanenko A, y colaboradores sugieren que los daños producidos por CPLDIR podrían inducir la remodelación global de los componentes de ECM con los cambios en áreas peri-epiteliales del estroma y de las membranas epiteliales basales (incluyendo fibronectina, laminina, alteraciones E-cadherin/ β -catenin complejos). Se encontró que los ccRCC de pacientes ucranianos crónicamente expuestos con bajas dosis de IR se caracterizan por una disrupción significativa de la ECM, una falta de comunicación organizada entre las células y la ECM, que conduce a la pérdida de la diferenciación celular. La desorganización de la ECM antes mencionada se asoció significativamente con la expresión intensa del TGF- β 1 en ccRCC de pacientes que han vivido más de 19 años en las zonas contaminadas de Ucrania con cesio 137, lo que sugiere ser el resultado de los daños crónicos por la LDIR [134].

f. Desregulación del ciclo celular que afecta principalmente a los locus p16INK4A/p14ARF

Se describen las alteraciones moleculares de los genes supresores de tumores localizados en el cromosoma 9p21 (locus y INK4a/ARF p15INK4B) en 26 tumores primarios de RCC en pacientes con diferentes grados de exposición a radiación ionizante después del accidente de Chernóbil en Ucrania. Se realizó La medición radiométrica de cesio 137 (137Cs), de todos

los pacientes antes de la cirugía, en la orina de 24 horas. Los resultados demuestran que los RCC de los pacientes que viven en las zonas radiocontaminadas mostraron hipermetilación aberrante de genes p14arf y p16INK4A, asociado con un aumento p38MAPK, p14ARF, MDM2, cyclinD1 Ki67 y los niveles de expresión de la proteína. Estos resultados muestran la posibilidad de que los daños crónicos de la CPLDIR activan el locus INK4a/ARF, dirigido a su vez por la activación de la cascada de p38MAPK. Estas acciones podrían conducir a interrupciones y pérdida de puestos de control del ciclo celular y facilitando por tanto la transformación celular [138,139].

g. Alteraciones de los mecanismos de ubiquitinación celular

Al intentar determinar si el proceso de ubiquitinación está involucrado en carcinogénesis del ccRCC asociada a CPLDIR en los pacientes que viven desde hace más de 20 años expuestos a cesio-137 (¹³⁷Cs) en áreas contaminadas después de la el accidente de Chernóbil en Ucrania, se evaluó la expresión inmunohistoquímica de la ubiquitina (Ub), SUMO1, SUMO enzima E2 conjugación Ubc9, y el ciclo celular p53 reguladores, MDM2, y p14ARF en 38 carcinomas de células renales convencionales de los pacientes ucranianos con diferentes grados de exposición a la radiación después de la el accidente de Chernóbil. Al compararlos con 18 casos controles con ccRCC españoles, No se observaron diferencias significativas, a pesar de ser mayor en los casos de Ucrania, en ambos se encontró la sobreexpresión de Ub. Por otra parte, esta expresión se asoció inversamente con SUMO1 y Ubc9, sin correlación con el grado nuclear del tumor. Estos resultados no permitieron considerar la expresión inmunohistoquímica de ubiquitinación y sumolación como marcadores valiosos para discriminar los efectos de CPLDIR en la carcinogénesis ccRCC [137].

h. Mayor densidad microvascular

En las descripciones histopatológicas de estas investigaciones se ha descrito un aumento de la MVD, al tiempo que se ha observado irregularidad de la red vascular intratumoral. En la comparación entre los grupos de pacientes con o sin exposición a radiación ionizante de bajas dosis y larga duración (CPLIDR), los grupos contaminados mostraron mayor MVD en relación a los pacientes no expuestos en todos los estadios tumorales. Incluso en los estadios TNM 1 y 2, donde el ccRCC de los distintos grupos mostraban mayor hegemonía en sus datos, y la diferencia en su MVD fue estadísticamente significativa ($p < 0.1$) [142]. También se observan tramas vasculares más irregulares en los ccRCC provenientes de zonas contaminadas [142].

1.4 Técnicas de inmunohistoquímica

1.4.1 Generalidades

La IQH comprende todas aquellas técnicas basadas en reacciones tipo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) que sirven para identificar antígenos tisulares y/o celulares. Esta reacción es incolora y se hará visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia (trazador o marcador) que absorbe, emite luz o produce coloración. Este marcaje se puede realizar con: fluorocromos (inmunofluorescencia), enzimas (técnicas inmunoenzimáticas), iones metálicos en forma coloidal (técnicas de inmuno-oro) o isótopos radioactivos (técnicas inmunoradioactivas). A su vez, el marcaje del Ag problema se puede llevar a cabo mediante métodos directos Ag-Ac primario o indirectos a través de un Ac secundario el cual se une al Ac primario, y éste se adhiere a su vez al Ag problema [56].

Los tumores expresan gran número de antígenos a partir de los cuales se pueden obtener Ac primarios de 2 tipos: policlonales y monoclonales. Los Ac policlonales se obtienen de animales inmunizados con el Ag problema y tienen inconvenientes como el ser poco específicos para el Ag. También tienen respuestas variables de expresión según el animal utilizado y un proceso de obtención laborioso y limitado. Por eso Köler y Milstein desarrollaron en 1975 una técnica innovadora de obtención de Ac monoclonales partiendo de “**Hibridomas**” (cultivos celulares que son resultado de la fusión de una célula neoplásica y un linfocito). Estos hibridomas poseen la característica de producción ilimitada de Ac altamente específicos y homogéneos frente a un Ag muy concreto [56].

La técnica más utilizada en IHQ fue desarrollada por Hsu y colaboradores en 1981, Ellos introducen un método por el que se amplifica la “señal”. Esta amplificación es absolutamente necesaria para el revelado de los determinantes antigénicos de tejidos incluidos en parafina. Las sustancias más usadas son la avidina y la biotina, las cuales muestran una gran afinidad entre sí. Este método se denomina ABC de forma abreviada. Con posterioridad se idearon una serie de métodos de recuperación antigénica de Ag desnaturalizados en parafina. Esas técnicas consisten en aplicar calor al tejido por medio de un horno microondas [61] o una autoclave que incrementa también la presión [62]. La evolución tecnológica de estos sistemas permite actualmente el procesado simultáneo de hasta 48 preparaciones pudiendo realizar un máximo de 35 pasos en el proceso (Dako-Autostainer) [63].

El examen microscópico del corte histológico o de la extensión citológica sometido a la técnica de IQH permite determinar la presencia o ausencia del Ag problema (expresión). Además, ubicar en qué

lugar exacto del tejido o de las células se encuentra alojado el complejo marcado. Actualmente el estudio de los marcadores con IQH es muy importante en anatomía patológica para el diagnóstico de lesiones tumorales y su pronóstico. Además, la relación costo-beneficio ha sido fundamental para su uso creciente. Las dificultades más frecuentes en el uso de estas técnicas son: la selección de las áreas tumorales a estudiar, el tipo de clon de Ac y la proporción mínima de células positivas necesarias para considerar un inmunofenotipo tumoral concreto (nivel umbral de positividad).

1.4.2 Marcaje de procesos angiogénicos

Dos criterios fundamentales pueden hacer evidente la existencia de actividad angiogénica: una mayor cantidad de microvasos por área de tejido (densidad) y un incremento notable de los factores proangiogénicos, que antes se mantenían en equilibrio con los inhibidores de la angiogénesis. La técnica IQH nos permite mostrar esa red vascular y evidenciar el incremento de los factores junto a la mayor o menor expresión de sus receptores [56].

El inmunomarcaje o inmunodetección de vasos sanguíneos y linfáticos ha sido utilizada por más de una década en múltiples investigaciones para diversos fines. Desde la descripción de la angiogénesis embrionaria hasta el comportamiento, clasificación y pronóstico de muchas neoplasias, llegando a convertirse en fundamento para nuevos tratamientos antitumorales (diversos medicamentos antiangiogénicos), que tienen como perspectiva aumentar la supervivencia del paciente [103].

1.4.2.1 Marcadores vasculares

Son moléculas expresadas en la membrana y/o citoplasma de la célula endotelial que actúan como antígenos frente a anticuerpos específicos. Estos últimos se utilizan para inmunomarcarse el endotelio vascular, permitiendo identificar los vasos sanguíneos. Los más conocidos y usados son el CD31, CD34, el factor VIII o de Von Willebrand y el D2-40.

- **El factor VIII o (FvW)** es una gran molécula de 1000 kDa que forma parte de los factores de la coagulación. Ultraestructuralmente se localiza en los cuerpos de Weibel-Palade, observables con microscopía electrónica [41]. Se ha observado en células endoteliales, megacariocitos y plaquetas, por lo que es el más específico para los tumores derivados de células endoteliales [42]. Sin embargo, su sensibilidad es muy variable, ya que la aparición de cuerpos de Weibel-Palade citoplasmáticos se relaciona con el grado de diferenciación de la célula endotelial.

- **El CD34** es una glicoproteína transmembrana de 110 kDa presente en células hematopoyéticas humanas, células endoteliales, células dendríticas dérmicas y endoneuro [41,43,44]. Se considera un marcador altamente sensible, pero su especificidad se cuestiona cada vez más [44,46].
- **El CD31** es una glicoproteína de 130 kDa que se expresa en células hematopoyéticas, megacariocitos, plaquetas y algunas células plasmáticas. Corresponde a su vez a la PECAM expresada en la superficie de las células endoteliales y ha demostrado una muy alta especificidad y sensibilidad para tumores vasculares [41,45]. Investigaciones recientes han relacionado los vasos más diferenciados con la expresión de CD31, pero no de CD34; mientras que los vasos indiferenciados expresan CD31 y CD34 [47].
- **El D2-40** es un anticuerpo recientemente desarrollado, que reaccionó primero con una sialoglicoproteína denominada M2A en células testiculares, en células endoteliales de vasos linfáticos y en mesotelios [48,49,50,51]. Por esto, ha sido usado en estudios que relacionan la linfangiogenesis con la metástasis tumoral [47].

1.4.2.2 Marcadores de factores angiogénicos

Los procesos angiogénicos se describen observando la positividad de la reacción antígeno anticuerpo, para cada uno de los factores proangiogénicos, antiangiogénicos y sus receptores. El número de factores que actualmente se conocen ha ido en aumento y para ellos se ha desarrollado una variedad de anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. Los marcadores más frecuentemente usados en investigación se relacionan con la familia del VEGF y sus receptores, el PDGF, las angiopoyetinas, el HIF-1 y La VE-cadherina entre otros [146]. Los marcadores usados en la presente investigación con sus correspondientes características se resumen en la tabla 1.5.

El estudio de la expresión del VEGF en tejidos tumorales y peritumorales es fundamental para nuestra investigación, debido a su específica estimulación sobre células endoteliales, a consecuencia de eventos hipóxicos y otros condicionantes del microambiente tumoral. Las isoformas que más frecuentemente se producen por las células tumorales son la VEGF 121 y la VEGF 165 [100,101] y el marcador (anticuerpo) seleccionado (tabla 1.5) posee especificidad para dichas isoformas, más la VEGF 189.

El estudio del HIF-1 α en la presente investigación lo consideramos fundamental por la importancia que posee la hipoxia en los procesos angiogénicos y el marcador utilizado es muy sensible en tejido renal y tejidos tumorales hipóxicos. Así mismo investigamos El FGF-2, por su reconocido potencial mitogénico participante en la angiogénesis tanto embrionaria como postnatal. El marcador utilizado para tal fin en nuestro estudio tiene especificidad con el FGF-2 humano.

La sobre-expresión de los receptores VEGFR-1,2 y 3 tienen especificidad para evidenciar la neoformación de vasos sanguíneos y linfáticos respectivamente; mientras que la expresión del PDGFR- α muestra la potente inducción de proliferación celular y angiogénesis. Todos los marcadores (anticuerpos) seleccionados para el estudio de estos receptores tienen reportada una buena afinidad con su antígeno humano.

La expresión de la VE-cadherina es importante por su relación con las fases de asociación y desestabilización dentro de la angiogénesis, donde participa dicha molécula de adhesión celular. El marcador utilizado en nuestra investigación tiene buena reactividad con el correspondiente antígeno humano y ha sido probada en anteriores investigaciones.

Immunomarcador	Antígeno a marcar	Ubicación tisular	Aplicación Recomendada
(AB-7) de VEGF, Clon VG1 (anticuerpo monoclonal de ratón)	VEGF sus isoformas 121,165 y 189	Citoplasma, superficie celular y matriz extracelular	Detección de VEGF sus isoformas en humanos y otras especies no conocidas. Solo para uso investigativo
FGF-2 (147): sc-79 (anticuerpo policlonal de conejo)	Péptido de la Región internalizada del FGF-2	Citoplasma y Matriz extracelular	Para detección del FGF-2 precursor y maduro en ratón, ratas y humanos. Adicionalmente en otras especies (canina equina, bovina, porcina y aviar). Solo para uso investigativo
Anti-HIF-1 α , clon H1 α 67 (anticuerpo monoclonal de ratón)	HIF-1 α	Citoplasma en normoxia y translocación nuclear en hipoxia	Reconocimiento de HIF-1 α grandes niveles en riñón y corazón. Sobreexpresión en zonas tumorales hipóxicas. Solo para uso investigativo
Flt-1 (C-17): sc-316 anti-VEGFR-1 (anticuerpo policlonal de conejo)	Flt-1 ó VEGFR-1 en su dominio extracelular, extremo C terminal de origen humano	Membrana celular	Para detección de Flt-1 VEGFR-1 en ratones, ratas y humanos. Solo para uso investigativo. Adicionalmente en otras especies (canina, bovina y porcina) Solo para uso investigativo
Flk-1 (C-20): sc-315 anti-VEGFR-2 (anticuerpo policlonal de conejo)	Flk-1 ó VEGFR-2 En su dominio extracelular, extremo C terminal de ratón	Membrana celular	Detección de Flk-1 ó VEGFR-2 en ratones y ratas. Solo para uso investigativo
Flt-4 (C-20): sc-321 anti-VEGFR-3 (anticuerpo policlonal de conejo)	Flt-4 ó VEGFR-3 En su dominio extracelular, extremo C terminal de origen humano	Membrana celular	Detección de Flt-4 ó VEGFR-3 en ratones, ratas y humanos. Solo para uso investigativo
PDGFR- α (C20): sc-338 (anticuerpo policlonal de conejo)	PDGFR- α en su extremo C terminal de origen humano	Membrana celular	Detección de PDGFR- α en ratones, ratas y humanos. Adicionalmente en otras especies (canina equina, bovina, porcina y aviar). Solo para uso investigativo
VE-cadherina (C19):sc-6458 (anticuerpo policlonal de cabra)	Extremo C terminal de VE-cadherina de origen humano	Uniones intercelulares de células endoteliales	Detección de VE-cadherina en ratones, ratas y humanos. Solo para uso investigativo

Tabla 1.5 Características de inmunomarcadores usados

1.5 Métodos de cuantificación. Morfometría

1.5.1 Generalidades

Al evolucionar la técnica microscópica cada detalle o cambio celular y arquitectural observado, normal o patológico, necesitaba ser cuantificado objetivamente para su comparación y análisis [57]. La medición reproducible le da objetividad a la evaluación cuantitativa en el área científica. En Biomedicina se denomina morfometría a todo proceso de medición de estructuras o áreas de órganos, tejidos, células e inclusive núcleos; utilizando generalmente técnicas de análisis de imagen. Dicha técnica es el resultado de una teoría matemática o geométrica específicamente, con ella se definen mediciones de longitudes, áreas o volúmenes y la cuantificación de una estructura definida ya sea macro o microscópica [52].

En 1924 Feulgen descubrió un reactivo cromogénico que reaccionaba específicamente con el ADN nuclear, contribuyendo decisivamente al desarrollo de las técnicas cuantitativas; permitiendo así el estudio morfométrico nuclear y el contenido de ADN (ploidía). A estos adelantos se sumó posteriormente el de las técnicas de análisis de imagen asociadas a programas informáticos, permitiendo el control directo de los objetos que se están valorando, con lo que se mejoran ostensiblemente las mediciones [57]. Más recientemente se produjo la aparición de la citometría dinámica o de flujo (CMF) la cual se emplea para estudiar características estructurales y funcionales de células o partículas en suspensión [104].

Las valoraciones cuantitativas (morfometría) tienen gran significancia tanto en investigación como en la anatomía patológica, por mostrar las siguientes ventajas:

- ✓ Disminuir la variabilidad inter e intra-observador.
- ✓ Observación objetiva del patólogo (clasificaciones).
- ✓ Valoración pronóstica.
- ✓ Aumentar la sensibilidad en la identificación de cambios mínimos en los rasgos celulares.
- ✓ Procurar una serie de valores estándar para el diagnóstico y la docencia.

Las aplicaciones biomédicas actuales de la morfometría podemos resumirlas en los siguientes tópicos generales:

- ✓ Caracterización de la forma celular (membrana).
- ✓ Caracterización de la forma nuclear.

- ✓ Cuantificación del número de formas intracitoplasmáticas.
- ✓ Cuantificación de estructuras tisulares (vasos, núcleos, complejos marcados).
- ✓ Cuantificación y caracterización de ADN.
- ✓ Cuantificación de características específicas expresadas por un elemento celular marcado con tinciones y/o inmunocitotécnicas.
- ✓ Cuantificación de células, áreas de tejido definido.

En general la técnica morfométrica por citometría estática (CME) se puede resumir en cinco pasos generales:

1.- **Preparación y requisitos:** va desde la obtención de la imagen por una videocámara adaptada al microscopio, pasando luego por un procesamiento digital de la imagen, hasta que dicha imagen sea tratada con el software en el ordenador (fig. 1.10).



Figura 1.10 Leica DMD-108 e imagen obtenida en 20x

2.- **Ubicación de zonas adecuadas y preparación de la imagen:** se buscan áreas de la preparación en que las células estén en la disposición técnica esperada, en nuestro caso las llamadas zonas calientes por la intensidad del evento neoplásico. Luego se prepara la imagen para que el programa la pueda captar mejor, mediante la utilización de filtros digitales de paso bajo y de paso alto. Con los de paso bajo se elimina “ruido” de la imagen. Con los de paso alto se incrementa la diferencia entre la imagen y las zonas adyacentes, resaltando la superficie inmunomarcada (fig. 1.11).

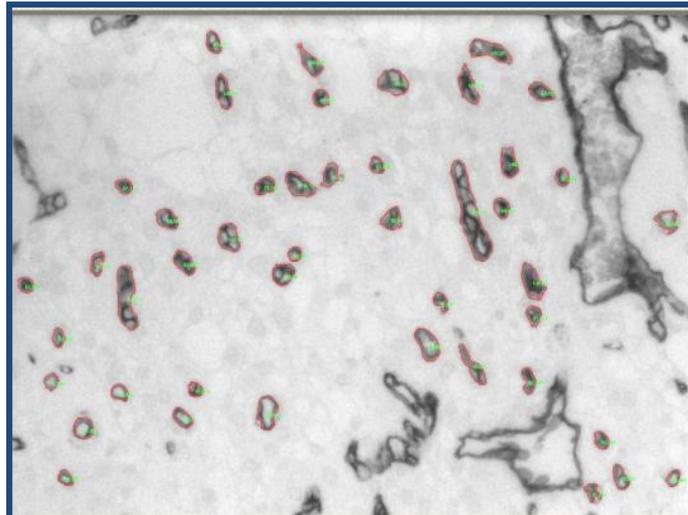


Figura 1.11 Preparación de la imagen (canales y filtros)

3.- **Segmentación:** se denomina así, puesto que separa los componentes de la imagen que van a ser estudiados de los que no deben ser tenidos en cuenta en la valoración. Se decide un umbral o se colocan intervalos dentro de los cuales se va a realizar el análisis. Esta fase puede ser interactiva, eligiendo los objetos el observador; automática, decidiéndolo la máquina; o bien semiautomáticas en la que podemos incluir o quitar algunos objetos, después del procesado automático (fig. 1.12).

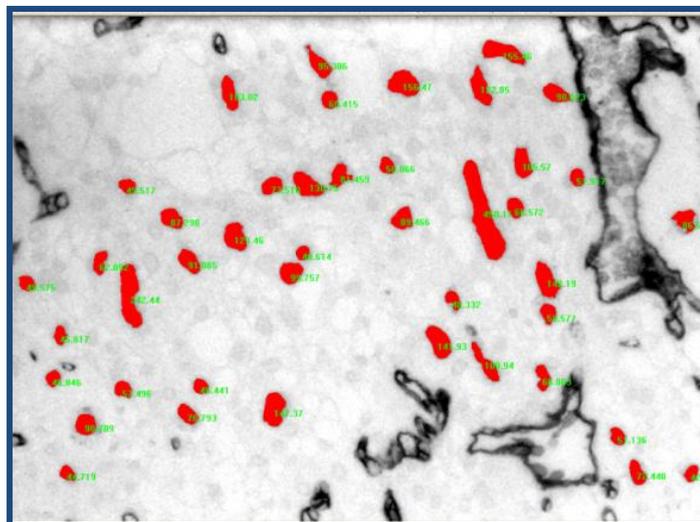


Figura 1.12 Segmentación de la imagen

4.- **Erosión/Dilatación:** consiste en quitar/poner una capa de píxeles de la superficie del objeto a medir y así se alisa la superficie, aunque, el fin último suele ser aislar células o estructuras en contacto, lo que permitirá su medida individual.

5.- **Esqueletización:** se realiza limitando las estructuras o estrechándolas hasta ubicarlas en una línea. Esqueletos lineales nos indican formas simples, ovoideas o elipses y esqueletos ramificados corresponden a estructuras complejas.

Realizados estos pasos, se hace la activación del software con la consecuente ubicación y relación de las imágenes con su correspondiente plantilla en una hoja de cálculo (fig. 1.13). Este documento debe ser preparado y marcado previamente por el especialista que manipula el proceso. Es de resaltar, que gran parte de la significancia de los resultados, tiene que ver con la objetividad del especialista ante cada imagen. Esa cualidad del proceso conlleva a ser casi indispensable que las imágenes lleguen a él previamente numeradas con secuencias que oculten la proveniencia específica de la muestra, tanto en los casos como en los controles.

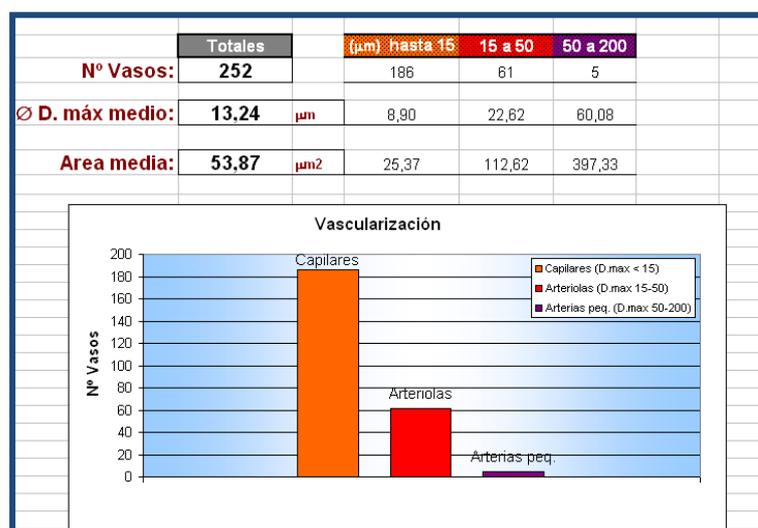


Figura 1.13 Exportación de datos y recolección organizada en hoja de cálculos

1.5.2 Cuantificación de vasos: densidad microvascular

Los vasos sanguíneos y linfáticos pueden caracterizarse de acuerdo a su tamaño y al diámetro de su luz. Después de tratar el tejido con técnicas de inmunohistoquímica se mide cuantos vasos son visibles en la imagen, de acuerdo a las características predeterminadas por el analista, como ordenes automatizadas al software. El programa da como respuesta un número de objetos contados a lo que el analista puede agregar o borrar manualmente algunas estructuras de acuerdo al criterio del especialista. Anteriormente esta valoración se hacía manualmente contabilizando en una imagen ampliada y previamente cuadrículada para la medición. Los actuales programas computarizados hacen más eficiente la valoración.

- Densidad microvascular

Aunque resulta difícil medir la angiogénesis tumoral, se considera que la determinación de la cantidad de microvasos teñidos mediante IQH por área de un corte histológico es un indicador fiable del proceso neovascular y es expresado en % o en unidades de área [53]. En 1991, Weidner y colaboradores desarrollaron un nuevo método para la cuantificación de los microvasos dentro del tejido tumoral, MVD [103]. Desde entonces, el método de seleccionar los “hot spots” o zonas de mayor vascularización es el más utilizado al escoger las imágenes tisulares donde se realiza la medición y se considera uno de los más reproducibles [54]. También se puede evaluar la MVD observando áreas seleccionadas al azar y contando en ellas las zonas de mayor densidad vascular, siendo este método menos recomendado. Diferentes métodos basados en análisis de imágenes computarizadas han sido desarrollados para obtener datos cuantificables en tejidos teñidos con IQH, disminuyendo la subjetividad en la valoración de los vasos [117,118,119]. Sin embargo la adquisición y los gastos de funcionamiento de estos medios son de alto costo [103].

La cuantificación de la MVD no es suficiente para revelar el estado funcional de la angiogénesis tumoral [103], sin embargo puede proporcionar información valiosa a los médicos e investigadores, para evaluar y predecir la biología y el comportamiento clínico de la neoplasia [55,103]. Además, la MVD es una variable importante al permitir evaluar nuevos tratamientos experimentales que tienen como objetivo el estudio de la angiogénesis [55]. Weidner y su equipo mostraron que la MVD en tumores de mama de mal pronóstico y metástasis era el doble que en tumores mamarios de buen pronóstico y sin metástasis. Esta correlación fue corroborada en carcinoma de próstata [125,103]. El bajo consumo de oxígeno [123] y la tolerancia a condiciones hipóxicas de las células tumorales [124], incrementan la distancia intercapilar en algunos tipos de tumor, en sus primeros estadios, lo que explicaría la disminución de su MVD, en comparación a la MVD de su tejido normal correspondiente [103].

Los resultados de las investigaciones para MVD en RCC han mostrado un incremento inversamente proporcional a la diferenciación de la célula tumoral [106]. Sin embargo, los niveles de significación de estos datos, comparados con los niveles de supervivencia y el potencial metastásico del tumor han sido bajos y contradictorios en algunos estudios. Yoshino y su equipo informa que la MVD en pacientes con metástasis fue significativamente más alta, que en los pacientes libres de enfermedad por más de 3 años [107]. Además, el recuento de microvasos fue el único predictor significativo del pronóstico para los pacientes con T1 y T2 libres de metástasis. Paradis también relató que la supervivencia del paciente se correlacionó significativamente con MVD en el CCR [108]. Dekel y

colaboradores también encontraron una correlación entre una mayor MVD y la metástasis [109].

Sin embargo, para McLennan y Bostwick no hubo correlación de MVD con el estadio clínico, patológico y el grado nuclear de Fuhrman [110]. Slaton y colaboradores no encontraron correlación entre MVD y la presencia de metástasis [111]. Sin embargo, Delahunt y su equipo encontraron una diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de los tumores de mayor y menor de MVD, donde una MVD más alta se asocia a una mayor supervivencia de los pacientes [112]. Los estudios de Leclereq [113] y Sabo [114] mostraron que una alta MVD se asoció con mayor supervivencia de los pacientes. Kohler y colaboradores [115] y Hemmerlein y su equipo [116] reportaron una disminución significativa en la MVD en RCC de estadio 1 a estadio 3. Por último, Imao encontró que una alta MVD en CCR fue significativamente relacionada con la condición de tumor no metastásico y tumores más pequeños, pero sin que la MVD pueda ser un factor pronóstico independiente [105].

1.5.3 Cuantificación de factores en procesos angiogénicos

Las estimaciones para este tipo de evaluación son muy variadas, pero el patrón de valoración más utilizado en investigaciones similares a la presente es la siguiente:

- 0= Negativo (-), menos del 5% células teñidas
- 1= Poco positivo (+), 5% al 10% de las células teñidas
- 2= Moderadamente positivo (++), 10% al 50% de las células teñidas
- 3= Fuertemente positivo (+++), más del 50% de las células se tiñen.

Estos métodos de medición reproducibles han sido utilizados en numerosos trabajos de investigación para la valoración de factores de la actividad angiogénica. En varias publicaciones se ha medido la expresión del VEGF a través de los niveles de mRNA o la proteína, mostrando el aumento de la expresión de VEGF en el tejido tumoral, apoyados en la IHQ y comparándose con su expresión en el tejido renal normal [58,59].

Nuestro grupo de investigación evaluó la expresión inmunohistoquímica de ubiquitin (Ub) en RCC, teniendo en cuenta la intensidad de la tinción y sus patrones de distribución. La intensidad de la tinción se obtuvo utilizando los siguientes criterios: 0, sin tinción detectable; 1, baja intensidad; 2, moderada intensidad; y 3, de tinción fuerte. La extensión de la tinción se puntuó como 0, sin tinción detectable; 1, tinción baja y difusa (células teñidas < del 10%); 2, moderada (entre 10% al 50% de células teñidas), y 3, la tinción homogénea fuerte (>del 50% de células teñidas). La puntuación final se determinó como el producto de la intensidad y la extensión (0-9) [126].

Los protocolos de valoración utilizados en este área son similares y buscan en general la estimación de los niveles de intensidad del marcaje (niveles de positividad + ó 1, ++ ó 2, +++ ó 3). Además de los niveles de carencia de intensidad de la reacción (negatividad ó 0). Lidgren y su equipo estudiaron la expresión de HIF-1 alfa en cuatro grupos según la intensidad de la tinción (0-3), donde los tumores que carecían de tinción se definieron como el grupo 0. Los grupos del 1 al 3 se definieron como HIF-1 alfa positivo, pero se separaron en función de la intensidad (1=débil, 2=medio, 3=fuerte) [60]. Sümer y colaboradores estudiaron la expresión de VEGF y TSP-1 teniendo en cuenta el porcentaje de células tumorales positivas VEGF y el porcentaje de inmunoreactividad extracelular para TSP-1; se calificó como: 0 = sin tinción, 1= 0-25%, 2= 26-50%, 3= 51-75% y 4= 76-100%. La puntuación de la expresión fue calculada multiplicando el porcentaje de calificación positiva por el nivel de intensidad (escala de puntuación 0-12). Se estimó positiva para la TSP-1 sólo la inmunoreactividad extracelular, debido a que la reactividad citoplasmática y nuclear, se consideró inespecífica [120].

Yagasaki cuantificó la intensidad de la tinción de VEGF, TGF- β 1 y MMP-2, clasificándola en una escala de cuatro grados: 0, ausencia de inmunotinción o tinción débil membranosa de las células tumorales; 1+, tinción membranosa en la mayoría de las células tumorales; 2+, difusa membranosa y / o tinción citoplásmica en grupos de células tumorales; y 3+, tinción citoplásmica significativa en la mayoría de las células tumorales [121].

Es poco común el uso de valoraciones más individuales y menos reproducibles. Los estudios de Xhang y su equipo valoraron la expresión de VEGF y MMP mediante la medición de la proporción de las células tumorales con tinción positiva de VEGF y MMP, en al menos en 10 campos diferentes. Las células tumorales fueron examinadas con un aumento de 100x para cada sección de tejido y una expresión se consideró positiva cuando el índice fue superior al 10% en cada caso [122].

La homologación de métodos de estimación cuantitativa en este campo se basa en su reproducibilidad y lógica científica. Actualmente, los adelantos tecnológicos (nuevas versiones de aplicaciones y software de medición) toman estas premisas como fundamento y pretenden mayor detalle en la diferencia de intensidades, sumado a la posibilidad de lectura simultánea de mayor cantidad de especímenes (TMA), sin perder la cualificación de la medición [119, 158]. El Image Pro-plus 7.0 y el Panoramic Viewer (fig. 1.14) utilizados por nuestro grupo de investigación son muestra de ello.

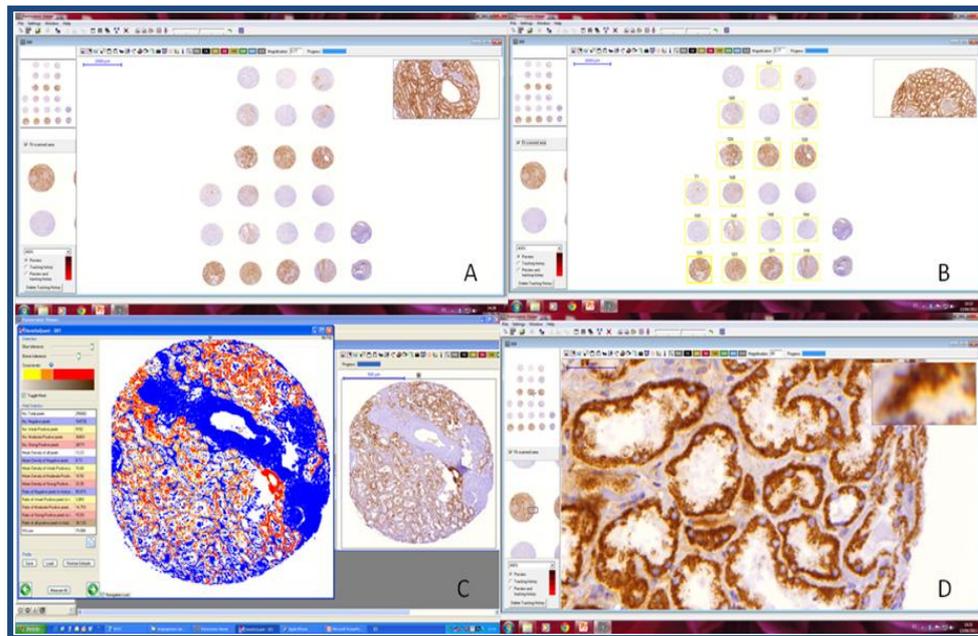


Figura 1.14 Panoramic Viewer A.- Visualización de TMA; B.- Identificación de componentes a medir; C.- Medición automatizada del TMA con Densito-Quant; D.- Visualización para valoración manual de TMA con Densito-Quant

1.6 Hipótesis y objetivos

1.6.1 Hipótesis

A la vista de los datos expuestos en la revisión bibliográfica se plantearon las siguientes hipótesis de trabajos:

1. El estudio morfométrico permite objetivar parámetros descriptivos para establecer patrones de comportamiento de la angiogénesis en el área tumoral del ccRCC, el área peritumoral y los riñones sanos. Además el estudio morfométrico nos permitirá comparar los resultados obtenidos en las diferentes zonas geográficas: Ucrania (zona radiocontaminada y zona no contaminada), España y Colombia.
2. Los patrones de comportamiento de la angiogénesis en el carcinoma renal de células claras (ccRCC) pueden variar de acuerdo a su procedencia geográfica y a la exposición a bajas dosis de radiaciones ionizantes de larga duración.
3. Habrá más vasos neoformados detectados por MVD en los ccRCC procedentes de zonas con mayor exposición a CPLDIR en comparación con los ccRCC de Ucrania provenientes de zona sin radiocontaminación, los ccRCC de Valencia España y los ccRCC de Colombia.
4. Los patrones de comportamiento de la angiogénesis en el riñón afecto por ccRCC, tanto en su zona tumoral como en la zona peritumoral estarán alterados en comparación a los evidenciados en el riñón normal.
5. La expresión de los factores angiogénicos y sus receptores tendrán un patrón de comportamiento diferente en el ccRCC según el nivel de exposición a la variable irradiación ionizante a bajas dosis por largos periodos.

1.6.2 Objetivos

Para contrastar estas hipótesis se propusieron los siguientes objetivos:

- 1- Estudiar los mecanismos de angiogénesis en el carcinoma renal de células claras (ccRCC), en el área peritumoral, y en el riñón sano a través de un estudio morfométrico de muestras procedentes de tres orígenes geográficos con condiciones ambientales específica (diferente nivel de exposición a CPLDIR).
- 2- Analizar morfométricamente la densidad microvascular (MVD) en el ccRCC y el área peritumoral, previamente inmunomarcados con CD31, de tumores procedentes de Ucrania tanto de la zona radiocontaminada como de la zona sin radiocontaminación.
- 3- Analizar morfométricamente la MVD en el ccRCC, la zona peritumoral y el riñón sano, previamente inmunomarcados con CD31, de tumores procedentes de España y Colombia.
- 4- Analizar por morfometría la expresión de los diferentes factores participantes de la respuesta angiogénica (VEFG, HIF- α , FGF- β , VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β y la VE-cadherin) en el ccRCC y su área peritumoral procedentes de los tres diferentes orígenes geográficos y el riñón sano solo de España y Colombia, utilizando la inmunohistoquímica como apoyo a la morfometría.

2. METODOLOGÍA

2. METODOLOGÍA

2.1 Material

2.1.1 Selección del material

Hemos recogido 135 casos de ccRCC, 25 procedentes de Ucrania zona limpia, 60 de Ucrania zona contaminada, 25 de España y 25 de Colombia, de los cuales hemos excluido 10 casos procedentes del grupo de tumores renales de Ucrania zona contaminada y 1 procedente de Colombia. Ocho de ellos por no ser de células claras y 3 por poseer amplias áreas de necrosis. Al final se analizaron un total de 298 muestras, 124 casos de ccRCC, 124 muestras de la zona peritumoral del respectivo riñón afecto y 50 muestras de riñones sanos (sin ccRCC), que se utilizaron como control. Del total, 150/298 procedían de Ucrania (Instituto Urológico de Kiev), 75/298 procedían de España (Hospital Clínico Universitario de Valencia) y 73/298 muestras procedían de Colombia (Departamento de Patología del Hospital Universidad del Norte de Barranquilla y Departamento de Medicina Forense de Barranquilla). El estudio se realizó con el debido consentimiento del comité científico y ética de las instituciones involucradas en la investigación. La figura 2.1 resume la correspondiente distribución y procedencia del material utilizado.

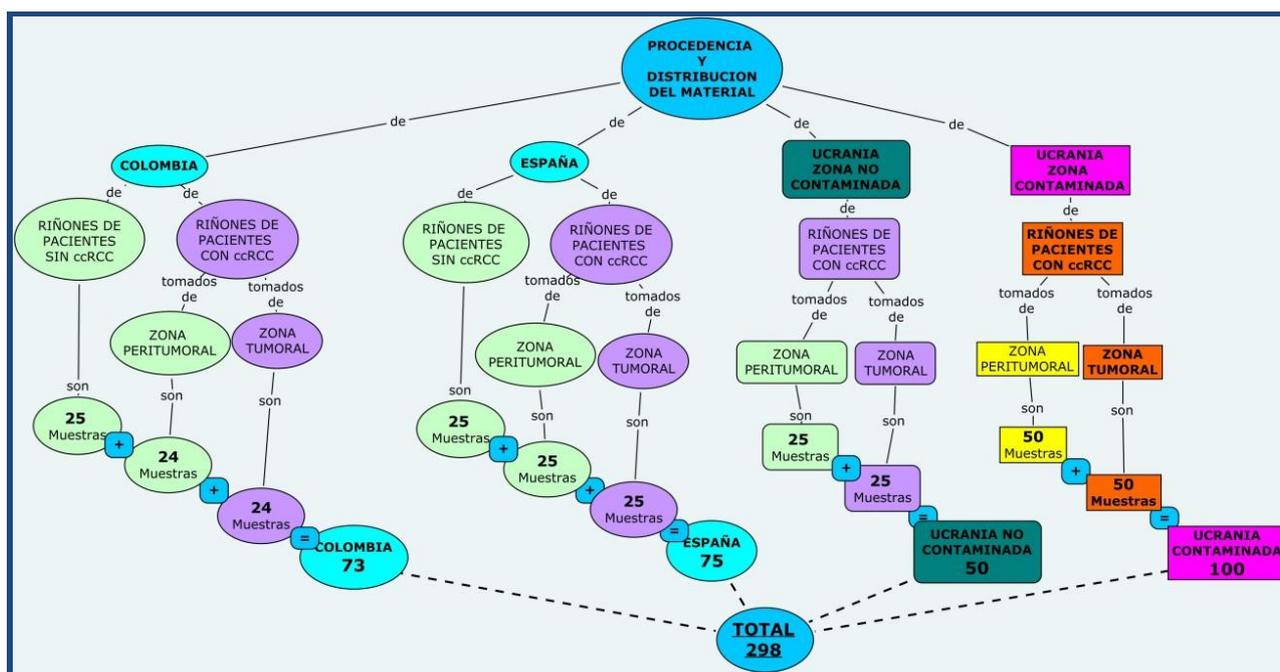


Figura 2.1 Procedencia y distribución del material de la investigación

Para el estudio se utilizó material archivado de biopsias procedentes de pacientes con carcinoma renal y tratados mediante nefrectomía sin tratamiento previo. Las muestras de tejido renal sano se obtuvieron de riñones normales procedentes de autopsias de fallecidos sin sufrir alguna patología renal. Todas las muestras fueron previamente fijadas en formaldehido, incluidas en bloques de parafina, cortadas de 5 a 7 µm y teñidas con la técnica de Hematoxilina-Eosina.

2.1.2 Construcción y organización de las micromatrices de tejidos (TMA)

Utilizando las secciones teñidas con H-E se seleccionaron las zonas más representativas de cada caso (tumoral, peritumoral o sano), sin necrosis, ni fibrosis, ni otras alteraciones patológicas que pudieran dificultar la interpretación de los resultados de la IHC. Después se diseñó en formato Word la plantilla de cada una de las matrices: una tabla que informa de la posición (fila y columna) de cada muestra, situando los cilindros tumorales y los de su respectiva muestra peritumoral de forma simétrica (dos cilindros tumorales y uno peritumoral de cada caso) (fig. 2.2). Para las matrices de tejido renal sano, la simple ubicación por secuencia numérica de sus dos muestras fue suficiente.

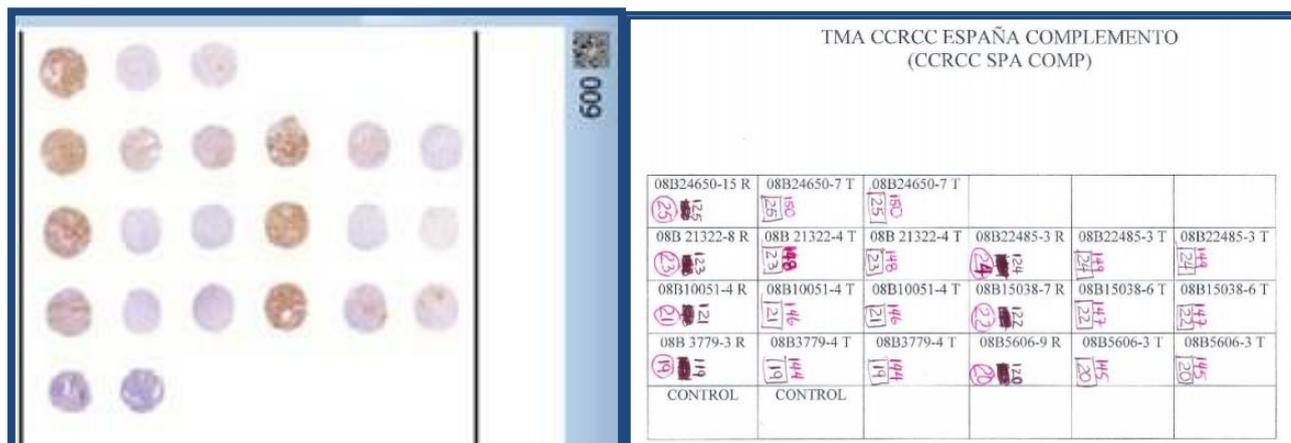


Figura 2.2 Organización TMA. Lámina y esquema

Para la elaboración de la matriz, una vez marcadas todas las secciones y los bloques de parafina correspondientes mediante círculos de aproximadamente 3 mm de diámetro, se incluyeron 2 a 3 cilindros de tejido de 1 mm de diámetro de cada una de las muestras. Dicha producción de cada TMA obtenido en su respectivo bloque de parafina receptor, se realizó con el equipo manual Beecher Instrument (silver Springs, MD, USA) (fig. 2.3).



Figura 2.3 Instrumento para producir TMA, Beecher Instrument

Este equipo consta de dos partes: una plataforma donde se fijan los bloques de parafina a perforar y un soporte con movimiento vertical donde se disponen las agujas perforadoras. El procedimiento básico que se utilizó es el siguiente (fig. 2.4):

1. Fijación del bloque de parafina de la matriz (bloque receptor) en la plataforma.
2. Perforación del bloque receptor mediante la aguja de menor diámetro.
3. Tapado temporal del bloque receptor mediante una plataforma móvil, y sobre ella colocación del bloque que contiene la muestra (bloque donante).
4. Perforación de la zona seleccionada en el bloque donante mediante la aguja de mayor diámetro, quedando la muestra dentro de la aguja.
5. Desplazamiento de la plataforma móvil para la exposición del bloque receptor.
6. Introducción del cilindro de muestra tumoral en el agujero previamente realizado en el bloque receptor.
7. Desplazamiento del bloque receptor 2 mm en el eje de las X, distancia suficiente entre los cilindros para evitar posibles contaminaciones.
8. Repetición de los pasos anteriores hasta completar la fila.
9. Volver al primer cilindro de la fila, desplazar el bloque receptor 2 mm en el eje de las Y para empezar una nueva fila.

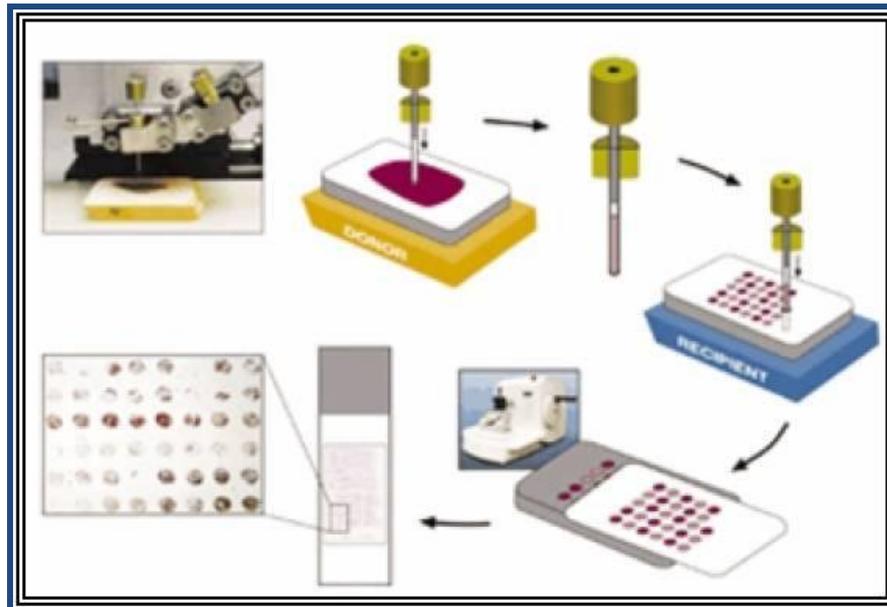


Figura 2.4 Proceso de producción de TMA

Acabado el proceso de perforado e introducción de los cilindros tumorales, el bloque receptor se incubó toda la noche a 37°C para asegurar la cohesión entre la parafina y las muestras incorporadas. Se procede entonces a la obtención de secciones de 3 a 5 μm . En este caso se cortaron 30 a 50 secciones en cada ocasión para reducir al máximo la pérdida de material debido al desgaste previo. Por último se tiñe una de las primeras secciones con hematoxilina-eosina para comprobar la calidad del material. Trabajando con 81 TMA en total, se construyeron 9 micromatrices básicas y cada una de ellas se repitió nueve veces (tabla 2.1) y (fig. 2.5).

IDENTIFICACION	CASOS	MUESTRAS	MARCADORES
1.-TMA-Valencia riñones normales	25	2 renales	1.-Hematoxilina-Eosina,
2.-TMA-Valencia ccRCC	18	2 tumorales	2.-VEGF,
		1 peritumoral	
3.-TMA-Valencia ccRCC complemento	7	2 tumorales	3.-FGF- β ,
		1 peritumoral	
4.-TMA-Colombia riñones normales	25	2 renales	4.-HIF-1 α ,
5.-TMA-Colombia ccRCC tumoral y peritumoral	25	2 tumorales	5.-VE-CADHERIN,
		1 peritumoral	
6.-TMA-Kiev 2 tumoral y peritumoral	20	2 tumorales	6.-VEGFR-1,
		1 peritumoral	
7.-TMA-Kiev 3 peritumoral	36	2 peritumorales	7.-VEGFR-2,
8.-TMA-Kiev 4 tumoral	36	2 tumorales	8.-VEGFR-3,
9.-TMA-Kiev 5 tumoral y peritumoral	29	2 tumorales	9.-PDGFR- β
		1 peritumoral	

Tabla 2.1 Distribución de TMAs del estudio

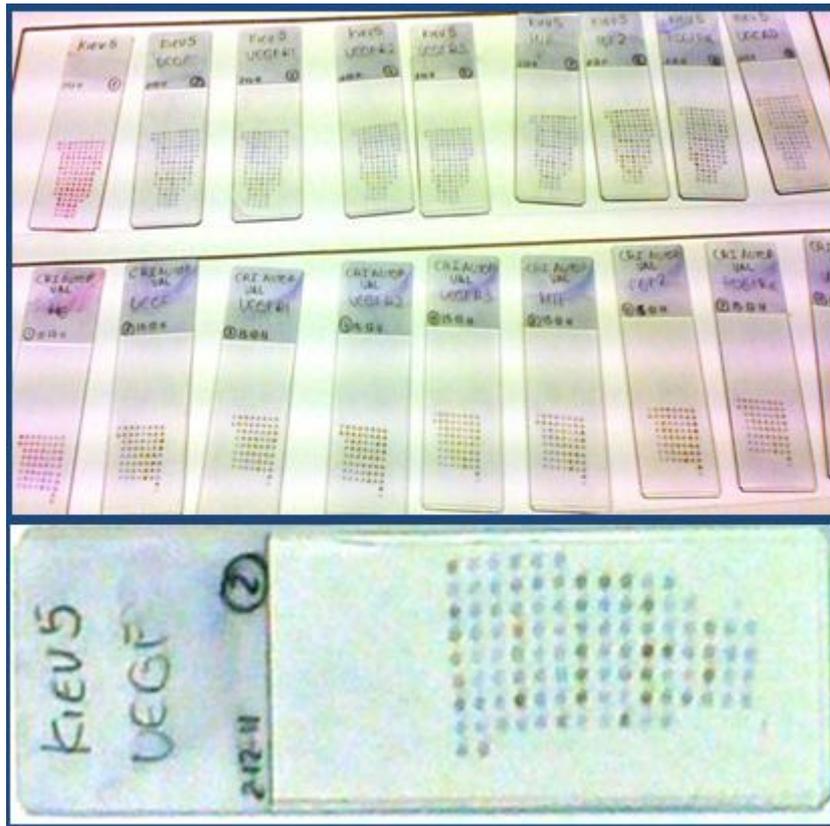


Figura 2.5 TMAs del estudio

2.1.3 Diagnóstico histopatológico

El estudio histopatológico se realizó inicialmente mediante una observación de las secciones o cortes completos de tejidos teñidos con hematoxilina y eosina. Fueron escogidos solo los casos de RCC clasificados como carcinomas renales de células claras, excluyendo las variantes sarcomatoide y necróticas. El análisis de cada sección histológica de las muestras europeas (Ucrania y España) fueron analizadas independientemente por dos patólogos (ALLB y AR); mientras que para las muestras procedentes de Colombia, el análisis fue realizado por tres patólogos (ALLB, JP y RG); el patólogo común de todas las 320 muestras del trabajo fue el Profesor Antonio Llombart (ALLB).

La revisión histológica de los tejidos peritumorales al ccRCC y del tejido renal normal de pacientes sin ccRCC, fue confirmada además por dos histólogos (ARS y GV). Se tuvo en cuenta que la muestra fuese de región cortical sin signos de destrucción tisular post-biopsia o post-mortem, ni cambios histopatológicos compensatorios moderados y severos de algunas entidades (por ejemplo, esclerosis glomerulares en pacientes hipertensos). Los criterios clínicos, epidemiológicos y ambientales que se tuvieron en cuenta para la selección de los sujetos de estudio se resumen en la tabla 2.2.

	CRITERIOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	CRITERIOS EPIDEMIOLÓGICOS	CRITERIOS CPLDIR
MUESTRAS DE CCRCC SIN CPLDIR	De ccRCC primario sin evidencias de variantes sarcomatoides ni necróticas del tumor	Pacientes con ccRCC diagnosticados entre el 2004 a 2010 el mismo periodo de tiempo	Desarrollo de vida permanente por un periodo de más de 15 años antes del Diagnóstico de ccRCC en sitios de > de 80 Kms de distancia del Reactor de Chernóbil
MUESTRAS DE CCRCC CON CPLDIR	De ccRCC primario sin evidencias de variantes sarcomatoides ni necróticas del tumor	Pacientes con ccRCC diagnosticados entre 2004 a 2010	Desarrollo de vida permanente por un periodo de más de 15 años antes del Diagnóstico de ccRCC en sitios de < de 80 Kms de distancia del Reactor de Chernóbil
MUESTRAS DE TEJIDO RENAL NORMAL SIN ccRCC	Sin patologías neoplásicas, ni metabólicas, ni cardiovasculares con afectación renal severa. Sin alteraciones tisulares hipóxicas postmortem importantes	Nefrectomía parcial postmortem en pacientes fallecidos entre 2004 a 2010	Desarrollo de vida permanente por un periodo de más de 15 años antes de la muerte en sitios de > de 80 Kms de distancia del Reactor de Chernóbil

Tabla 2.2 Criterios clínicos, epidemiológicos y ambientales para la selección de los sujetos de estudio

2.1.4 Identificación de zonas normales y tumorales para TMA

Una vez realizado el estudio histopatológico de la muestra, se marcaban círculos en la lámina de aproximadamente 3 mm de diámetro. Dos círculos para zonas tumorales representativas, sin fibrosis ni necrosis y un círculo del mismo tamaño que marcaba una zona con tejido renal histológicamente normal. Estas zonas servían como guía para la elaboración de los TMA con 2 zonas tumorales y una renal para cada caso.

2.2 Métodos

2.2.1 Análisis de la angiogénesis por inmunohistoquímica

La mayor parte de la técnica inmunohistoquímica utilizada para poner en evidencia los vasos sanguíneos y la expresión de los factores angiogénicos se realizó con un sistema automatizado (autostainer de DAKO). El protocolo general utilizado para dicha técnica fue el siguiente:

- 1.- *Desparafinización*: se calentaron las preparaciones en estufa a 60°C por un mínimo de 30', luego se incluyeron las preparaciones en xilol durante 15'.
 - 2.- *Hidratación*: se incluyeron las preparaciones en alcoholes en orden gradual decreciente, luego se lavaban pasándolas por agua corriente y posteriormente con agua destilada.
 - 3.- *Pretratamiento de recuperación antigénica*: se realizó de acuerdo con las indicaciones específicas para cada anticuerpo (tabla 2.3).
- A partir de este punto, los pasos se realizan de forma automatizada y previamente estandarizada en el autostainer DAKO.
- 4.- *Inhibición de peroxidasa endógena*: por 10' con un tampón de fosfato que contiene peróxido de hidrógeno.
 - 5.- *Lavado con Tris Buffered Saline (TBS)*.
 - 6.- *Incubación con anticuerpo primario*: durante 1 hora.

7.- *Nuevo lavado con TBS.*

8.- *Incubación con anticuerpo secundario biotinizado:* se aplica el “biotiny lated link” - LSAB de DAKO durante 15'. El autostainer lo realiza con inmunoglobulinas biotinadas, que son anti-anticuerpos de conejo, ratón y cabra en solución de “Phosphate Buffered Saline” (PBS). Además contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/L de azida sódica.

9.- *Lavado con TBS.*

10.- *Enlace del complejo producido con Streptavidin-hrp:* durante 15'. Lo realiza con estreptavidina conjugada con peroxidasa en PBS y que además contiene una proteína estabilizadora y un agente antimicrobiano.

11.- *Lavado con TBS y lavado con agua destilada.*

12.- *Revelado de la reacción:* lo realiza con solución sustrato-cromógeno (DAKO) durante 5'. Compuesto por una solución tampón a pH 7.5, que contiene peróxido de hidrógeno y un conservante. Además una solución de cromógeno 3,3' con diaminobenzidina (DAB).

13.- *Lavado con agua destilada.*

14.- *Contraste del tejido:* la contratinción se realizó con hematoxilina en el caso de los TMA para valoración de los factores participantes de la angiogénesis y con verde metilo para el caso de las preparaciones para visualización de CD31.

15.- *Lavar con agua.*

A partir de este paso se trabaja de forma manual fuera del autostainer DAKO.

16.- *Deshidratación:* se incluyen las preparaciones en alcoholes crecientes, luego se pasan las preparaciones por xiloles.

17.- *Montaje final de las láminas.*

Los pasos 8, 9 y 10, derivados de la incubación del anticuerpo secundario y la amplificación de la reacción, se modificaron para dos antígenos (CD31 y VE-cadherina), en los que se reemplazó el complejo Avidina-Biotina por el método EnVision de DAKO realizado igualmente en el autostainer.

ANTICUERPO	DILUCION	PRETRATAMIENTO	SISTEMA DE VISUALIZACION	CASA COMERCIAL
VEGF	1/100	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmosferas con tampón de pH alto comercial de DAKO (tris/EDTA a pH 9)	DAKO LSAB	NEOMARKERS (LAB VISION)
VEGFR-1	1/400	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmosferas con tampón de pH bajo comercial de DAKO (citrato a pH 6,1)	DAKO LSAB	SANTA CRUZ Biotechnology
VEGFR-2	1/400	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmosferas con tampón de pH bajo comercial de DAKO (citrato a pH 6,1)	DAKO LSAB	SANTA CRUZ Biotechnology
VEGFR-3	1/400	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmosferas con tampón de pH bajo comercial de DAKO (citrato a pH 6,1)	DAKO LSAB	SANTA CRUZ Biotechnology
FGF-2	1/200	Baño a 99°C por 40 minutos con tampón tris-EDTA a pH 9	DAKO LSAB	SANTA CRUZ Biotechnology
PDGFR- α	1/100	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmosferas con tampón de pH bajo comercial de DAKO (citrato a pH 6,1)	DAKO LSAB	SANTA CRUZ Biotechnology
HIF-1 α	1/500	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmosferas con tampón de pH alto comercial de DAKO (tris/EDTA a pH 9)	DAKO LSAB	SANTA CRUZ Biotechnology
VE-cadherina	1/100	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmosferas con tampón de pH bajo comercial de DAKO (citrato pH 6,1)	DAKO ENVISION	SANTA CRUZ Biotechnology
CD31	1/50	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmosferas con tampón de pH bajo comercial de DAKO (citrato pH 6,1)	DAKO ENVISION	SANTA CRUZ Biotechnology

Tabla 2.3 Especificaciones en la técnica inmunohistoquímica utilizada en el estudio

2.2.2 Cuantificación morfométrica

Los estudios cuantitativos morfométricos se llevaron a cabo mediante el análisis de imagen con dos métodos diferentes: la valoración de la MVD con el Image Pro-plus 7.0 (Infaimon, Media Cybernetics) y la de la expresión de los factores participantes en la angiogénesis mediante el Densito-Quant del Panoramic Viewer 1.15.

2.2.2.1 Cuantificación de la Densidad microvascular (MVD)

Para la valoración de la MVD se marcaron las muestras con antiCD-31. A cada muestra se le asignó un número que era desconocido para el evaluador, para eliminar posibles sesgos. Se realizaron los siguientes pasos:

1.- *Selección de imágenes:* la observación y captura de imágenes se realizó con el microscopio Leica DMD-108, eligiendo inicialmente con el objetivo 4x las zonas de tejidos renales normales y/o tumorales según el caso. Con el objetivo 10x se eligieron las áreas “hot spots” y se confirman las relaciones de los vasos con los tejidos y por último a 20x se capturaron las seis áreas más representativas. Se tuvo en cuenta en la selección de la imagen

los llamados “hot spots” en el caso de las muestras tumorales ó una buena organización del tejido y sus vasos para los tejidos sin afectación tumoral.

2.- *Almacenamiento de imágenes pre-medición:* después de capturadas las imágenes se almacenaron en carpetas digitales, numeradas para cada muestra.

3.- *Medición de la MVD. Según el siguiente orden:*

1. Calibración del sistema para objetivo 20X de microscopio Leica DMD-108.
2. Preparación de la imagen extrayendo el canal verde que resalta la superficie inmunomarcada y elimina parte del ruido de fondo.
3. Segmentación. Determinación de umbral previamente decidido para la visualización automática de objetos por el sistema.
4. Erosión o dilatación de acuerdo a la necesidad.
5. Esqueletización de las estructuras a analizar.

Para facilitar el trabajo, todos estos pasos se realizaron de forma automática con órdenes informáticas preparadas y probadas previamente (macro). Después de la aproximación automática se pasaba al manejo manual de la medición. Primero variando el umbral si, de acuerdo a la intensidad de luz de la imagen, era necesario modificar la orden de la segmentación para agregar vasos que no habían sido tomados en la medición automática (fig. 2.6). Después para incluir una por una las estructuras marcadas, que en la comparación simultánea con la imagen original (sin filtro), se consideraban vasos y no habían sido tomadas automáticamente. Por último se eliminaban manualmente las estructuras que habían sido marcadas y que en la misma comparación no se consideraban objetos de medición.

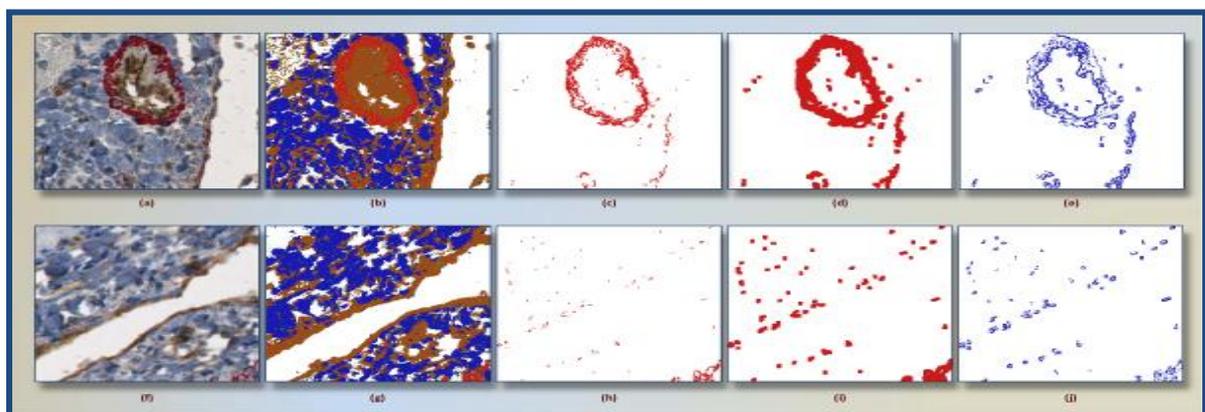


Figura 2.6 Proceso de análisis de imagen.

4.- *Almacenamiento de datos medidos:* este paso se realizó automáticamente exportando los datos obtenidos en la cuantificación con el analizador de imagen a cada hoja de cálculo Excel, incluida en la carpeta digital correspondiente a cada muestra (fig. 2.7). La hoja de cálculo fue previamente preparada para la recepción de los datos medidos y su automática obtención de promedios. En cada caso se midieron el área y el diámetro de los vasos, según los siguientes criterios: capilares (7,3 a 15 μm), vasos medianos (16 a 50 μm) y vasos grandes (51 a 200 μm) de diámetro respectivamente. Todos en un rango de área de 0 a 600 μm^2 .

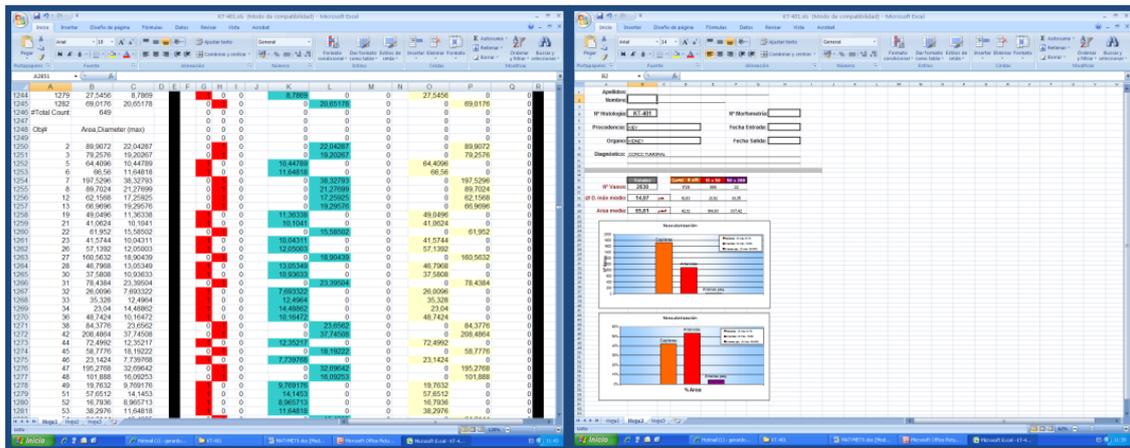


Figura 2.7 Hoja de cálculo 1 y 2 de datos de MVD

5.- *Almacenamiento de imágenes post-medición:* en todos los casos, para tener evidencia de los vasos medidos y facilitando la comprobación del proceso, se imprimió la pantalla en una diapositiva de un documento en power point (fig. 2.8).

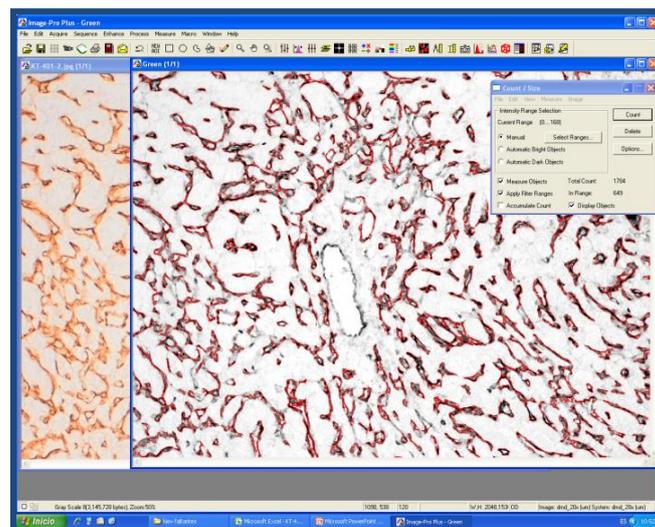


Figura 2.8 Comprobación de medición de MVD con datos adjuntos

2.2.2.2 Cuantificación de la expresión de factores angiogénicos.

1.- *Captura de la imagen:* se escanearon todas las imágenes de las matrices (TMA) que habían sido previamente inmunomarcadas para ocho participantes reconocidos en la angiogénesis (factores, receptores y moléculas de adhesión). Para este paso se usó el Scan Panoramic (fig. 2.9) de la Fundación Oftalmológica del Mediterráneo (FOM).

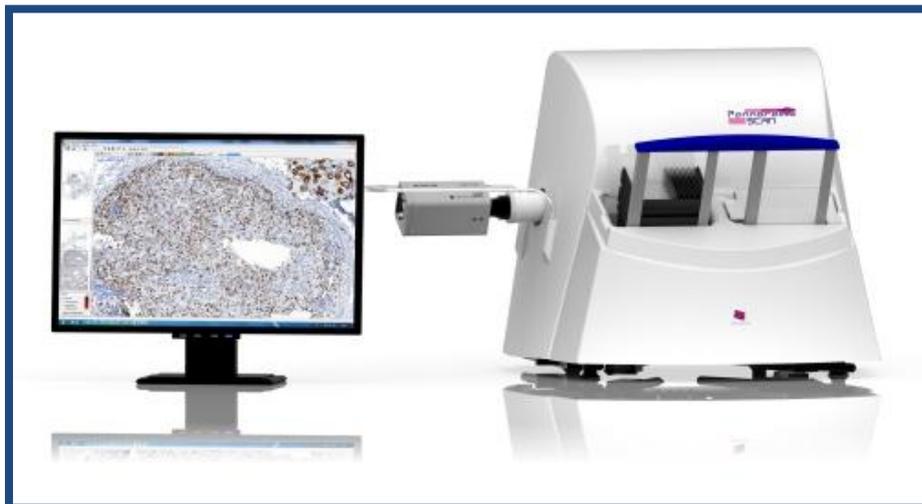


Figura 2.9 The Panoramic SCAN. Slide scanner of 3DHISTECH

2.- *Almacenamiento de imágenes pre-medición:* posterior a una previa organización e identificación de los TMA, se realizó el almacenamiento de las imágenes revisándolas y marcando en un recuadro el número al que correspondían en la base de datos (fig. 2.10). Esto fue posible con el software Panoramic Viewer 1.15. Después de capturadas las imágenes, éstas se almacenaron en carpetas digitales por factor a estudiar.

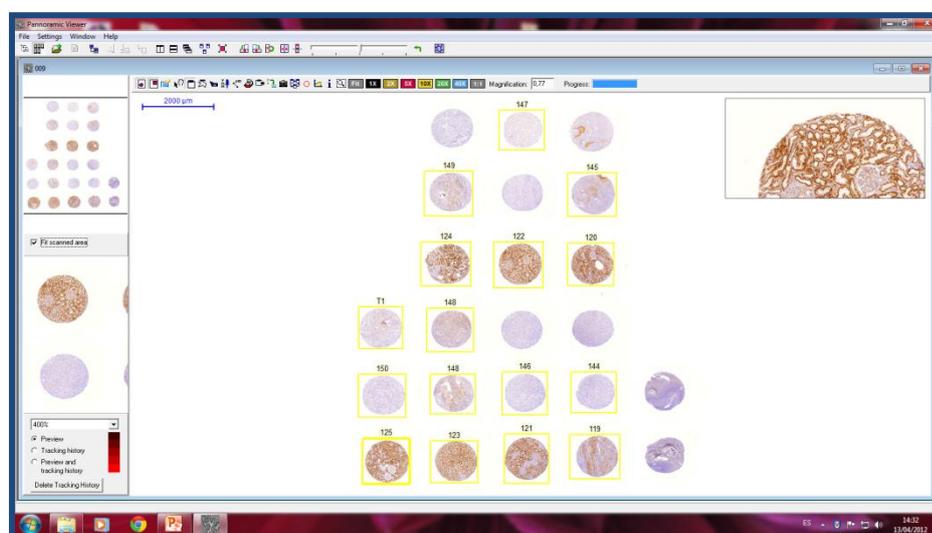


Figura 2.10 Muestras a medir del TMA (recuadros)

3.-Medición de la expresión de factores:

1. Calibración previa del patrón de medición. Se establecieron entre los evaluadores los criterios de valoración de la intensidad de tinción, obteniendo como resultado dos patrones de medición automática personalizada (fig. 2.11):

- Densito-Quant cero: usado para muestras tumorales.
- Densito-Quant uno: utilizado para muestras no tumorales.

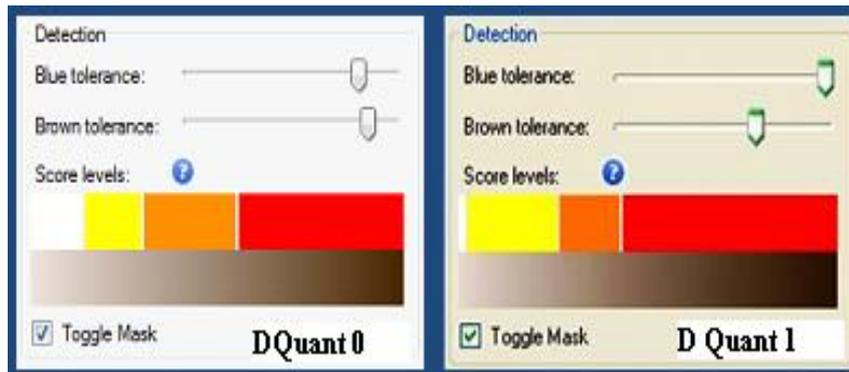


Figura 2.11 Modificación de patrones de visualización

2. Activación del software Densito-Quant. Previa elección e identificación de las partes a revisar de la preparación TMA, se activa el patrón escogido para la medición de cada TMA (fig. 2.12).

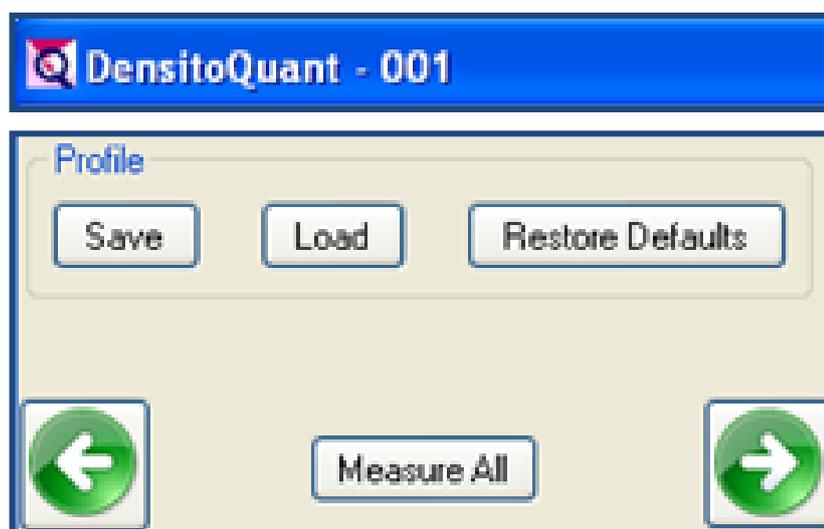


Figura 2.12 Activación de la medición

3. Revisión de resultados. Después de que se muestran los resultados automáticamente (fig. 2.13), se revisan uno a uno, comparándolos con la imagen original Toggle Mask.

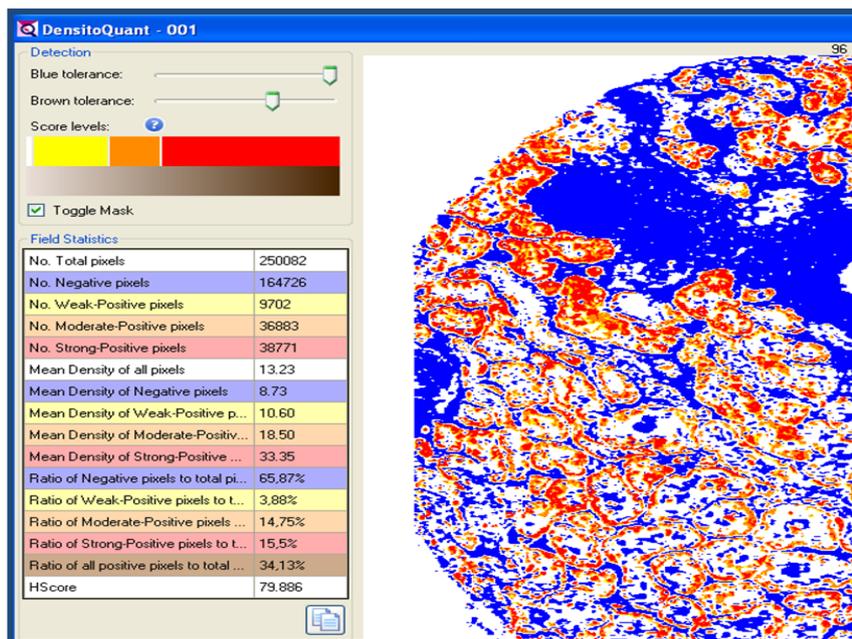


Figura 2.13 Resultado de aplicación del patrón Densito-Quant 001

4. Registro de resultados. Los datos obtenidos se transfieren a la primera hoja de cálculo del archivo de Excel (fig. 2.14), donde registramos los siguientes datos:

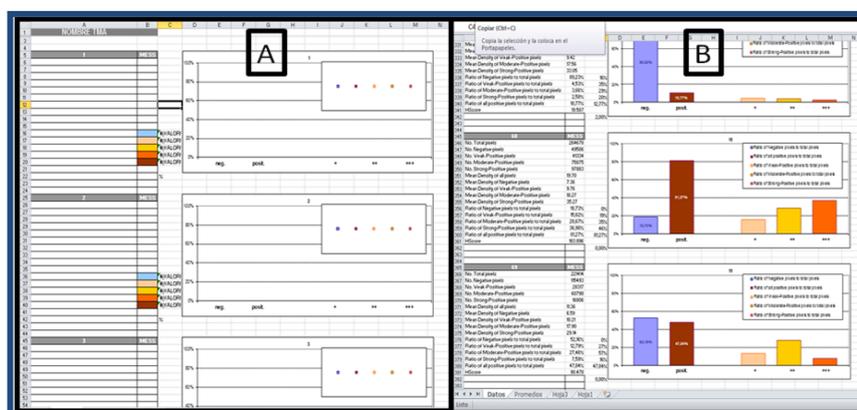


Figura 2.14 Registro de datos. A.-Hoja1. Datos de cada muestra (vacía);B.- Hoja 1. Datos cumplimentados por muestra

- Tanto para los tejidos renales normales como para los peritumorales, el **100%** del marcaje celular o total es el porcentaje total de píxeles marcados por el analizador de imagen como positivos Ratio of all positive pixels to total... 34.13%, a esta medición se le añadió el porcentaje de células no teñidas como porcentaje de negativos (de obtención manual).
- El porcentaje de inmunomarcaje positivo (+++) ó fuertemente positivo es el porcentaje de píxeles fuertemente positivos Ratio of Strong-Positive pixels to t... 15.5%, proporcional al 100% de inmunomarcaje celular total.

- El porcentaje de inmunomarcaje positivo (++) ó moderadamente positivo es el porcentaje de pixeles moderadamente positivos Ratio of Moderate-Positive pixels... 14,75%, proporcional al 100% de inmunomarcaje celular total.
- El porcentaje de inmunomarcaje positivo (+) ó débilmente positivo es el porcentaje de pixeles débilmente positivos Ratio of Weak-Positive pixels to t... 3,88%, proporcional al 100% de inmunomarcaje celular total.
- El porcentaje de inmunomarcaje celular (-) ó 0 ó sin tinción se obtuvo manualmente del porcentaje de células que no se tiñen Ratio of Negative pixels to total pi... 65,87% al observar la preparación a un objetivo mayor (fig.2.15).

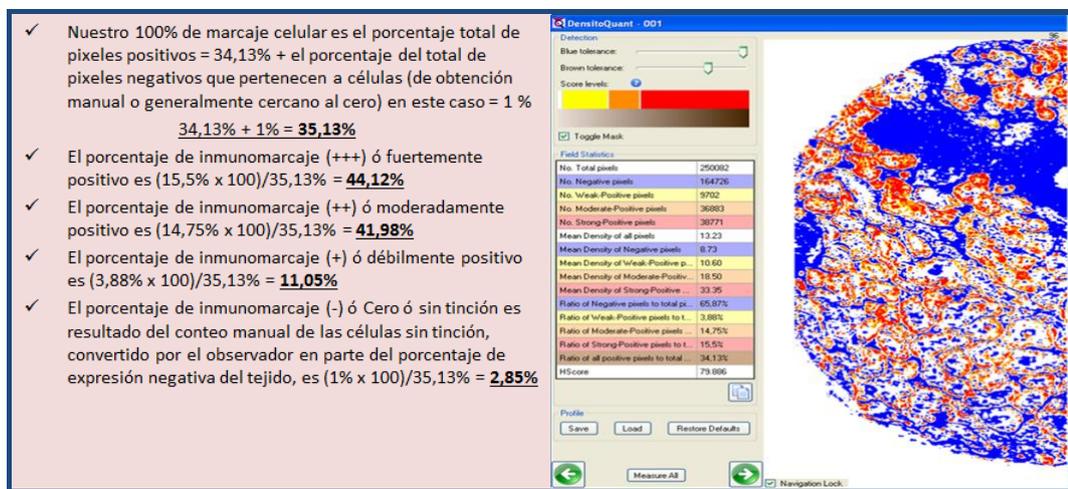


Figura 2.15 Ejemplo de un caso de tejido peritumoral

- Para los tejidos tumorales, cuya masa de células ocupa la mayoría de la imagen, se tomaron todos los resultados automáticos del software, incluyendo el porcentaje de negativos Ratio of Negative pixels to total pi... (fig. 2.16).

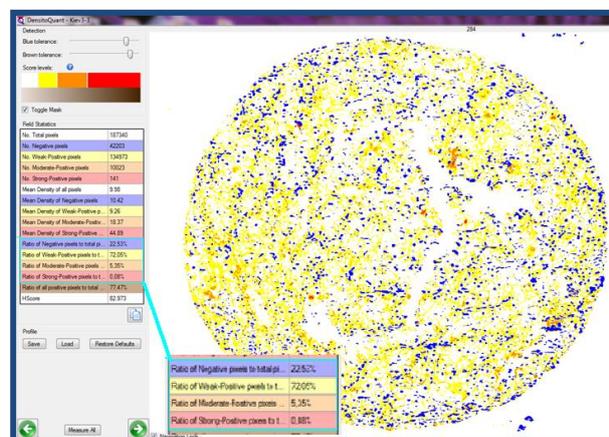


Figura 2.16 Ejemplo de un caso de tejido tumoral

- Por último, se determina el tipo de marcaje celular, que podía ser citoplasmático, nuclear, o superficial (fig. 2.18).

4.- Almacenamiento de datos medidos en hoja de cálculo Excel: Posterior al traslado de los resultados al Excel, son promediados en su segunda hoja. Los promedios se hacen para cada factor expresado, por cada grupo estudiado. En una segunda hoja de dicho archivo (fig. 2.17), adicional a la medición automática, se colocan los resultados de la valoración manual de criterios específicos (fig. 2.18).

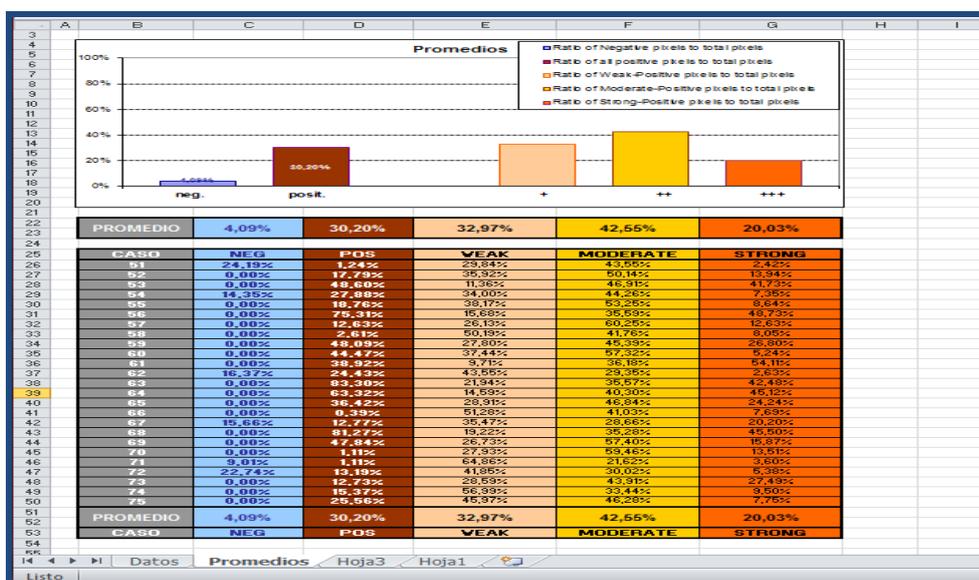


Figura 2.17 Hoja 2. Promedios de datos del TMA grupo

N°	TUB NUCLEAR	TUB CITOP	TUB SUPERF	ENDOT	OBSERVACIONES	PEC FGF
CASO	% #	% #	% #	% #	DETALLE	
1.	0 100	0 0	0 0	1 1	FUERTE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HOMOGENEO DE TCP Y HETEROGENEO DEL RESTO DE TUBULOS	1
2.	0 100	0 0	0 0	1 1	LEVE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HETEROGENEO MAS INTENSO EN T.C.D.	4
3.	0 100	0 0	0 0	1 1	LEVE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HETEROGENEO MAS INTENSO EN T.C.D.	4
4.	0 100	0 0	0 0	1 1	LEVE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HETEROGENEO MAS INTENSO EN T.C.D.	4
5.	0 100	0 0	0 0	1 1	FUERTE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HOMOGENEO DE TCP Y HETEROGENEO DEL RESTO DE TUBULOS	1
6.	0 100	0 0	0 0	1 1	FUERTE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HOMOGENEO DE TCP Y HETEROGENEO DEL RESTO DE TUBULOS	1
7.	0 100	0 0	0 0	1 1	TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HETEROGENEO TODOS LOS TUBOS	4
8.	0 100	0 0	0 0	1 1	TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HETEROGENEO TODOS LOS TUBOS	4
9.	0 100	0 0	0 0	1 1	FUERTE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HOMOGENEO DE TCP Y HETEROGENEO DEL RESTO DE TUBULOS	1
10.	0 100	0 0	0 0	1 1	FUERTE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HOMOGENEO DE TCP Y HETEROGENEO DEL RESTO DE TUBULOS	1
11.	0 100	0 0	0 0	1 1	FUERTE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HOMOGENEO DE TCP Y HETEROGENEO DEL RESTO DE TUBULOS	1
12.	0 100	0 0	0 0	1 1	FUERTE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HOMOGENEO DE TCP Y HETEROGENEO DEL RESTO DE TUBULOS	1
13.	0 100	0 0	0 0	1 1	FUERTE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HOMOGENEO DE TCP Y HETEROGENEO DEL RESTO DE TUBULOS	1
14.	0 100	0 0	0 0	1 1	FUERTE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HOMOGENEO DE TCP Y HETEROGENEO DEL RESTO DE TUBULOS	1
15.	0 100	0 0	0 0	1 1	FUERTE TOTK.ITOPLASMATICO GRANULAR HOMOGENEO DE TCP Y HETEROGENEO DEL RESTO DE TUBULOS	1

Figura 2.18 Hoja 3. Totales de casos por factor estudiado

5.- Almacenamiento de imágenes post-medición: en todos los casos, para tener evidencia de la medición de la expresión y facilitando la comprobación del proceso, se imprimió la pantalla en una diapositiva de un documento en power-point (fig. 2.19).

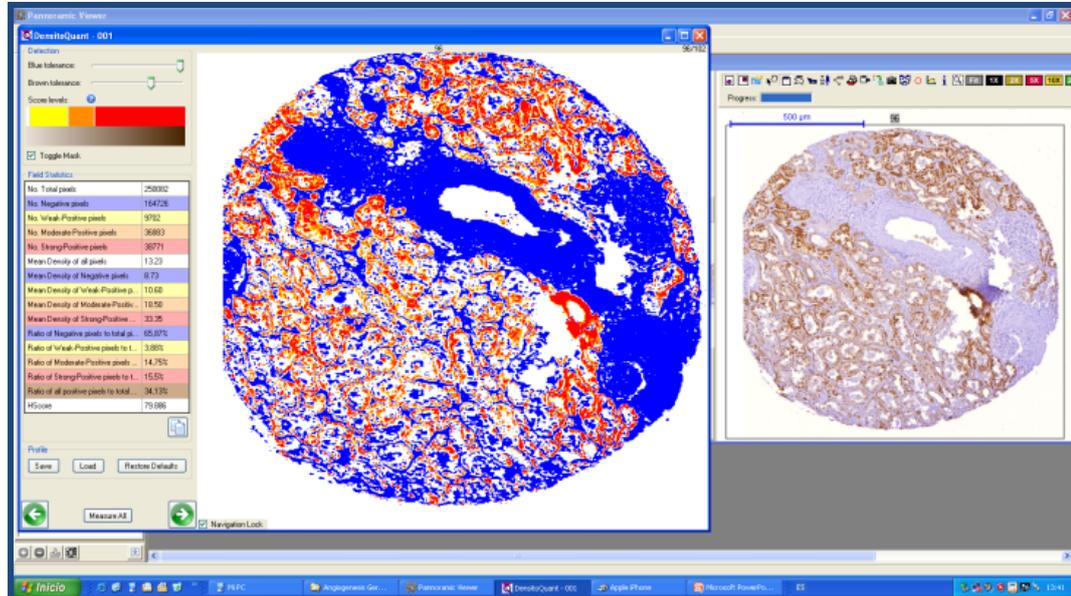


Figura 2.19 Comprobación de medición de expresión de factores con datos adjuntos

2.3 Análisis estadístico

Todas las herramientas estadísticas empleadas en nuestro análisis de resultados se encuentran implementadas en el software informático SPSS para Windows versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Las tablas de frecuencia y las comparaciones entre la expresión IQH de los diferentes factores empleados en los diferentes tipos de muestras del estudio fueron realizadas utilizando el test del Chi-Cuadrado de Pearson (prueba de asociación o dependencia entre dos variables categóricas). Mientras la comparación entre las medias de las variables de interés, con el objetivo de evaluar la significación estadística entre sus valores se realizó por el test de ANOVA o de análisis de varianzas.

En el nivel de significatividad en todos los análisis ha sido el habitual del 5 % ($\alpha=0.05$). Cualquier valor de probabilidad inferior a $\alpha=0.05$ es indicativo de una relación estadísticamente significativa, muy significativa $\alpha < 0.01$ y altamente significativo $\alpha < 0.005$; contrariamente no es significativa una α superior a 0.05.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados

Hemos analizado 124 casos de ccRCC, 25 procedentes de Ucrania zona limpia, 50 de Ucrania zona contaminada, 25 de España y 24 de Colombia, también hemos estudiado 50 casos de tejido renal normal, 25 procedentes de España y 25 de Colombia. En total se analizaron 298 muestras, correspondientes a 124 tumorales, sus 124 peritumorales y 50 de riñones normales.

3.1.1 Caracterización general de la población del estudio

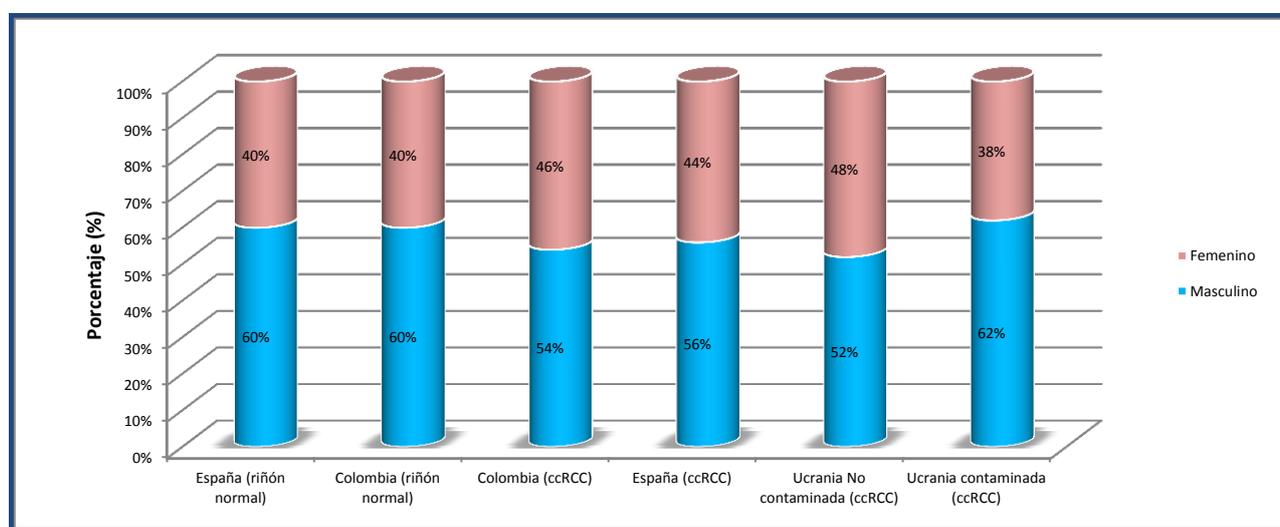
Entre los 174 casos estudiados, 73 (42%) fueron mujeres, 101 (58%) fueron varones, distribuyéndose del siguiente modo: en el grupo de muestras de tejido renal normal de España y Colombia, 10 fueron mujeres y 15 hombres; en el grupo de ccRCC de la zona limpia de Ucrania 12 fueron mujeres y 13 hombres; en el grupo de España, 11 fueron mujeres y 14 hombres; en el grupo de Colombia, 11 fueron mujeres y 13 hombres; y en el grupo de la zona contaminada de Ucrania, 19 fueron mujeres y 31 hombres (tabla 3.1).

Grupo	Masculino	Femenino	Total
España (grupo control)	15 (60%)	10 (40%)	25 (100%)
Colombia (grupo control)	15 (60%)	10 (40%)	25 (100%)
Colombia (ccRCC)	13 (54%)	11 (46%)	24 (100%)
España (ccRCC)	14 (56%)	11 (44%)	25 (100%)
Ucrania No contaminada (ccRCC)	13 (52%)	12 (48%)	25 (100%)
Ucrania contaminada (ccRCC)	31 (62%)	19 (38%)	50 (100%)
Población de Estudio	101 (58%)	74 (42%)	175 (100%)

Tabla 3.1 Distribución por género de la población de estudio

La distribución por género en cada uno de los 6 grupos de estudio fue similar a la observada en la población total del estudio (gráfica 3.1). Observamos una proporción de género (hombre/mujer) de 1,4:1 para la población del estudio; mientras las proporciones más alejadas se observaron en el grupo

con ccRCC de la zona contaminada de Ucrania con 1,7:1 (máxima) y en los ccRCC procedentes de la región no contaminada de Ucrania con proporción de 1,1:1(mínima).



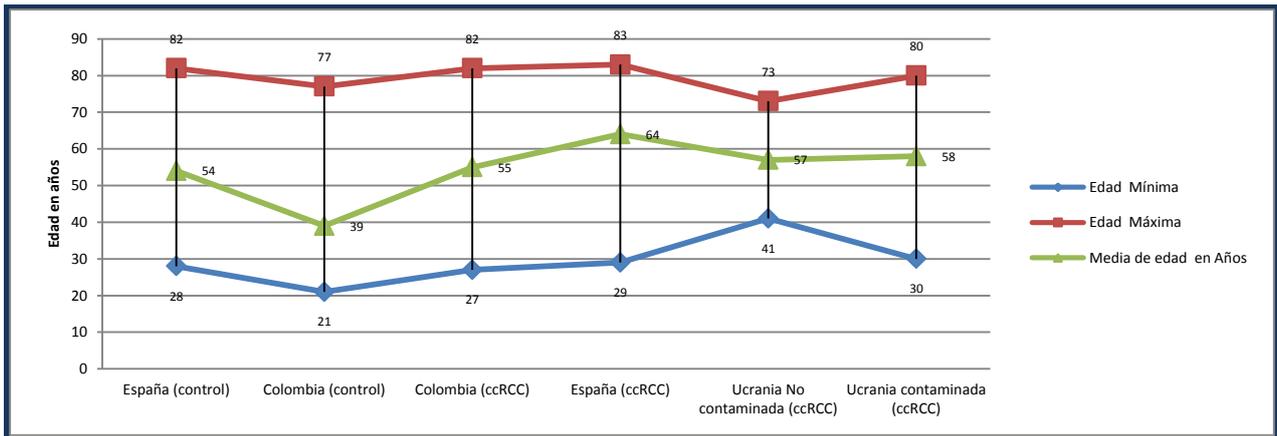
Gráfica 3.1 Distribución porcentual de casos por género en los grupos de estudio

El promedio de edad para la población total del estudio fue de 55,2 años, en un rango entre 21 y 83 años. La edad promedio observada en los grupos españoles, control y con ccRCC fue de 54 años (28>-<82) y 64 años (29>-<83) respectivamente. Para los grupos de Colombia, control y con ccRCC fue de 39 años (21>-<77) y 55 años (27>-<82) respectivamente. Para los casos procedentes de Ucrania zona limpia y zona contaminada fue de 57 años (41>-<73) y 58 años (30>-<80) respectivamente (tabla 3.2 y gráfica 3.2).

Grupo	Edad Mínima	Edad Máxima	Media de edad en Años
España (control)	28	82	54
Colombia (control)	21	77	39
Colombia (ccRCC)	27	82	55
España (ccRCC)	29	83	64
Ucrania No contaminada (ccRCC)	41	73	57
Ucrania contaminada (ccRCC)	30	80	58

Tabla 3.2 Distribución por edad de la población de estudio

La media de edad más baja se observó en el grupo de muestras control procedente de Colombia con 39,4 años y la media de edad máxima se obtuvo en el grupo de muestras de ccRCC procedentes de España con 64,5 años. No se observó diferencia importante en la media de edad de los grupos con ccRCC que fueron estudiados, donde el promedio fue de 58 años (grafica 3.2).



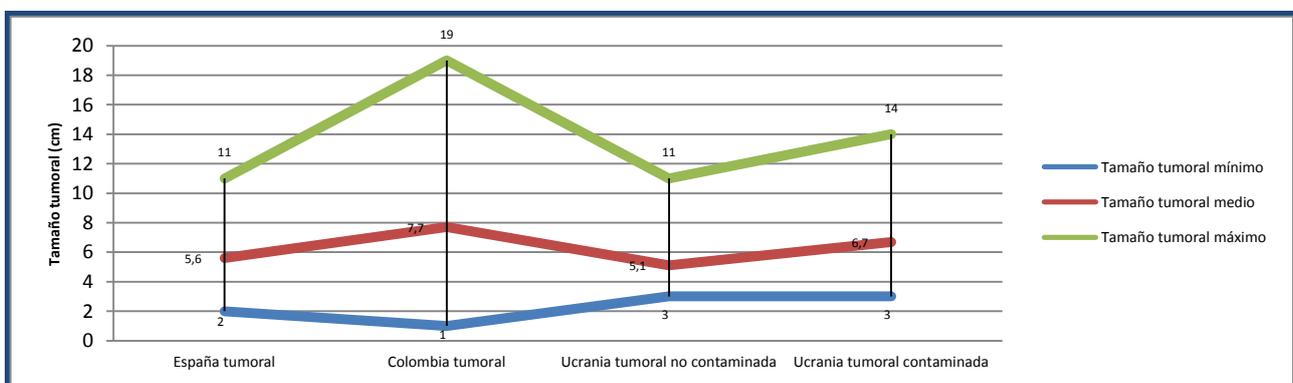
Gráfica 3.2 Rangos de edad por grupo

La media del tamaño tumoral para la población total del estudio fue de 6,4 cm, en un rango entre 1cm y 19 cm (1>-<19). El tamaño tumoral medio observado en el grupo español fue de 5.6 cm (2>-<11); en los casos de Colombia fue de 7,6 cm (1>-<19); en los casos de Ucrania zona limpia y zona contaminada fue de 5.1cm (3>-<11) y 6.7 cm (3>-<14) respectivamente (tabla 3.3 y gráfica 3.3).

Grupo	Tamaño mínimo	Tamaño tumoral medio	Tamaño máximo
España tumoral	2	5,6	11
Colombia tumoral	1	7,7	19
Ucrania tumoral no contaminada	3	5,1	11
Ucrania tumoral contaminada	3	6,7	14
Población total del estudio	1	6,4	19

Tabla 3.3 Rango y media de tamaño tumoral en los grupos de estudio

La media del tamaño tumoral fue de 6,4 cm de diámetro mayor, observándose mayor promedio en el grupo de Colombia con 7,6 cm y el menor en el grupo de la zona no contaminada de Ucrania con 5,1 cm de diámetro, resultando para el análisis de varianza ANOVA una diferencia estadísticamente significativa por grupo con $\alpha=0,01$ (gráfica 3.3).



Gráfica 3.3 Rango y media de tamaño tumoral por grupo

Con relación a la clasificación de Fuhrman en la población de estudio los resultados fueron (tabla 3.4):

Nivel 1: 29 casos (23,4%); 7 procedentes de España, 8 de Colombia, 9 de la zona limpia de Ucrania y 5 de la zona contaminada de Ucrania.

Nivel 2: 37 casos (29,8%), 9 procedentes de España, 10 de Colombia, 2 de la zona limpia de Ucrania y 16 de la zona contaminada de Ucrania.

Nivel 3: 34 casos (27,4%), 7 procedentes de España, 3 de Colombia, 7 de la zona limpia de Ucrania y 17 de la zona contaminada de Ucrania.

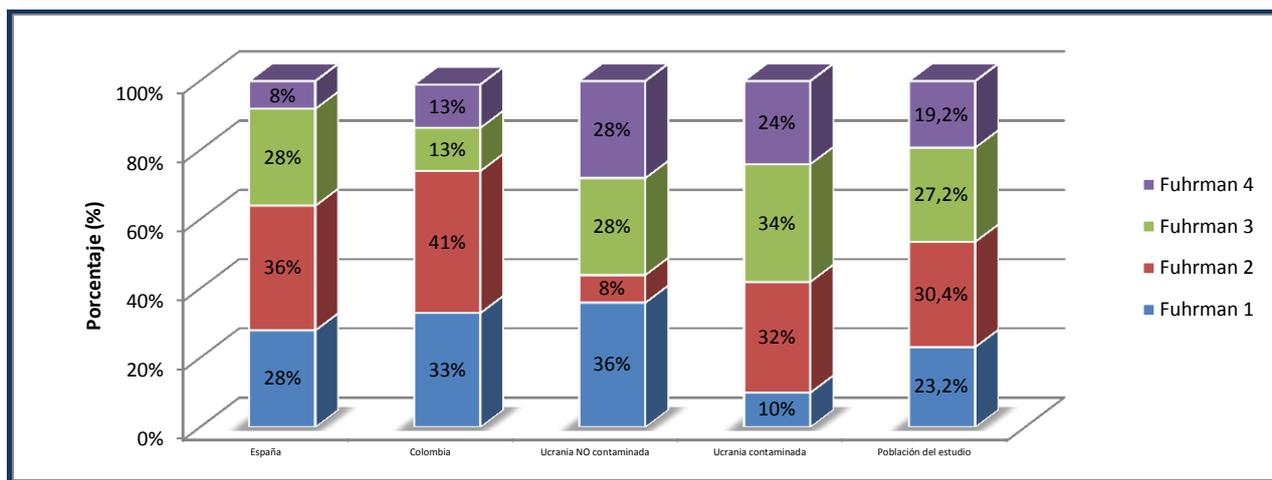
Nivel 4: 24 casos (19,4%), 2 procedentes de España, 3 de Colombia, 7 de la zona limpia de Ucrania y 12 de la zona contaminada de Ucrania.

Nivel grado nuclear de Fuhrman	España tumoral Casos (%)	Colombia tumoral Casos (%)	Ucrania NO contaminada tumoral Casos (%)	Ucrania contaminada tumoral Casos (%)	Población del estudio Casos (%)
1	7 (28%)	8 (33%)	9 (36%)	5 (10%)	29 (23,4%)
2	9 (36%)	10 (42%)	2 (8%)	16 (32%)	37 (29,8%)
3	7 (28%)	3 (12,5%)	7 (28%)	17 (34%)	34 (27,4%)
4	2 (8%)	3 (12,5%)	7 (28%)	12 (24%)	24 (19,4%)
Total	25 (100%)	24 (100%)	25 (100%)	50 (100%)	124 (100%)

Tabla 3.4 Distribución de grado nuclear de Fuhrman por grupo de estudio

En la población total de estudio se observó una distribución porcentual muy homogénea de los casos clasificados de acuerdo con la graduación nuclear de Fuhrman. El 30% de los casos fueron clasificados como grado dos y el 19% como grado cuatro, convirtiéndose estos en los porcentajes máximo y mínimo en esta distribución de casos de la población total del estudio (gráfica 3.4).

El 64% y 76% de casos de ccRCC procedentes de España y Colombia, respectivamente fueron clasificados en el grado uno y dos de Fuhrman; esta tendencia es diferente al porcentaje de casos observado, para los mismos grados, en los grupos de Ucrania, donde solo aparecen el 44% y 42% de los casos, diferencia estadísticamente significativa con un $\alpha=0.00$. El grupo ucraniano de la zona contaminada mostró el mayor porcentaje de casos, un 34%, clasificados como grado nuclear tres, mientras que en el grupo Ucraniano de la zona considerada limpia se observó el mayor porcentaje de casos, un 28%, clasificados en el grado nuclear cuatro (gráfica 3.4). Esta diferencia entre los grupos de Ucrania no resultó estadísticamente significativa.



Gráfica 3.4 Distribución porcentual del grado nuclear de Fuhrman por grupo.

En la clasificación del Estadio tumoral TNM los resultados fueron (tabla 3.5):

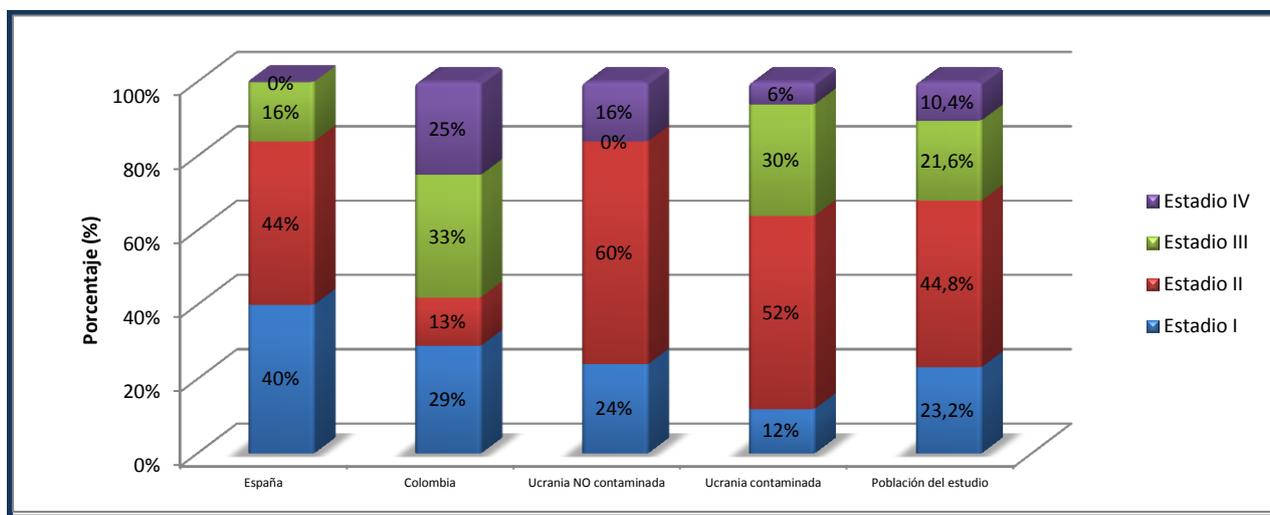
- Estadio I: 29 casos (23,4%), 10 procedentes de España, 7 de Colombia, 6 de la zona limpia de Ucrania y 6 de la zona contaminada de Ucrania.
- Estadio II: 55 casos (44,4%), 11 procedentes de España, 3 de Colombia, 15 de la zona limpia de Ucrania y 26 de la zona contaminada de Ucrania.
- Estadio III: 27 casos (21,8%), 4 procedentes de España, 8 de Colombia, 0 de la zona limpia de Ucrania y 15 de la zona contaminada de Ucrania.
- Estadio IV: 13 casos (10,4%), 0 procedentes de España, 6 de Colombia, 4 de la zona limpia de Ucrania y 3 de la zona contaminada de Ucrania.

Estadio TNM	España tumoral	Colombia tumoral	Ucrania NO contaminada tumoral	Ucrania contaminada tumoral	Población del estudio
I	10 (40%)	7 (29.2%)	6 (24%)	6 (12%)	29 (23,4%)
II	11 (44%)	3 (12.5%)	15 (60%)	26 (52%)	55 (44,4%)
III	4 (16%)	8 (33%)	0 (0%)	15 (30%)	27 (21,8%)
IV	0 (0%)	6 (25%)	4 (16%)	3 (6%)	13 (10,4%)
Total	25 (100%)	24 (100%)	25 (100%)	50 (100%)	124 (100%)

Tabla 3.5 Distribución de estadio TNM por grupo de estudio

En la distribución de casos de acuerdo a su estadio TNM, se observó un 44% de casos clasificados en el estadio II, resultando el doble del porcentaje de casos que fueron clasificados en los estadios I (23,2%) y III (21,6%). El menor porcentaje de casos se encontró en el estadio IV con un (10,4%), que correspondió a menos de la mitad de los casos encontrados en los estadios I y III del estudio. De ese pequeño porcentaje de casos (10,4%), el 50% de los casos provenían de Colombia; mientras que

del 44% clasificado como estadio II, el 70% de esos casos procedían de los dos grupos ucranianos (gráfica 3.5).



Gráfica 3.5 Distribución porcentual del estadio TNM por grupo

3.1.2 Mecanismos de angiogénesis

Hemos obtenido resultados para los mecanismos de angiogénesis a dos niveles: la cuantificación de la MVD y la cuantificación de la expresión de los factores relacionados con la angiogénesis

3.1.2.1 Cuantificación de MVD

En el grupo de riñones normales de España, hemos obtenido un promedio del total de vasos de 458 vasos/mm², con un rango de 381, entre un mínimo de 298 y un máximo de 679. En el grupo control de Colombia obtuvimos una media del total de vasos de 545 vasos/mm², con un rango de 330, entre un mínimo de 381 y un máximo de 711.

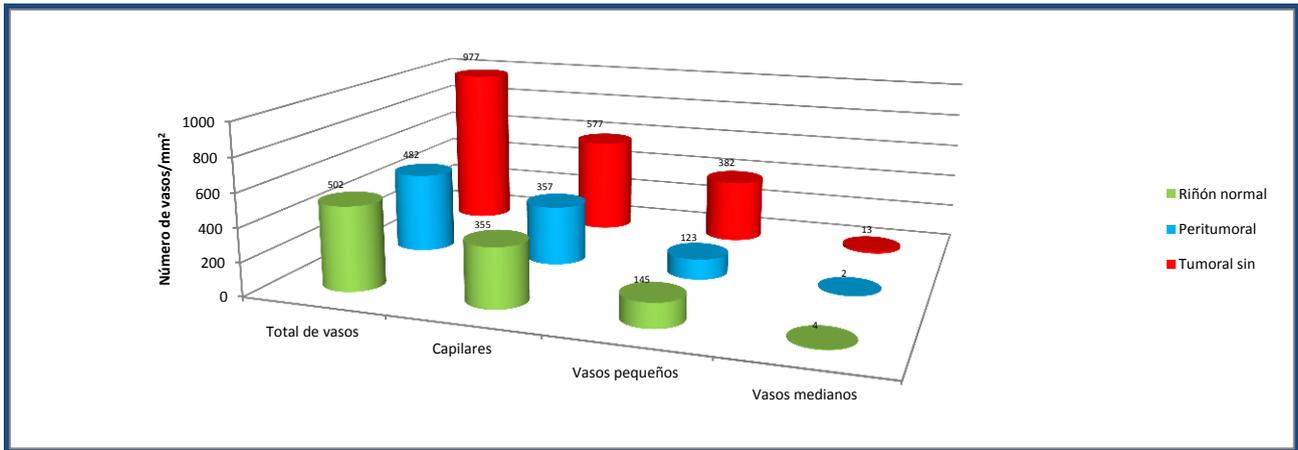
En los grupos de muestras de zona peritumoral de ccRCC obtuvimos en el grupo procedente de España, una media del total de vasos de 451 vasos/mm², con un rango de 502 vasos, entre un mínimo de 206 y un máximo de 708. En el grupo de Colombia se obtuvo una media del total de vasos de 441 vasos/mm², con un rango de 380, entre un mínimo de 283 y un máximo de 663. En el grupo de la zona limpia de Ucrania se observó una media del total de vasos de 508 vasos/mm², con un rango de 723 vasos, entre un mínimo de 133 y un máximo de 856. En el grupo de la zona contaminada de Ucrania se obtuvo una media del total de vasos de 528 vasos/mm², con un rango de 766, entre un mínimo de 161 y un máximo de 927 (tabla 3.6).

En los grupos de muestras con ccRCC observamos en el grupo procedente de España, una media del total de vasos de 855 vasos/mm², con un rango de 754, entre un mínimo de 571 y un máximo de 1325. En el grupo de Colombia se obtuvo una media del total de vasos de 776 vasos/mm², con un rango de 1319, entre un mínimo de 287 y un máximo de 1606. En el grupo de la zona limpia de Ucrania se observó una media del total de vasos de 1058 vasos/mm², con un rango de 1474, entre un mínimo de 551 y un máximo de 2025. En el grupo de la zona contaminada de Ucrania se obtuvo una media del total de vasos de 1217 vasos/mm², con un rango de 2510, entre un mínimo de 620 y un máximo de 2178 (tabla 3.6).

Grupo	Media del Total de vasos/mm ²	Máximo/mm ²	Media de Capilares/mm ² (%)	Máximo/mm ²	Media de Vasos pequeños/mm ² (%)	Media de Vasos medianos/mm ² (%)	Media de área vasos totales μ ²	Media de diámetro de vasos totales μ
		Mínimo/mm ²		Mínimo/mm ²				
España riñón normal	458	679	302 (66%)	411	153 (33%)	3 (1%)	58,49	14,61
		298		230				
Colombia riñón normal	545	711	407 (75%)	528	136 (25%)	4 (2%)	49,28	13,20
		381		245				
Total riñón normal	502		355		145	4	53,88	13,90
España peritumoral	451	708	347 (77%)	608	104 (23%)	0 (0%)	40,23	12,52
		206		181				
Colombia peritumoral	441	663	328 (74%)	498	111 (25%)	2 (1%)	47,86	13,37
		283		198				
Ucrania NO contaminada peritumoral	508	856	375 (74%)	585	130 (26%)	3 (0%)	44,39	13,22
		133		127				
Ucrania Contaminada peritumoral	528	927	378 (72%)	737	147 (28%)	3 (0%)	49,61	13,70
		161		112				
Total peritumoral	482		357		123	2	46,34	13,30
España tumoral	855	1325	517 (60%)	855	325 (38%)	13 (2%)	72,61	16,54
		571		326				
Colombia tumoral	776	1606	407 (53%)	902	346 (44%)	22 (3%)	87,37	18,47
		287		125				
Ucrania NO contaminada tumoral	1058	2025	633 (60%)	1083	408 (38%)	17 (2%)	66,74	16,60
		551		276				
Ucrania Contaminada tumoral	1217	2178	754 (62%)	1549	448 (37%)	15 (1%)	67,05	16,12
		620		242				
Total tumoral	977		577		382	13	72,16	16,77

Tabla 3.6 Cuantificación de vasos MVD por grupo de estudio

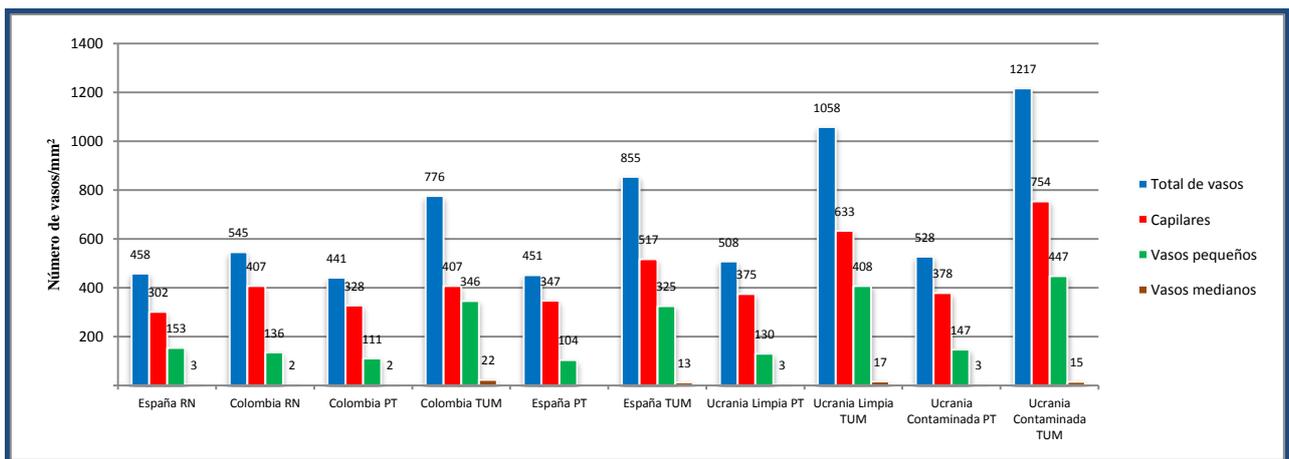
Encontramos un incremento significativo de la media de la MVD total de vasos en los muestras tumorales, en comparación con la obtenida tanto de las muestras peritumorales, como de los grupos controles de riñones normales (gráfica 3.6). Esta diferencia se hizo estadísticamente muy significativa en los casos de ccRCC provenientes de Ucrania especialmente de la zona contaminada 0. No observamos diferencias significativas entre las MVD de las muestras del grupo Español y las del grupo colombiano con la prueba de Chi-cuadrado de Pearson con un $\alpha=0,462$, tanto en riñones normales, muestras peritumorales como muestras tumorales de ccRCC (tabla 3.6 y gráfica 3.7).



Gráfica 3.6 Distribución de MVD por tipos de muestra

La mayor diferencia en el incremento de la MVD, la encontramos a nivel de los capilares de los grupos tumorales ucranianos. La diferencia que se observó entre la media, tanto del total de vasos como de capilares, entre el grupo tumoral de Ucrania de la zona contaminada con respecto a los grupos homólogos de España y Colombia, fue estadísticamente muy significativa (Test de ANOVA) $\alpha=0.00$. Esta diferencia también se observó entre los dos grupos Ucranianos (zona limpia y zona contaminada) $\alpha=0.00$ (gráfica 3.7).

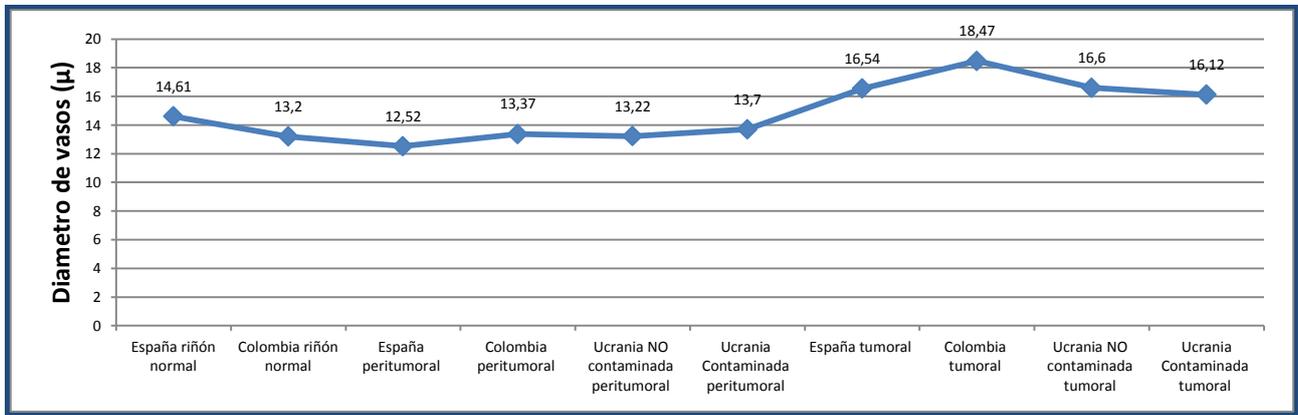
En el grupo peritumoral encontramos diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.022$) cuando comparamos la media de los vasos, pero no hubo diferencias significativas cuando comparamos solo los capilares $\alpha=0.111$.



Gráfica 3.7 Distribución de la MVD de los diferentes tipos de vasos por grupo de estudio

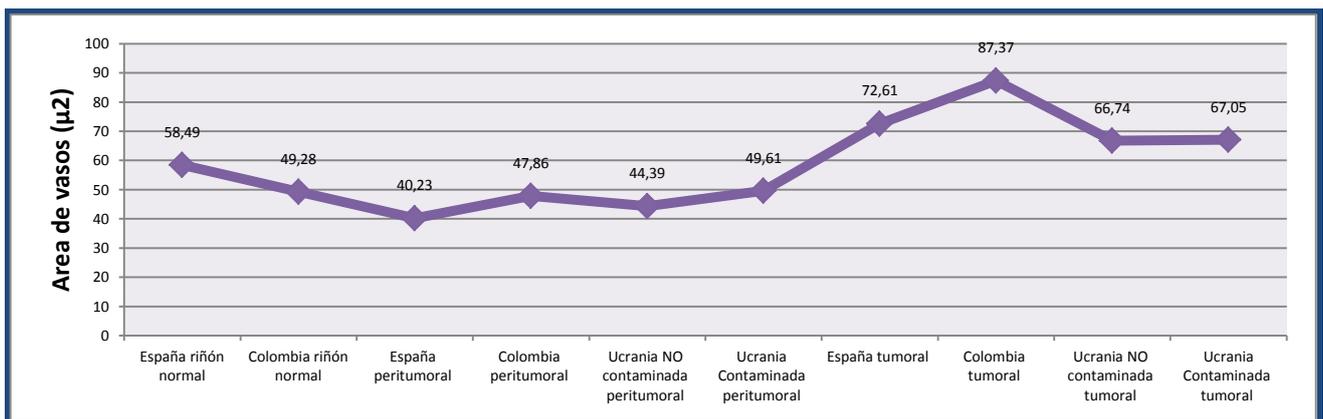
El diámetro medio de todos los vasos fue de 14,87 μm . Las medias grupales para el diámetro de los vasos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. En las muestras de riñón

normal osciló entre 13,2 μm y 14,6 μm , mientras que en las muestras peritumorales disminuyó ligeramente, manteniéndose en el intervalo entre 12,52 μm y 13,75 μm . En el grupo de las muestras con ccRCC ó tumorales se incrementó el intervalo a 16,24 μm y 18,47 μm , mostrándose por encima del promedio general citado (gráfica 3.8).



Gráfica 3.8 Media de diámetro de vasos totales por grupo de estudio

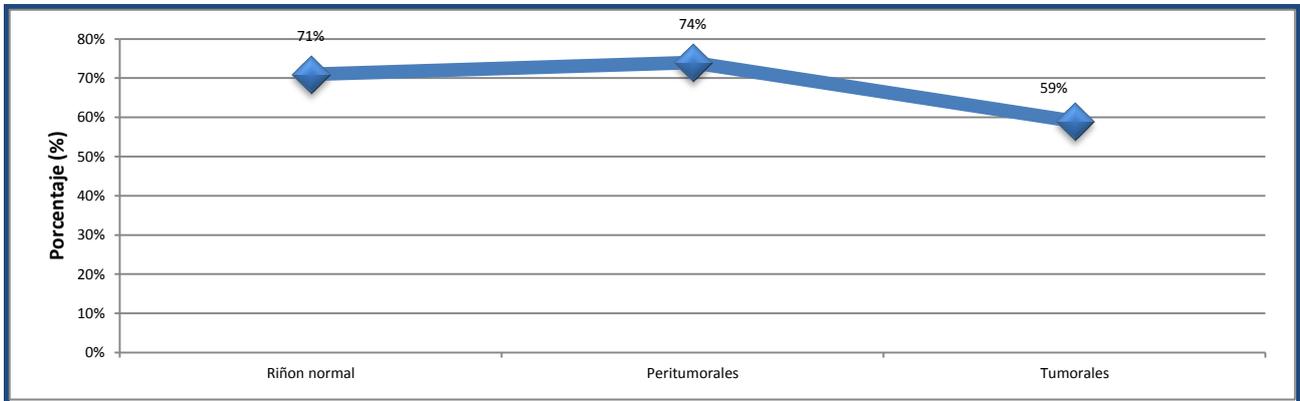
El área media del total de vasos de la población de estudio fue de 58,38 μm^2 . Se evidenció una diferencia entre el área media de los grupos de Ucrania, en comparación con los grupos procedentes de España y Colombia con ccRCC. Mientras que los casos de Ucrania de ambas zonas resultaron con medias de área de vasos totales de 66 μm^2 , la media de área de los casos de ccRCC de España y Colombia fue de 72,6 μm^2 y 87,3 μm^2 respectivamente (gráfica 3.9).



Gráfica 3.9 Media de diámetro de vasos totales por grupo de estudio

En los dos grupos con tejido renal normal, España y Colombia, el porcentaje de capilares sobre el total de vasos fue de 65 y 75% respectivamente, con una media para muestras renales normales de 71%. En los diferentes grupos de muestras peritumorales estuvo entre un 71 a 77% de capilares, con

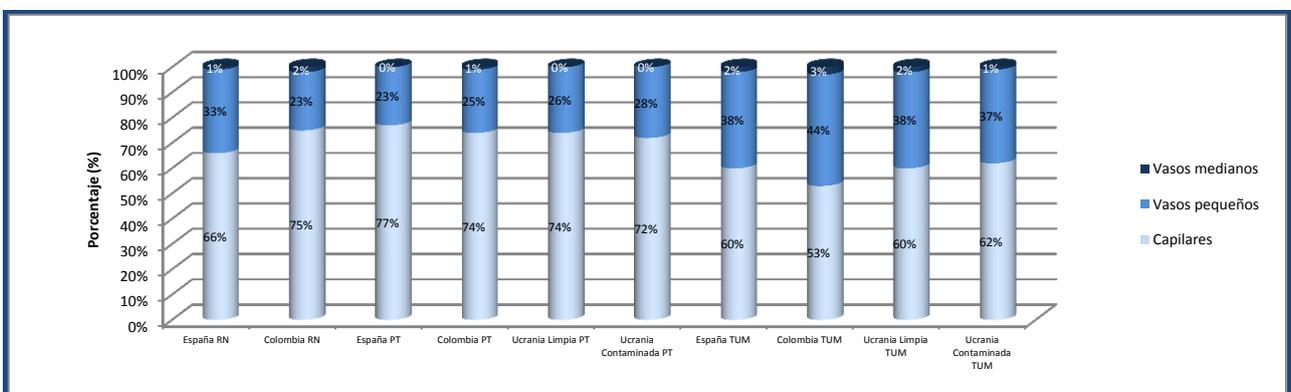
una media de 74%. En los grupos tumorales fue muy similar entre ellos, en un intervalo entre 53 a 61%, con una media de 59% (tabla 3.6).



Gráfica 3.10 Medias de porcentaje de capilares por tipo de muestra.

Hemos encontrado que el porcentaje de capilares fue de un 12 a 15 % menos en el grupo de muestras tumorales (de todas las procedencias) que en el grupo no tumoral, siendo esta diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0,005$ revisado con el análisis de varianzas de ANOVA. No hubo significancia estadística cuando comparamos las muestras peritumorales con las muestras de riñón normal (tabla 3.6 y gráfica 3.10).

El comportamiento de la proporción de capilares/total de vasos en los grupos con ccRCC mostró una homogeneidad entre los grupos europeos: España 60% y Ucrania zona limpia y contaminada 60% y 61% respectivamente; diferentes en un 7 % al grupo de muestras tumorales procedentes de Colombia 53%. Esta diferencia inter-grupos fue estadísticamente significativa por ANOVA con un $\alpha=0,021$ (gráfica 3.11).



Gráfica 3.11 Distribución de tipos de vasos por grupo de estudio

3.1.2.2 Cuantificación de expresión de factores

3.1.2.2.1 Nivel de la expresión por tipos de muestra

El nivel de intensidad en la expresión de cada factor, obtenidos de forma automática por el analizador de imagen, para los tres distintos tipos de muestra (Tejido renal normal, peritumoral y portador de ccRCC) y específicamente para cada grupo de estudio aparecen descritos en la tabla 3.7 como el número de casos observados en cada grupo.

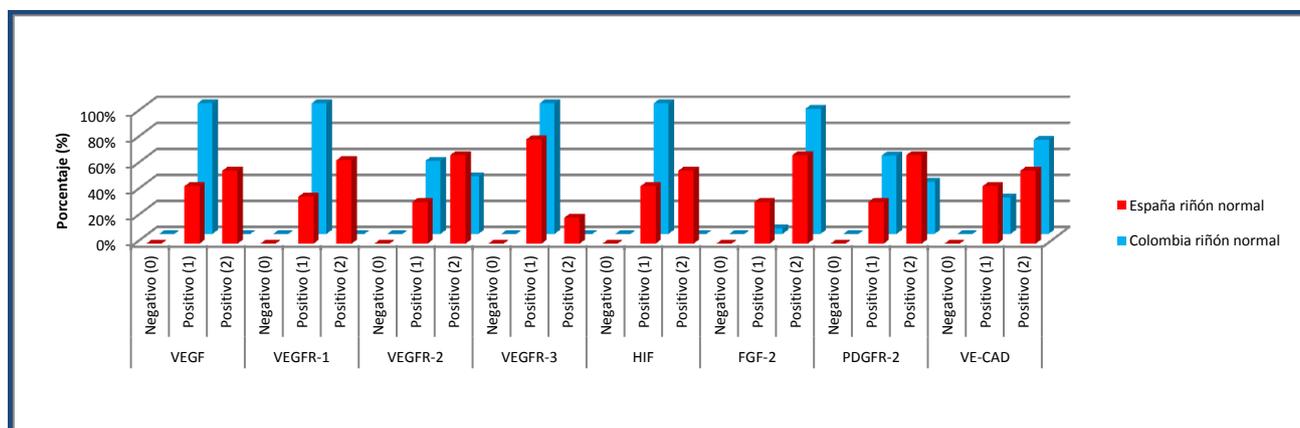
Factor	Expresión	España renal normal	Colombia renal normal	España peritumoral	Colombia peritumoral	Ucrania NO contaminada peritumoral	Ucrania contaminada peritumoral	España tumoral	Colombia tumoral	Ucrania NO contaminada tumoral	Ucrania contaminada tumoral
VEGF	0	0	0	0	5	3	2	3	13	2	0
	1	11	25	6	12	3	12	22	11	23	50
	2	14	0	19	7	19	36	0	0	0	0
VEGFR-1	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	2
	1	9	25	7	14	15	29	25	24	25	48
	2	16	0	18	10	10	21	0	0	0	0
VEGFR-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1	8	14	8	7	15	26	25	24	25	49
	2	17	11	17	17	10	24	0	0	0	0
VEGFR-3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
	1	20	25	18	19	19	35	24	24	24	49
	2	5	0	7	5	6	15	0	0	0	0
HIF	0	0	0	0	0	0	1	7	8	9	15
	1	11	25	5	13	5	16	18	16	16	35
	2	14	0	20	11	20	33	0	0	0	0
FGF-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	8	1	16	21	6	12	25	24	24	49
	2	17	24	9	3	19	38	0	0	1	1
PDGFR-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	8	15	9	16	8	18	25	24	25	50
	2	17	10	16	8	17	32	0	0	0	0
VE-CAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3
	1	11	7	6	9	8	18	21	20	22	47
	2	14	18	19	15	17	32	4	4	1	0

Tabla 3.7 Distribución grupal de casos por positividad de expresión

Todos los factores en estudio fueron positivos en el 100% de los casos de las muestras de riñón normal. En las procedentes de España se observó un nivel de expresión (2), en 56% de los casos para VEGF, HIF-1 α y VE-cadherina; en 68% de casos para FGF-2, VEGFR-2 y PDGFR- α y en 64% de casos para VEGFR-1. Únicamente para el VEGFR-3, solo el 20% de los casos mostraron nivel (2). En el grupo colombiano se observó un nivel (1) en el 100% de los casos para la expresión del VEGF, VEGFR-1, VEGFR-3 y HIF-1 α ; y un nivel (2) para VEGFR-2 y PDGFR- α en el 60% de los casos, en 70% de los casos para VE-cadherina y un 96% de los casos para FGF-2 (tabla 3.7).

En las muestras de riñones normales procedentes de España y Colombia, la expresión de los factores y receptores mostró un patrón homogéneo de positividad, sin embargo se presentaron diferencias en la intensidad de la positividad (1 ó 2). En tres de los factores (HIF-1 α , VEGF y VEGFR-1) la intensidad de la positividad presentó variaciones en el grupo español, observándose mayor porcentaje

de casos con nivel (2) de expresión (gráfica 3.13). Las diferencias fueron analizadas por la prueba del Chi-cuadrado resultando estadísticamente significativas $\alpha=0,00$.



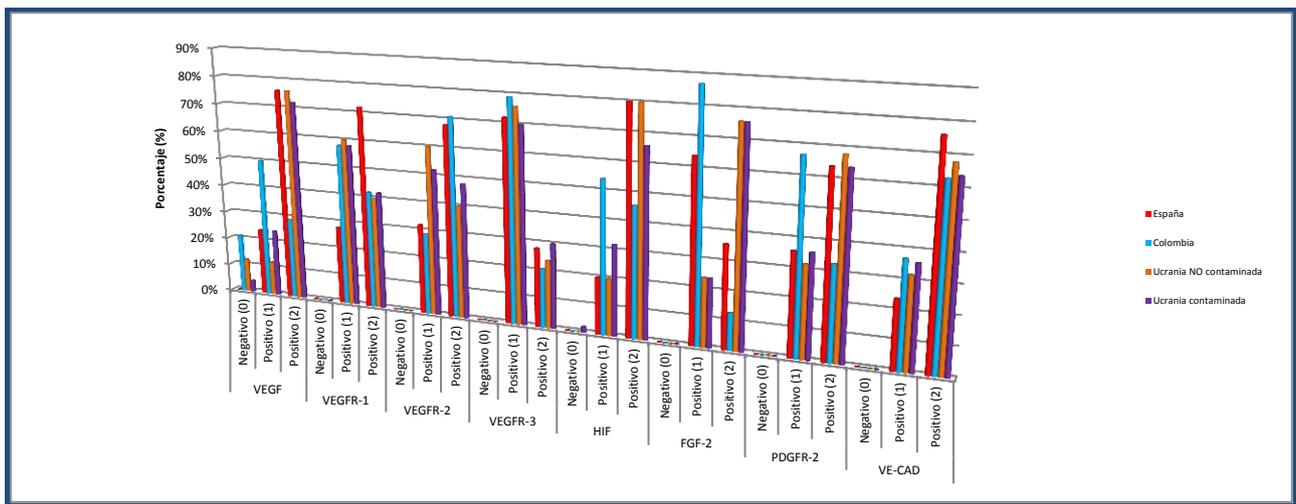
Gráfica 3.13 Distribución porcentual de casos por positividad de expresión de factores por grupo en riñones normales

En los grupos peritumorales hemos obtenido resultados positivos para la expresión de todos los factores con un porcentaje más variado de casos. En el grupo español se observó nivel (2) para el VEGF y la VE-cadherina en el 76% de sus casos; para el HIF-1 α en el 80%, el VEGFR-1 en el 72%, el VEGFR-2 en el 68% y el PDGFR- α 64% de los casos. En el grupo colombiano para el VEGFR-2 y la VE-cadherina se observó nivel (2) en el 70 y 62% de los casos respectivamente; para el FGF-2, el VEGFR-3, el PDGFR- α , el VEGFR-1 y el HIF-1 α se observó un nivel (1) en el 87, 79, 66, 58 y 54% de los casos respectivamente; para el VEGF el 50% de los casos mostró nivel (1) de positividad y en 20 % de los casos la expresión fue negativa.

En el grupo peritumoral de la zona limpia de Ucrania para el PDGFR- α y la VE-cadherina se observó nivel de expresión (2) en el 68% de los casos; para el HIF-1 α y el FGF-2 un 80 y 76% de los casos respectivamente; para el VEGFR-2 y el VEGFR-1 se observó un nivel (1) en 60% de los casos y para el VEGFR-3 en un 76% de casos; el VEGF mostró 50% de los casos con nivel (2) y en 12 % de los casos la expresión fue negativa. En el grupo de la zona contaminada de Ucrania para el PDGFR- α y la VE-cadherina se observó nivel (2) en el 64% de los casos; los VEGFR-1, 2 y 3 mostraron nivel (1) en un 58, 52 y 70% de los casos respectivamente; para el FGF-2 un 76% de los casos mostraron nivel (2); el VEGF y el HIF-1 α mostraron expresión negativa en un 4 y 2% de los casos, un 72 y 66% de los casos con nivel (2), respectivamente (tabla 3.7).

Respecto a la expresión inmunohistoquímica de los factores en las muestras peritumorales, mostró una tendencia homogénea de positividad, sin embargo se presentaron diferencias en la intensidad de

la positividad (1 ó 2) y únicamente en la expresión del VEGF se observaron casos negativos en tres de los grupos. Se observó el predominio de la expresión de nivel (2) para el VEGF, el HIF-1 α , el PDGFR- α y la VE-cadherina, especialmente en los grupos europeos. Es relevante la expresión de nivel (2) del FGF-2 en los grupos procedentes de Ucrania, a diferencia de la positividad (1) predominante en los dos grupos sin exposición a IR (gráfica 3.14).



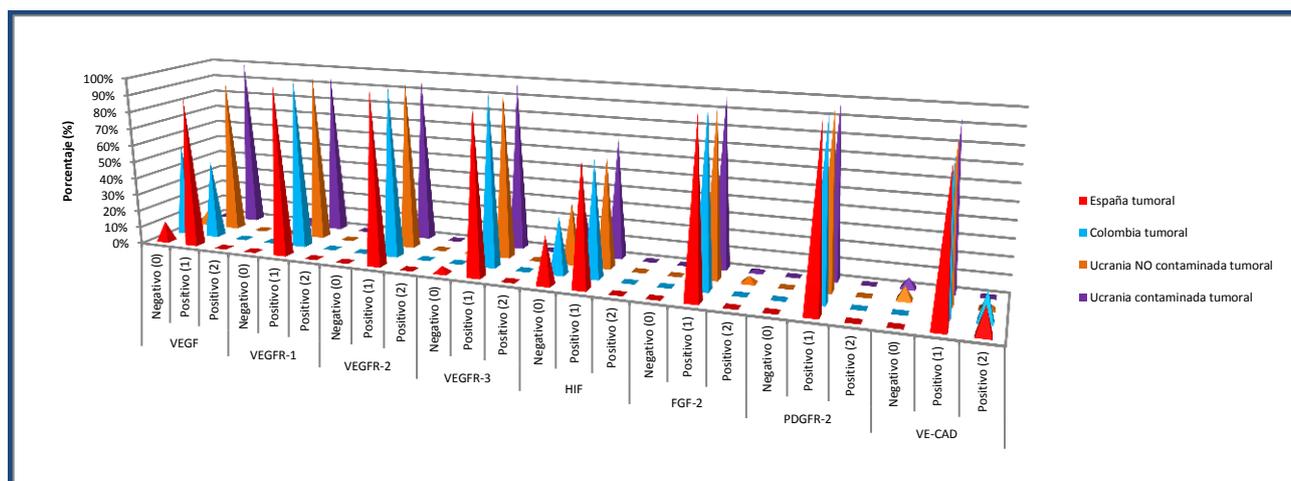
Gráfica 3.14 Distribución porcentual de casos por positividad de expresión de factores por grupos peritumorales

En los grupos de muestras con ccRCC hemos obtenido algunos casos con expresión negativa en cuatro de los factores, VEGF, VEGFR-3, HIF-1 α y VE-cadherina. Dentro de las positividades únicamente se observó expresión de nivel (2) para el FGF-2 y la VE-cadherina. En el grupo español mostraron un nivel (1) el VEGFR-1, VEGFR-2, FGF-2 y el PDGFR- α en 100% de sus casos; para el HIF-1 α , el VEGF, el VEGFR-3 y la VE-cadherina, el 72, 88, 84 y 96% de casos respectivamente, sin embargo para la VE-cadherina el resto de casos presentaron nivel (2), los otros tres factores no mostraron expresión en los casos restantes. En el grupo de Colombia se observó nivel (1) para el PDGFR- α , el FGF-2 y el VEGFR-1, 2 y 3 en 100% de sus casos; para la VE-cadherina, el HIF-1 α , el VEGF en 83, 67 y 46% de los casos, sin embargo para la VE-cadherina el resto de sus casos mostraron nivel (2), para los otros dos factores fue negativa la expresión del resto de sus casos.

En el grupo tumoral de la zona limpia de Ucrania, el 100% de casos mostraron nivel (1) de expresión para el VEGFR-1, VEGFR-2 y PDGFR- α ; el 96% para el VEGFR-3 y FGF-2; el 92, 88 y 64% para el VEGF, la VE-cadherina y el HIF-1 α respectivamente, sin embargo para el VEGF y el HIF-1 α , el resto de sus casos fueron negativos, mientras para la VE-cadherina 8% de casos fueron negativos y un 4% mostró nivel (2). En el grupo de la zona contaminada de Ucrania mostraron nivel (1) el 100%

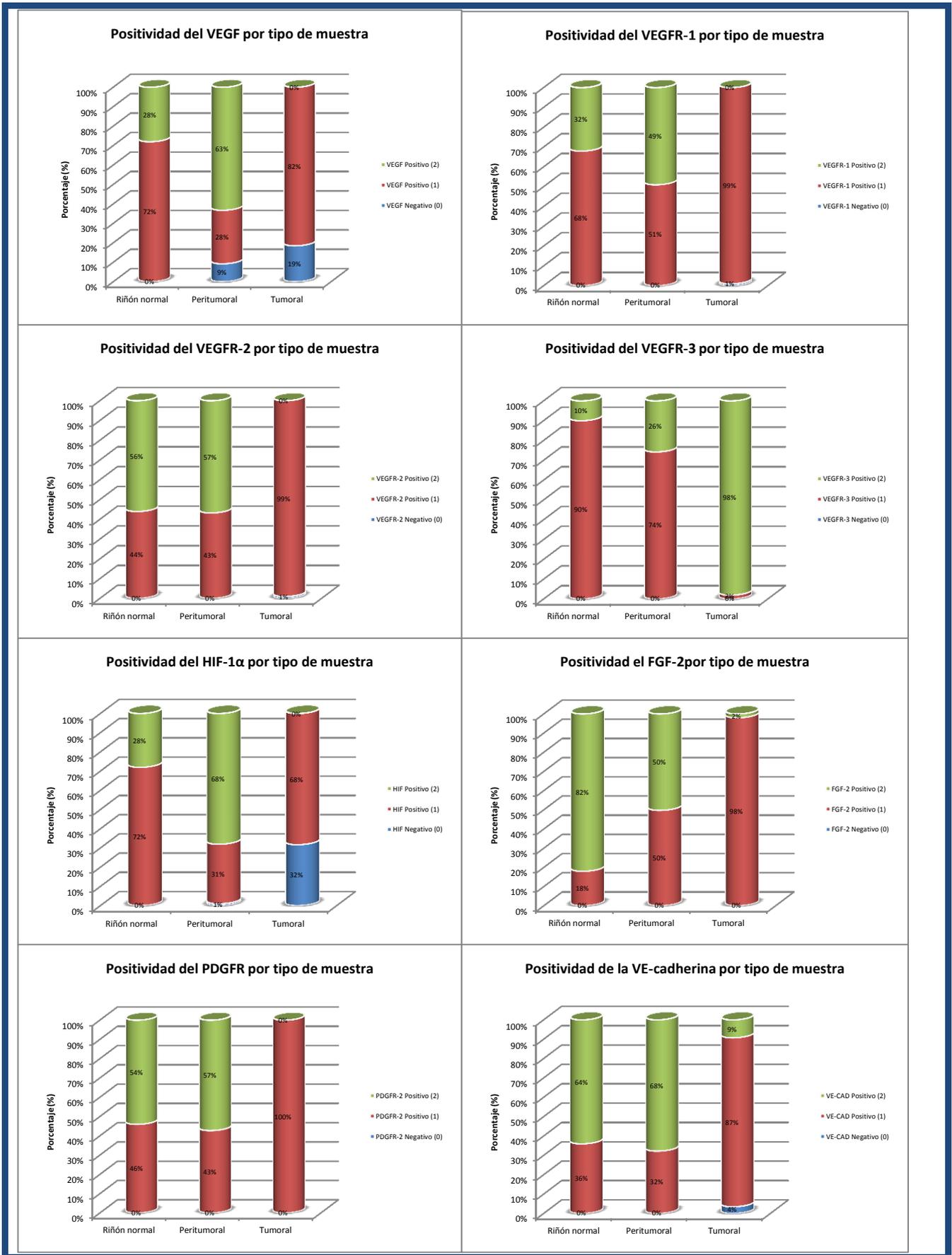
de casos para el VEGF y el PDGFR- α ; el 98% para el VEGFR-2, el VEGFR-3 y el FGF-2; el 96, 94 y 70% para el VEGFR-1, la VE-cadherina y el HIF-1 α respectivamente. El resto de casos para el FGF-2 mostró nivel (2) y en los demás factores fue negativa la expresión del resto de sus casos (tabla 3.7).

Analizando estos resultados para los grupos formados por muestras con ccRCC se observó una tendencia positiva para seis factores (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, FGF-2, PDGFR- α HIF-1 α), muy similar en los cuatro grupos del estudio. Sin embargo, para la expresión de VEGF, el grupo ucraniano de la zona contaminada presentó mayor porcentaje de casos positivos observándose una diferencia de 8, 12 y 44% con los otros grupos. La diferencia intergrupos por la prueba del Chi-cuadrado fue estadísticamente significativa $\alpha=0.00$. Para la VE-cadherina en cambio se observó mayor sobre expresión en los grupos sin IR, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa. No se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ucranianos (gráfica 3.15).



Gráfica 3.15 Positividad de expresión de factores por grupos tumorales

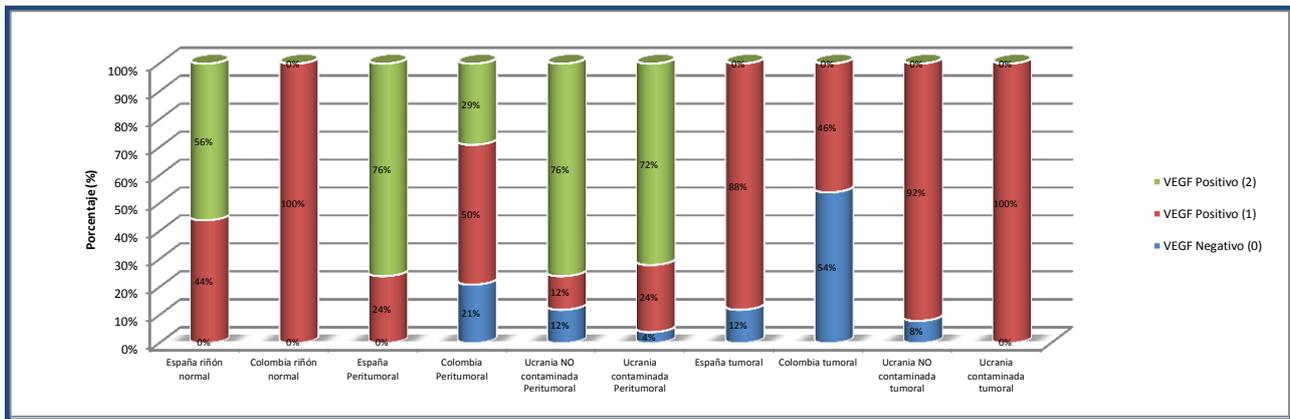
Analizamos la expresión de una molécula de adhesión (VE-cadherina), tres factores (VEGF, FGF-2 y HIF-1 α) y cuatro receptores (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y PDGFR- α), observándose en el tejido renal sin neoplasia mayor porcentaje de casos con altos niveles de expresión, comparados con las muestras con ccRCC; estas diferencias resultaron estadísticamente significativas para todos los factores por la prueba del Chi cuadrado de Pearson con $\alpha=0.000$ (gráfica 3.16).



Gráfica 3.16 Distribución de la positividad de expresión de factores por tipos de muestra

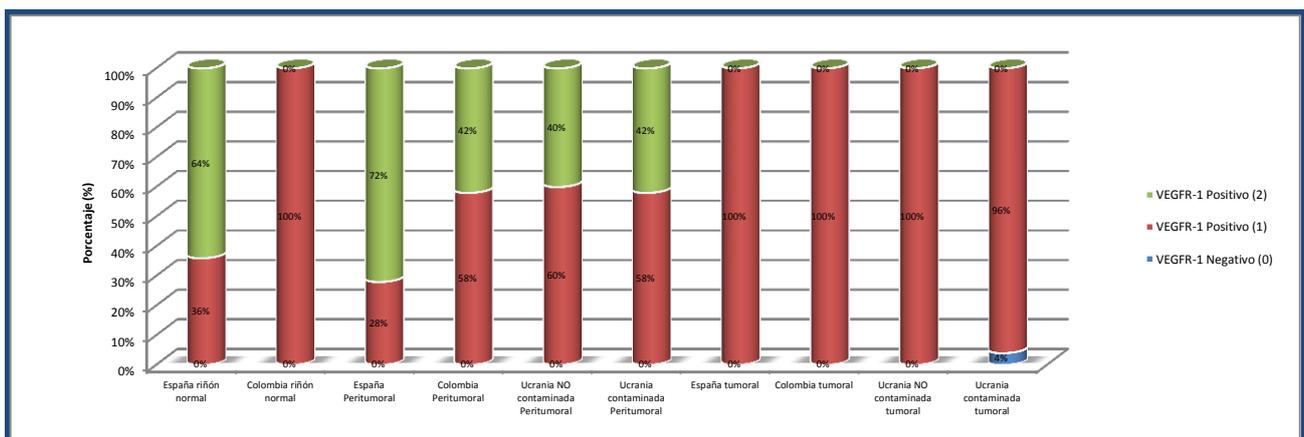
3.1.2.2.2 Niveles de expresión por factor. Porcentaje de casos por grupos

La expresión del VEGF mostró en el grupo de tejido renal normal español un 50% más de casos con nivel (2) de expresión, comparado con el grupo colombiano. El grupo peritumoral colombiano mostró un 50% menos de casos de nivel (2); y sus muestras tumorales un 40% más de casos negativos, en comparación con cada grupo europeo (gráfica 3.17).



Gráfica 3.17 Distribución de la positividad del VEGF por grupo

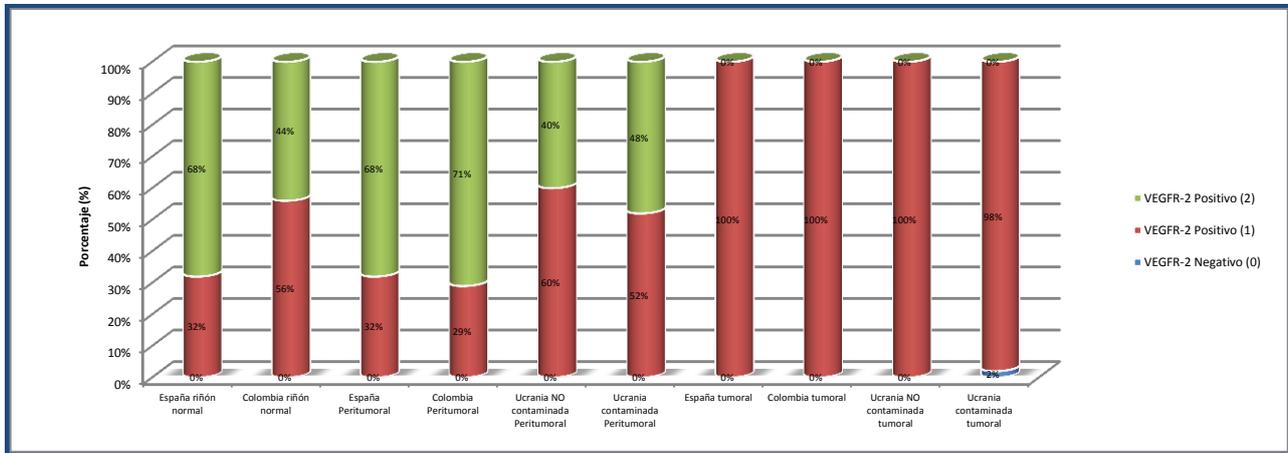
La expresión del VEGFR-1 en el grupo de tejido renal normal español mostró 60% de casos más con nivel de expresión (2) que el grupo control colombiano. El grupo peritumoral español presentó 30% de casos más con nivel (2); y en las muestras con ccRCC, todos los grupos fueron positivos con homogeneidad en el porcentaje de casos. Las diferencias de positividad intergrupos peritumorales y tumorales correspondientes, fueron estadísticamente significativas (gráfica 3.18).



Gráfica 3.18 Distribución de la positividad del VEGFR-1 por grupo

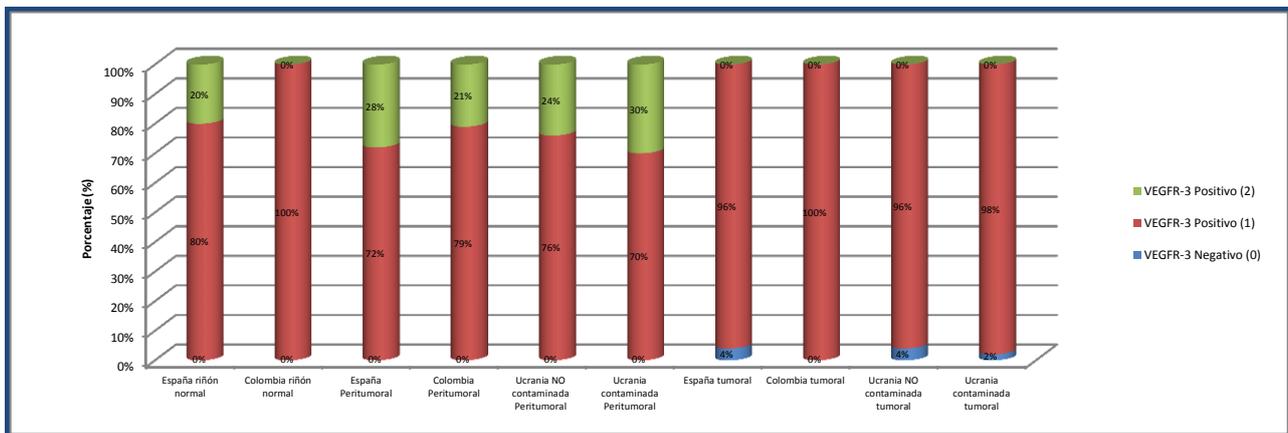
La expresión del VEGFR-2 mostró en las muestras de tejido renal normal del grupo español, 24% de casos más con nivel (2) que el grupo colombiano. En los casos peritumorales de los grupos sin

exposición a IR se observaron 20% de casos más con expresión de nivel (2) en comparación con los grupos ucranianos. En los grupos tumorales, casi la totalidad de los casos expresaron nivel (1) de positividad (gráfica 3.19).



Gráfica 3.19 Distribucion de la positividad del VEGFR-2 por grupo

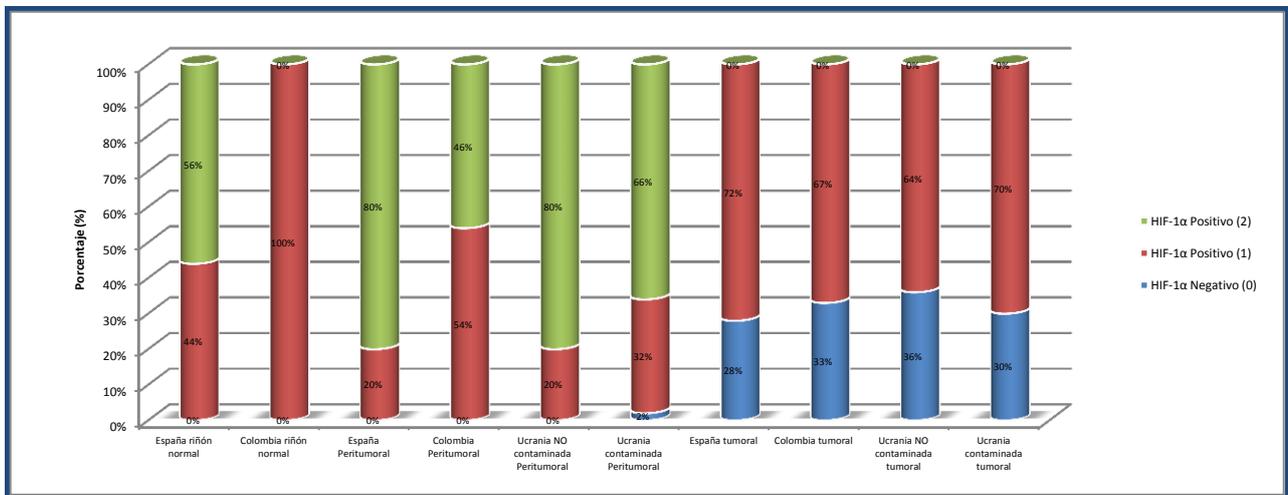
Para el VEGFR-3, todos los grupos sin ccRCC fueron positivos con similar diversidad de expresión de nivel (2) entre grupos del estudio. En los grupos tumorales, casi la totalidad de los casos mostraron nivel (1). Las diferencias entre los grupos y tipos de muestra no fueron estadísticamente significativas (gráfica 3.20).



Gráfica 3.20 Distribucion de la positividad del VEGFR-3 por grupo

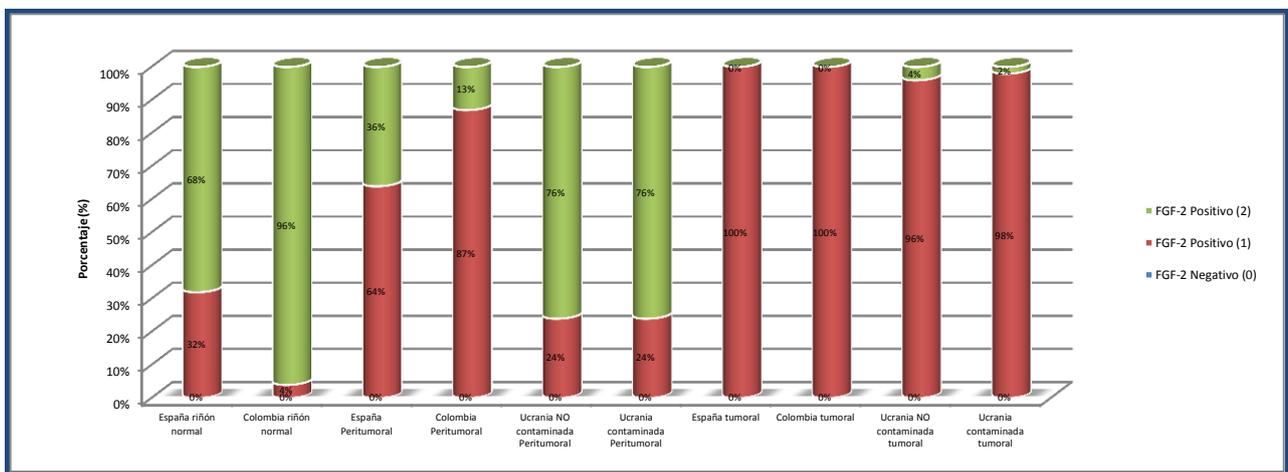
De la expresión del HIF-1 α obtuvimos una negatividad similar entre los grupos tumorales entre 28 al 36%. Esto no fue observado en los otros factores estudiados. En los grupos de Colombia de riñón normal y tejido peritumoral se observó un 50 y 30 % de casos menos de nivel (2) de expresión, respectivamente, en contraste con la similitud en la expresión en los grupos restantes. Sin embargo

las diferencias intergrupos peritumoral y tumoral correspondiente fueron estadísticamente significativas (gráfica 3.21).



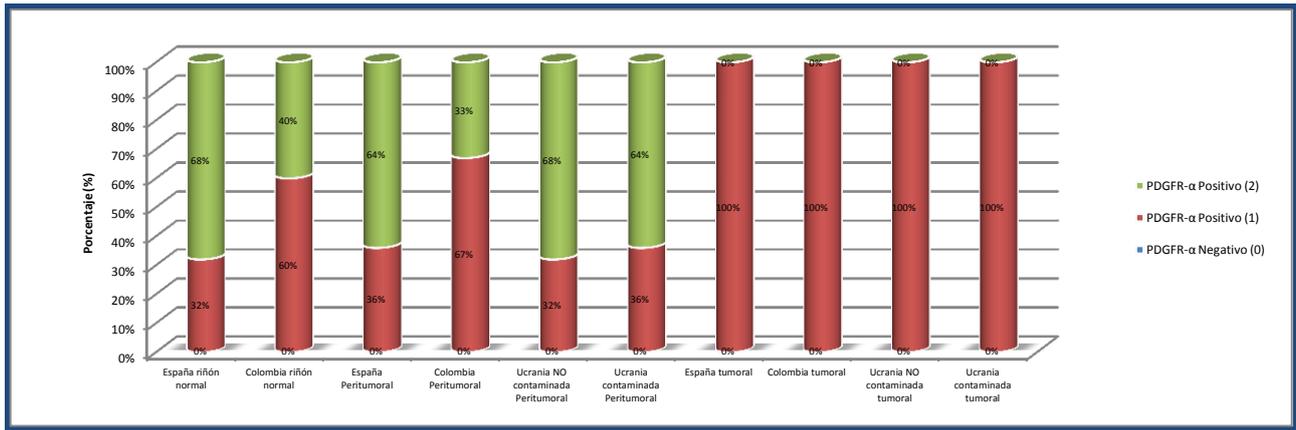
Gráfica 3.21 Distribución de la positividad del HIF-1α por grupo

El FGF-2 en los grupos peritumorales ucranianos tuvo entre un 40 y 60% de casos más con expresión de nivel (2) que los grupos sin exposición a IR; esta diferencia por la prueba del Chi-cuadrado resultó estadísticamente significativa $\alpha=0.00$. En los grupos tumorales, casi la totalidad de los casos expresaron nivel (1) de positividad (gráfica 3.22).



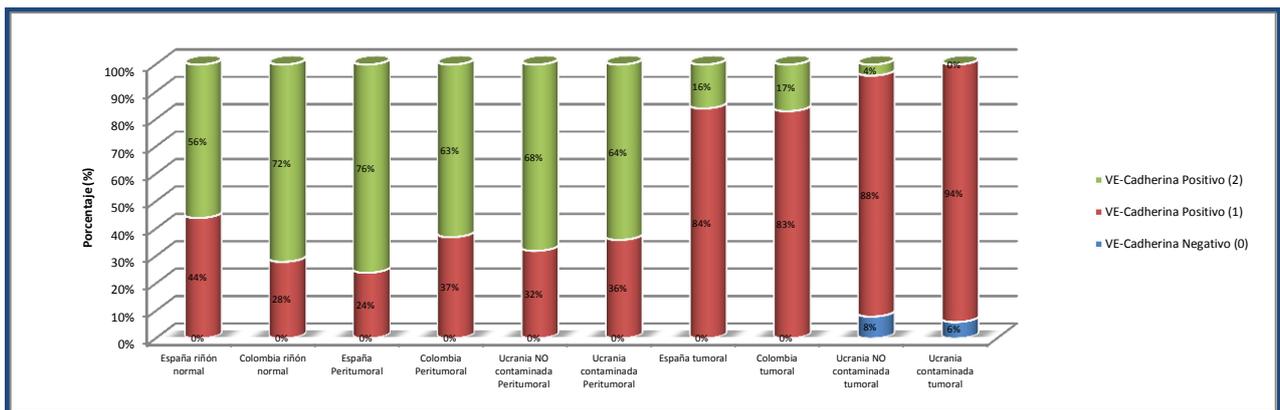
Gráfica 3.22 Distribución de la positividad del FGF-2 por grupo

La expresión del PDGFR-2 en los grupos tumorales mostró un 100% de casos con nivel (1) de expresión. Los grupos europeos mostraron entre 20 a 30 % de casos más con nivel (2), que los grupos colombianos de tejido renal normal y peritumoral respectivamente (gráfica 3.23).



Gráfica 3.23 Distribución de la positividad del PDGFR por grupo

La expresión de la VE-cadherina en todos los grupos sin ccRCC fue positiva y con predominio similar del nivel (2) de expresión. En los grupos tumorales sin exposición a IR se observó entre 13 a 17% de casos más, con nivel (2) que en los grupos ucranianos, donde se observó de 8 a 6% de casos con expresión negativa. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (gráfica 3.24).



Gráfica 3.24 Distribución de la positividad de la VE-cadherina por grupo

3.1.2.2.2 Porcentaje de expresión de los factores

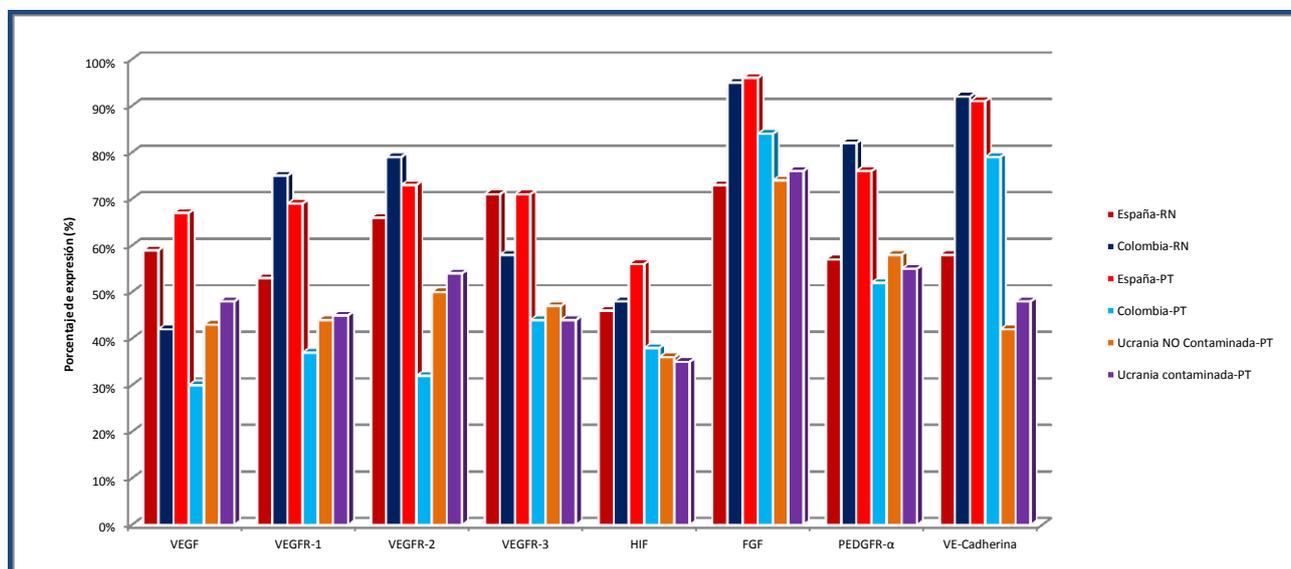
El porcentaje de expresión de cada factor, obtenido para cada caso de forma automática por el analizador de imagen, se describe como promedio de cada grupo en la tabla 3.8.

GRUPOS	VEGF	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	HIF-1 α	FGF-2	PDGFR- α	VE-cadherina
España-RN	59%	53%	66%	71%	46%	73%	57%	58%
Colombia-RN	42%	75%	79%	58%	48%	95%	82%	92%
Colombia-PT	30%	37%	32%	44%	38%	84%	52%	79%
Colombia T	13%	46%	52%	67%	25%	90%	77%	97%
España-PT	67%	69%	73%	71%	56%	96%	76%	91%
España T	35%	61%	84%	47%	16%	87%	83%	85%
Ucrania Limpia-PT	43%	44%	50%	47%	36%	74%	58%	42%
Ucrania Limpia- T	28%	48%	51%	47%	22%	71%	67%	62%
Ucrania Contaminada-PT	48%	45%	54%	44%	35%	76%	55%	48%
Ucrania Contaminada T	49%	49%	54%	54%	31%	76%	70%	72%

Tabla 3.8 Promedio de expresión de factores por grupo

El porcentaje de expresión entre los grupos de muestras sin ccRCC presentó un comportamiento similar. Los factores con mayor porcentaje de expresión fueron el FGF-2, el PDGFR- α y la VE-cadherina; mientras para el HIF-1 α y el VEGF se observaron los menores promedios por grupo. Los VEGFR 1, 2 y 3 mostraron una tendencia de expresión moderada y variada de acuerdo a cada grupo analizado, sin diferencias estadísticamente significativas (gráfica 3.25).

Al correlacionar el promedio de expresión del VEGF con el de sus receptores, se encontró que fue menor que el promedio del VEGFR-2 en los seis grupos sin ccRCC; sin embargo, fue mayor que el promedio del VEGFR-1 en riñones normales de Colombia y peritumorales de la zona contaminada de Ucrania; y también mayor que el del VEGFR-3 de la zona contaminada de Ucrania (gráfica 3.25).

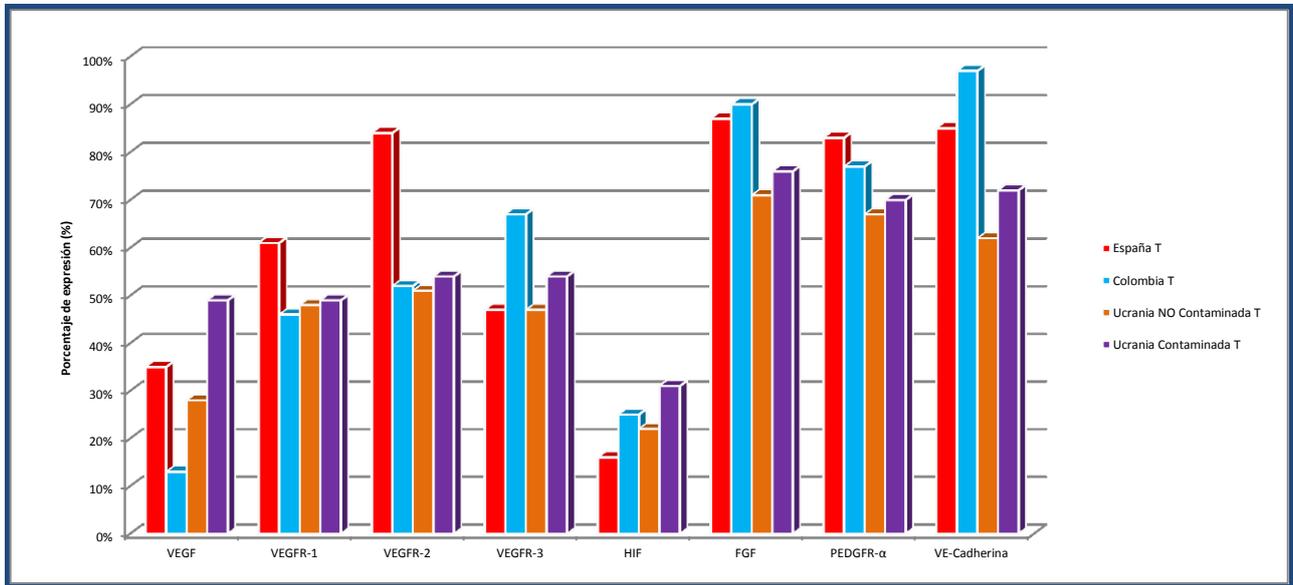


Gráfica 3.25 Promedios de expresión de factores por grupos sin ccRCC

El comportamiento de los porcentajes de expresión en los tumores, fue similar al observado en los tipos de muestras sin ccRCC, pero con promedios menores. Los factores con mayor promedio fueron el FGF-2, el PDGFR- α y la VE-cadherina; mientras para el VEGF y especialmente el HIF-1 α mostraron los menores promedios por grupo. Los VEGFR 1, 2 y 3 mostraron un comportamiento moderado en su expresión y variaciones propias de cada grupo analizado, sin diferencias estadísticamente significativas (gráfica 3.26).

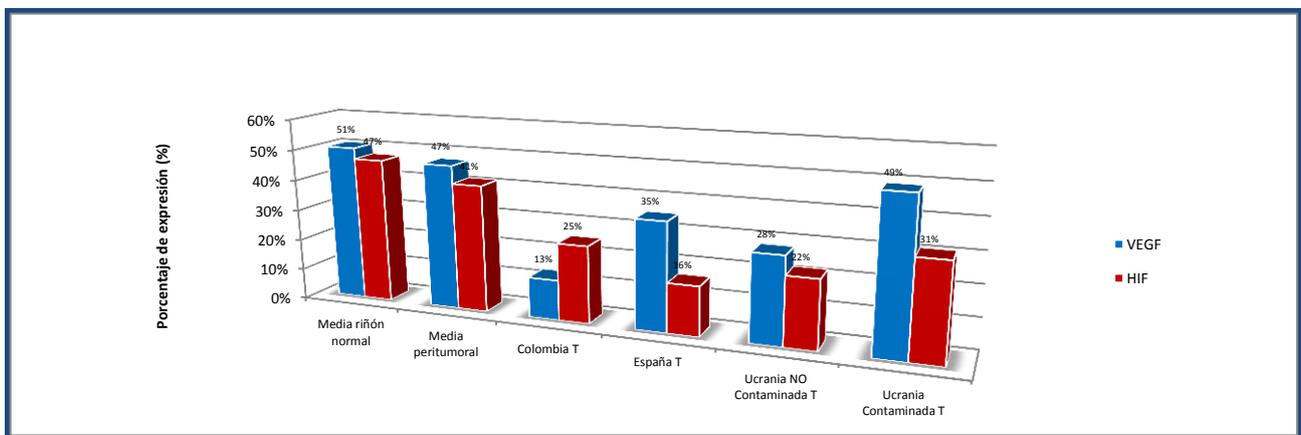
Al correlacionar en nuestro estudio el promedio de expresión del VEGF, en cada uno de los tres grupos tumorales no expuestos a IR, se encontró que su nivel fue mucho menor al promedio observado en sus 3 receptores, con diferencias estadísticamente significativas por la prueba del Chi-

cuadrado con $\alpha=0.000$. Mostrando generalmente mayores diferencias con el del VEGFR-2, con dos excepciones, una para el VEGFR-1 expresado por el grupo español y otra para el VEGFR-3 expresado por el grupo colombiano. El grupo de la zona contaminada de Ucrania mostró un porcentaje de expresión similar del VEGF y de sus tres receptores (gráfica 3.26).



Gráfica 3.26 Promedios de expresión de factores por grupo tumoral

Al comparar los porcentajes de expresión del HIF-1 α con su correspondiente promedio de VEGF para cada grupo, observamos que en el grupo colombiano fue mayor que el observado para el VEGF; mientras que en los otros tres grupos esta correlación fue inversa. El mayor promedio de expresión para HIF-1 α y VEGF se observó en el grupo de la zona contaminada de Ucrania. Las diferencias fueron estadísticamente significativas por el análisis de varianzas ANOVA $\alpha=0.000$ (gráfica 3.27).



Gráfica 3.27 Porcentajes de expresión de VEGF y HIF-1 α en grupos con ccRCC y en muestras sin ccRCC

3.1.2.3 Patrón de expresión celular (PEC)

Después de analizar la distribución de la expresión celular de cada factor, en cada caso cuantificado, los agrupamos en dos grupos: con ccRCC y sin ccRCC.

- En las muestras con ccRCC o tumorales pueden observarse dos patrones:

- 1.- PEC Difuso: el inmunomarcaje se muestra en todo el citoplasma sin predominancia alguna (fig. 3.1A y C).
- 2.- PEC Periférico: el inmunomarcaje predomina en la periferia celular (perinuclear y periferia de la célula) (fig. 3.1B y D).

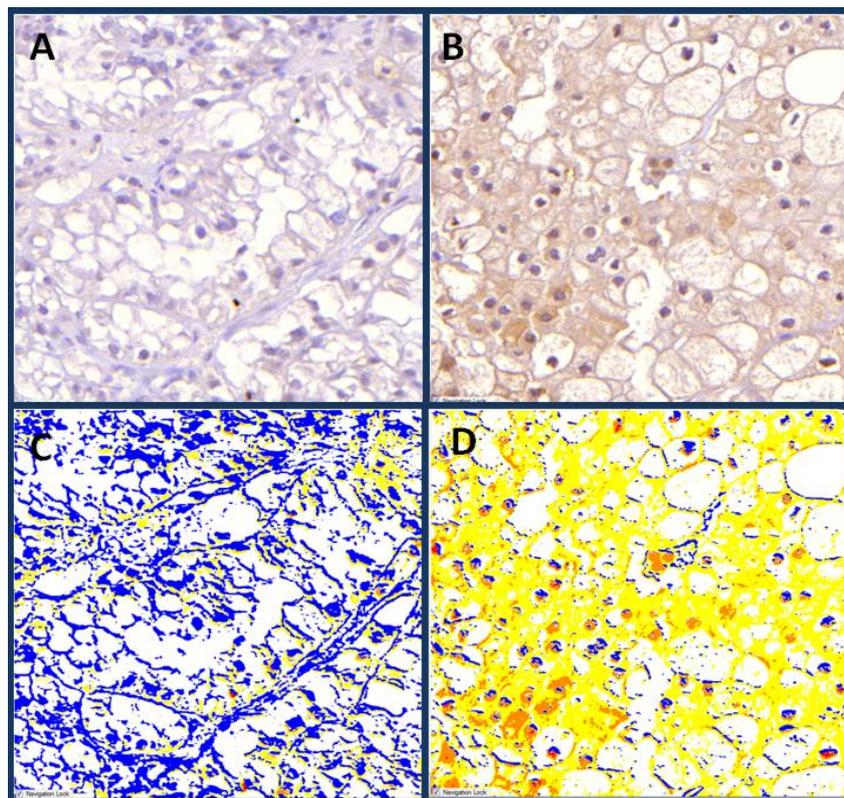


Figura 3.1 Tipos de PEC en ccRCC. Patrón Citoplasmático periférico (A) y medición de patrón periférico (C); patrón Citoplasmático difuso (B) y medición de patrón difuso (D)

- En las muestras sin ccRCC, tanto en las muestras de tejido renal normal como en las muestras peritumorales, donde la morfología celular del tejido renal esta conservada, especialmente en los epitelios de revestimiento tubular, podemos observar tres patrones:

- 1.- Difuso: el inmunomarcaje se evidencia en todo el citoplasma celular (fig. 3.2A).
- 2.- Predominio basal: muestra mayor inmunomarcaje localizado en la base de las células epiteliales (fig. 3.2B).
- 3.- Predominio Apical: muestra mayor inmunomarcaje localizado hacia el borde apical epitelial (fig. 3.2C).

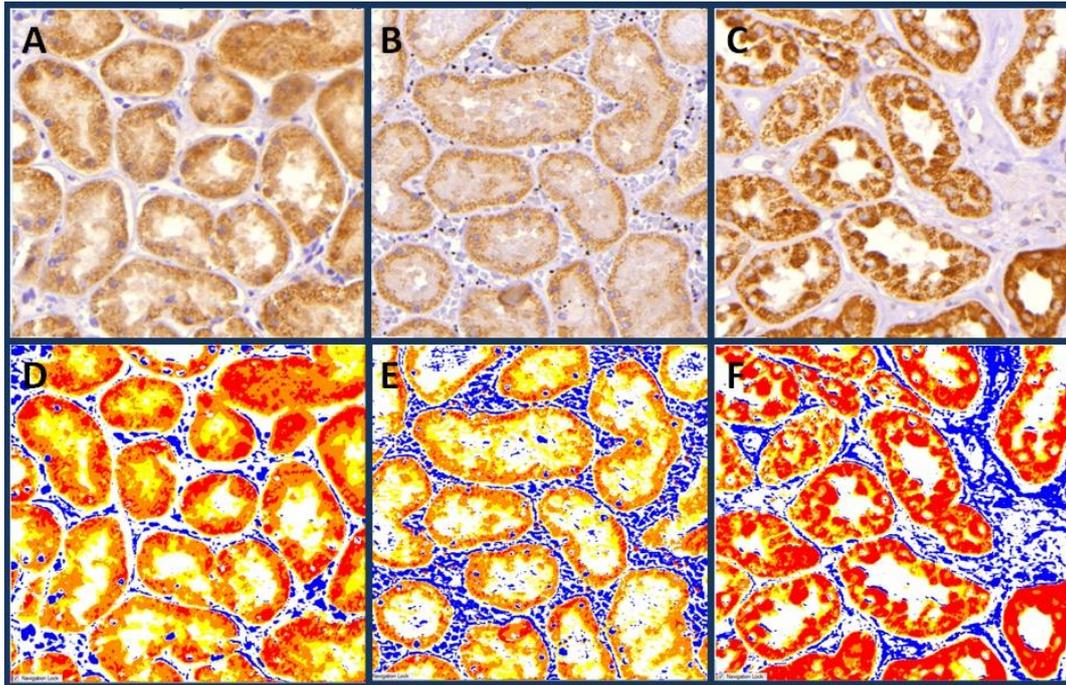


Figura 3.2 Tipos de PEC. Patrón difuso A y medición de patrón difuso D; patrón basal B y medición de patrón basal E; patrón apical C y medición de patrón apical F

Factor	Patrón de expresión celular	España Riñón normal	Colombia Riñón normal	España peritumoral	Colombia peritumoral	Ucrania NO contaminada peritumoral	Ucrania contaminada peritumoral
VEGF	Difuso	25 (100%)	20 (80%)	4 (16%)	9 (38%)	6 (24%)	16 (32%)
	Predominio basal	-	5 (20%)	-	-	-	-
	Predominio apical	-	-	21 (84%)	15 (62%)	19 (76%)	34 (68%)
VEGFR-1	Difuso	25 (100%)	20 (80%)	13 (52%)	11 (46%)	8 (32%)	24 (48%)
	Predominio basal	-	5 (20%)	-	-	-	-
	Predominio apical	-	-	12 (48%)	13 (54%)	17 (68%)	26 (52%)
VEGFR-2	Difuso	24 (96%)	4 (16%)	3 (12%)	9 (38%)	8 (32%)	12 (24%)
	Predominio basal	1 (4%)	21 (84%)	-	-	-	-
	Predominio apical	-	-	22 (88%)	15 (62%)	17 (68%)	38 (76%)
VEGFR-3	Difuso	25 (100%)	25 (100%)	5 (20%)	5 (21%)	10 (40%)	28 (56%)
	Predominio basal	-	-	-	-	-	-
	Predominio apical	-	-	20 (80%)	19 (79%)	15 (60%)	22 (44%)
HIF	Difuso	25 (100%)	11 (44%)	7 (28%)	18 (75%)	10 (40%)	13 (26%)
	Predominio basal	-	14 (56%)	-	-	-	-
	Predominio apical	-	-	18 (72%)	6 (25%)	15 (60%)	37 (74%)
FGF-2	Difuso	23 (92%)	25 (100%)	-	11 (46%)	8 (32%)	23 (46%)
	Predominio basal	2 (8%)	-	-	-	-	-
	Predominio apical	-	-	25 (100%)	13 (54%)	17 (68%)	27 (54%)
PDGFR-2	Difuso	25 (100%)	25 (100%)	3 (12%)	13 (54%)	1 (4%)	28 (56%)
	Predominio basal	-	-	-	-	-	-
	Predominio apical	-	-	22 (88%)	11 (46%)	24 (96%)	22 (44%)
VE-CAD	Difuso	21 (84%)	25 (100%)	-	13 (54%)	11 (44%)	16 (32%)
	Predominio basal	4 (16%)	-	-	-	-	-
	Predominio apical	-	-	25 (100%)	11 (46%)	14 (56%)	34 (68%)

Tabla 3.8 Distribución porcentual del patrón de expresión celular PEC, en muestras sin ccRCC

En nuestro análisis, utilizando los criterios expuestos, hemos observado que en el grupo control de España los 25 casos (100%) mostraban un patrón difuso para el VEGF, el VEGFR-1, el VEGFR-3, el HIF y el PDGFR-2. Para el VEGFR-2, 24 de los casos (96%) evidenciaban un patrón difuso y 1 caso (4%) fue de predominio basal. Para el FGF-2 en 23 de los casos (92%) era difuso y en 2 de los casos (8%) fue basal; para la expresión de VE-cadherina en 21 de los casos (84%) fue difuso y en 4 de los casos (16%) era basal (tabla 3.8).

En el grupo control procedente de Colombia los 25 casos (100%) mostraban un patrón difuso para la VE-cadherina, el PDGFR-2, el VEGFR-3, y el FGF-2, mientras que en el mismo grupo para el VEGF y el VEGFR-1 20 de los casos (80%) evidenciaban un patrón difuso y 5 de los casos (20%) era basal; para el VEGFR-2 en 21 de los casos (84%) fue difuso y 4 de los casos (16%) era basal; y para el HIF en 11 de los casos (44%) era difuso y 14 de los casos (56%) fue basal (tabla 3.8).

En el grupo de muestras peritumorales procedentes de España los 25 (100%) casos mostraban un patrón con predominio apical para la VE-cadherina, y el FGF-2. Para el PDGFR-2 y el VEGFR-2, 22 de los casos (88%) evidenciaban un patrón con predominio apical y 3 de los casos (12%) fue difuso; para el VEGF en 21 de los casos (84%) era apical y en 4 de los casos (16%) fue difuso; para el HIF en 18 de los casos (72%) era apical de la expresión y en 7 de los casos (28%) fue difuso; para el VEGFR-3 en 20 de los casos (80%) era apical y en 5 de los casos (20%) fue difuso; y para el VEGFR-1 en 12 de los casos (48%) era apical y 13 de los casos (52%) fue difuso (tabla 3.8).

En el grupo de muestras peritumorales procedentes de Colombia, 11 casos (46%) mostraban un predominio apical de la expresión y 13 de los casos (54%) un patrón difuso para la VE-cadherina y el PDGFR-2; para el VEGFR-2 y el VEGF 15 de los casos (62%) era apical y en 9 de los casos (38%) fue difuso; el VEGFR-1 y el FGF-2 en 13 de los casos (54%) era apical y en 11 de los casos (46%) fue difuso; el HIF, en 6 de los casos (25%) era apical y en 18 de los casos (75%) fue difuso; y para el VEGFR-3 en 19 de los casos (79%) era apical y 5 de los casos (21%) fue difuso (tabla 3.8).

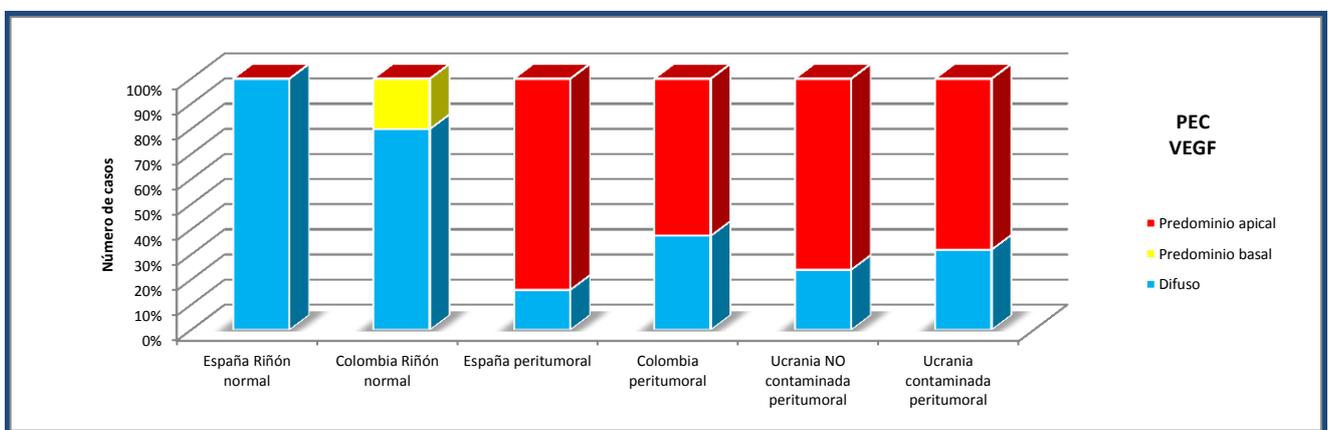
En el grupo de muestras peritumorales procedentes de la zona limpia de Ucrania, 15 casos (60%) mostraban un predominio apical de su expresión y 10 de los casos (40%) un patrón difuso para el HIF y el VEGFR-3; Para el VEGFR-2, 17 de los casos (68%) era apical y en 8 de los casos (32%) fue difuso; para el VEGF en 19 de los casos (76%) era apical y en 6 de los casos (24%) fue difuso; para el PDGFR-2 en 24 de los casos (96%) era apical y en 1 caso (4%) fue difuso; para la VE-

cadherina en 14 de los casos (56%) era apical y 11 de los casos (44%) fue difuso; y para el VEGFR-1 y el FGF-2 en 17 de los casos (68%) era apical y en 8 de los casos (32%) fue difuso (tabla 3.8).

En el grupo de muestras peritumorales procedentes de la zona contaminada de Ucrania, 34 casos (68%) mostraban un patrón con predominio apical y 16 de los casos (32%) un patrón difuso para el VEGF y la VE-cadherina; para el VEGFR-2, 38 de los casos (76%) era apical y en 12 de los casos (24%) fue difuso; para el VEGFR-3 y el PDGFR-2 en 22 de los casos (44%) era apical y en 28 de los casos (56%) fue difuso; para el HIF en 37 de los casos (74%) era apical y en 13 de los casos (26%) fue difuso: para el VEGFR-1 en 26 de los casos (52%) era apical y en 24 de los casos (48%) fue difuso; y para el FGF-2 en 27 de los casos (54%) era apical y en 23 de los casos (46%) fue difuso (tabla 3.8).

En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras sin ccRCC, para el VEGF se observó una tendencia muy diferente entre los dos subgrupos de muestras sin ccRCC del estudio. Para las muestras control, entre el 80% y el 100% de los casos mostraron un patrón difuso, un 20% de casos específicamente del grupo de riñones normales procedentes de Colombia mostraron un patrón con predominio basal (gráfica 3.28). En ningún caso se observó predominio apical en su expresión. En las muestras peritumorales se observó que más del 60% de los casos de todos los grupos mostraron un patrón con predominio apical, el resto de casos evidenciaron un patrón difuso y en ningún caso mostraron predominio basal.

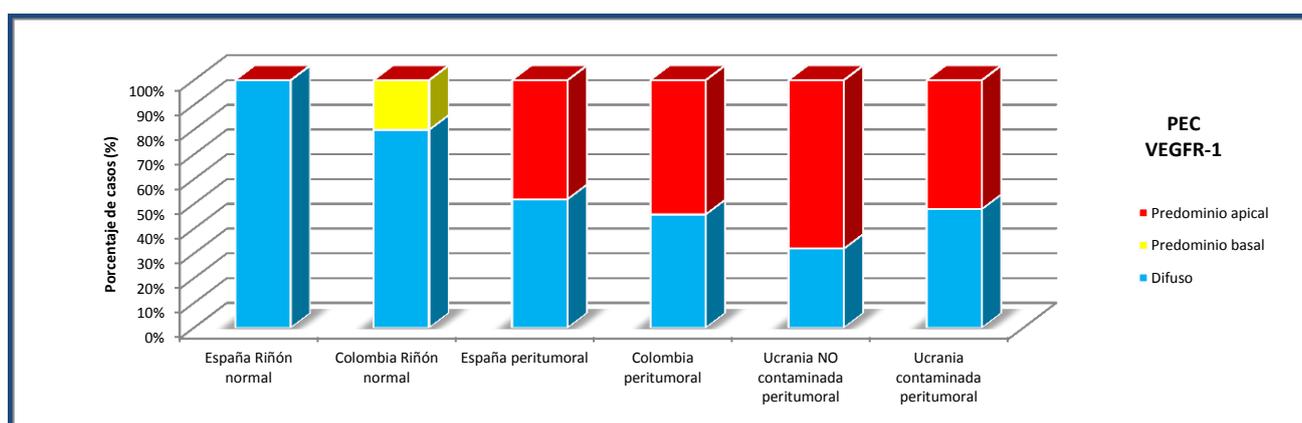
La diferencia intergrupos no mostró significancia estadística, pero la diferencia mostrada en las tendencias de los PEC, entre los dos tipos de muestras sin ccRCC, se analizaron con la prueba del Chi-cuadrado de Pearson resultando estadísticamente muy significativa con un $\alpha=0.00$.



Gráfica 3.28 PEC de VEGF por grupos sin ccRCC

En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras sin ccRCC para el VEGFR-1 se observó una tendencia muy diferente entre los dos subgrupos de muestras sin ccRCC del estudio. Para las muestras renales normales se evidencia que entre el 80% y el 100% de los casos poseen un patrón difuso, un 20% de casos, específicamente del grupo de riñones normales procedentes de Colombia mostró un patrón con predominio basal. En ningún caso se observó un PEC con predominio apical. Para las muestras peritumorales se observó una tendencia donde en un intervalo del 48% al 68% de los casos en los grupos mostraba un predominio apical, el resto de casos evidenciaron un patrón difuso y en ningún caso mostraron PEC con predominio basal (gráfica 3.29).

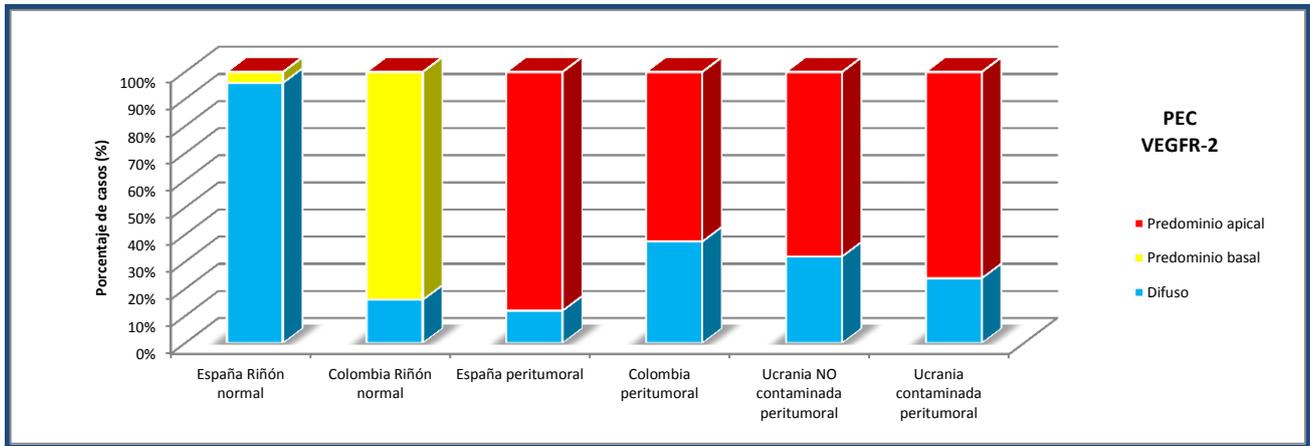
La diferencia intergrupos no mostró significancia estadística, pero la diferencia mostrada entre las tendencias de los PEC, entre los dos tipos de muestras sin ccRCC, se analizaron con la prueba del Chi-cuadrado de Pearson resultando estadísticamente muy significativa con un $\alpha= 0.00$.



Gráfica 3.29 PEC de VEGFR-1 por grupos sin ccRCC

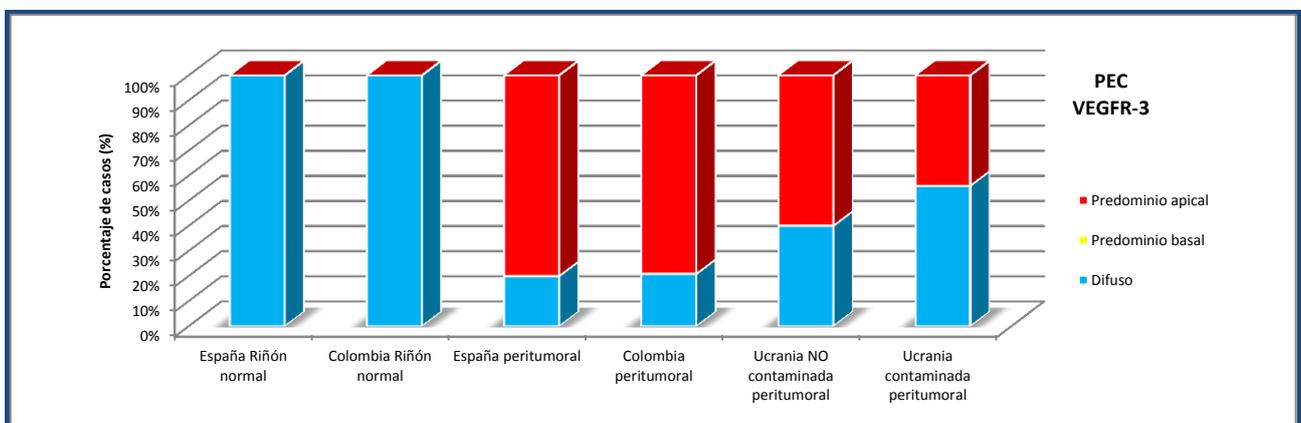
En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras sin ccRCC, para el VEGFR-2 se observó una tendencia muy diferente entre los dos subgrupos de muestras sin ccRCC del estudio. Para las muestras peritumorales se observó que en el intervalo del 64% al 88% de los casos había un predominio apical, el resto de casos evidenciaron un patrón difuso y en ningún caso mostraron PEC con predominio basal. Para las muestras del grupo control, el no poseer casos con predominio apical fue la tendencia distintiva con las muestras peritumorales; sin embargo, se evidenció gran diferencia entre el 96% de los casos con patrón difuso, procedentes de los controles de España y el 84% con predominio basal de los casos controles de Colombia (gráfica 3.30). La diferencia intergrupos peritumorales no mostró significancia estadística, pero la diferencia mostrada en las tendencias de los PEC, entre los dos tipos de muestras sin ccRCC y las evidenciadas entre los

grupos de muestras renales normales, se analizaron con la prueba del Chi-cuadrado de Pearson resultando estadísticamente muy significativa con un $\alpha= 0.00$.



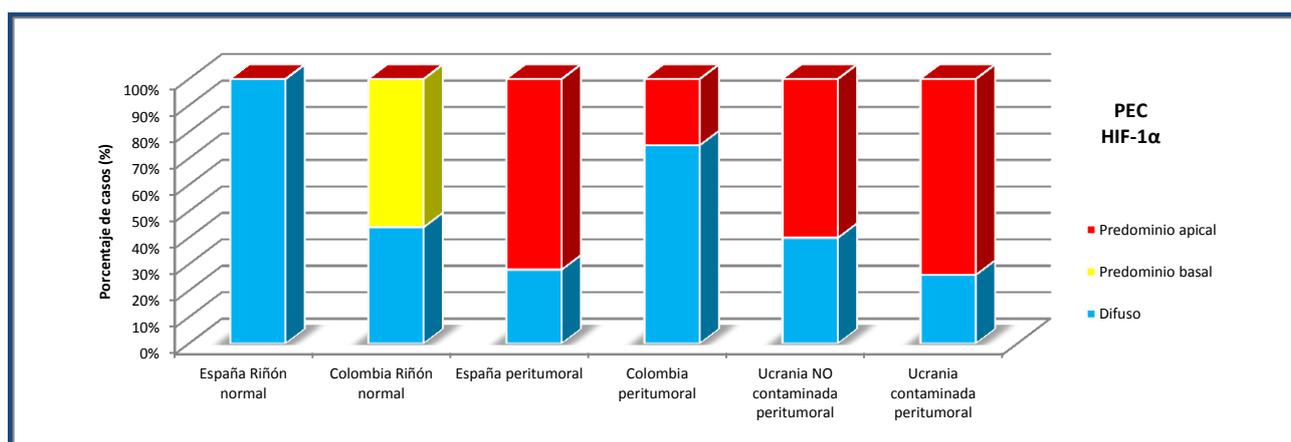
Gráfica 3.30 PEC de VEGFR-2 por grupos sin ccRCC

En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras sin ccRCC, para el VEGFR-3 se evidenció una tendencia muy diferente entre los dos subgrupos de muestras sin ccRCC del estudio. Para las muestras renales se encontró en el 100% de los casos, tanto españoles como colombianos un patrón difuso; en ningún caso se observó un PEC con predominio (basal-apical). Para las muestras peritumorales se observó una tendencia donde en un intervalo del 44% al 80% de los casos en los grupos mostraban un predominio apical, el resto de casos evidenciaron un patrón difuso y en ningún caso con predominio basal. En el grupo Ucraniano de la zona contaminada se observó un ligero incremento en el número de casos con un patrón difuso % y la diferencia con los otros tres grupos peritumorales muestra una diferencia estadísticamente significativa (gráfica 3.31). También, la diferencia mostrada en las tendencias de los PEC, entre los dos tipos de muestras sin ccRCC, se analizaron con la prueba del Chi-cuadrado de Pearson resultando una diferencia estadística muy significativa con un $\alpha= 0.00$.



Gráfica 3.31 PEC de VEGFR-3 por grupos sin ccRCC

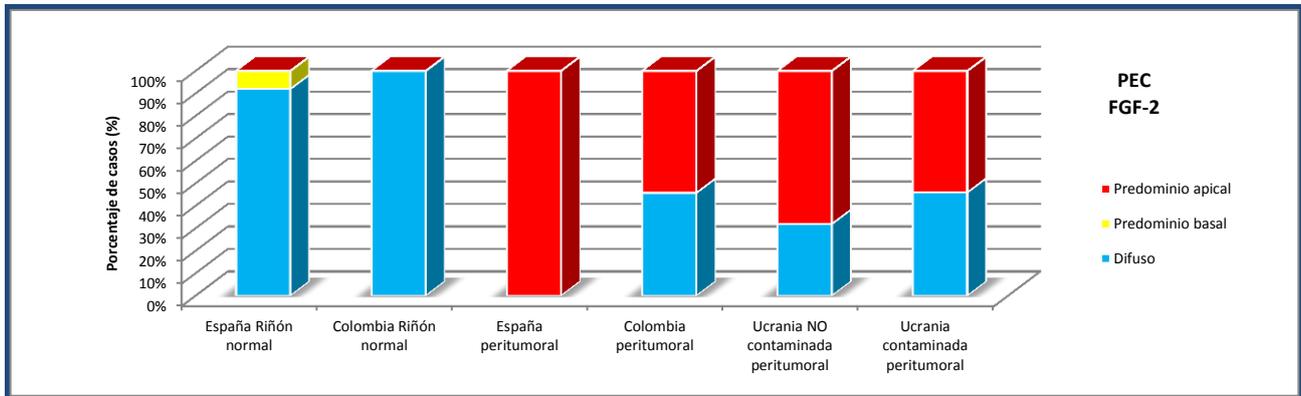
En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras sin ccRCC, para el HIF-1 α se observó una tendencia muy diferente entre los dos subgrupos de muestras sin ccRCC del estudio. Para las muestras peritumorales se observó una tendencia donde los tres grupos europeos mostraban un patrón con predominio apical de más del 60 % y el grupo peritumoral de Colombia mostró un patrón difuso en el 76% de sus casos, en ningún caso mostraron PEC de predominio basal. Para las muestras renales normales, el no poseer casos con predominio apical fue la tendencia distintiva con las muestras peritumorales; sin embargo, se evidenció gran diferencia entre el 100% de casos con patrón difuso de los casos de España y el 56% con predominio basal de los casos procedentes de Colombia (gráfica 3.32). La diferencia intergrupos peritumorales mostró significancia estadística entre los grupos europeos y el grupo suramericano. También la diferencia mostrada en las tendencias de los PEC, entre los dos tipos de muestras sin ccRCC y las evidenciadas entre los grupos de muestras renales normales, se analizaron con la prueba del Chi-cuadrado de Pearson resultando estadísticamente muy significativa con un $\alpha= 0.00$.



Gráfica 3.32 PEC de HIF-1 α por grupos sin ccRCC

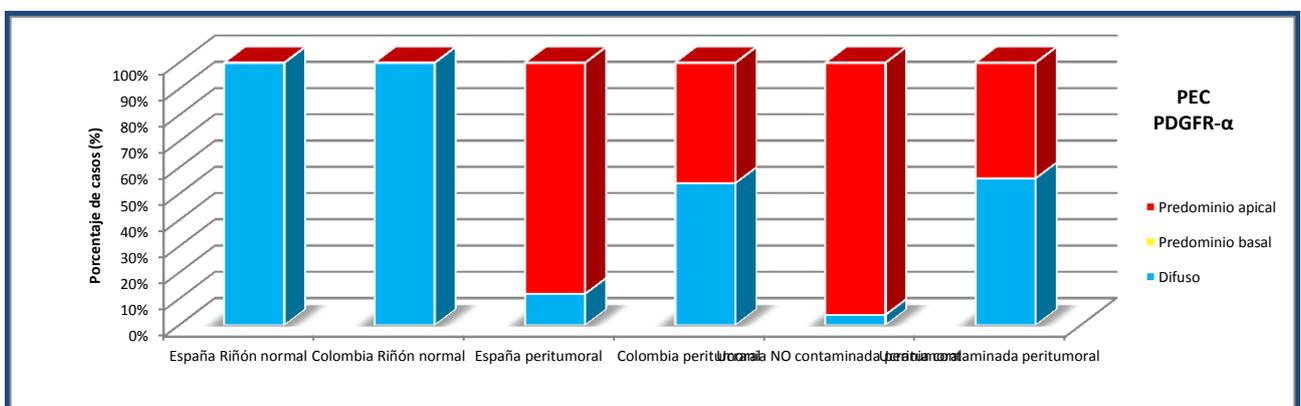
En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras sin ccRCC, para el FGF2 se observó una tendencia muy diferente entre los dos subgrupos de las muestras sin ccRCC. Para las muestras peritumorales se observó que en los cuatro subgrupos había un patrón con predominio apical, el español con un 100% de sus casos mientras que los otros grupos en un intervalo entre 52 al 68% de casos; en ningún caso mostraron patrón con predominio basal. Para las muestras control se evidenció una tendencia donde más del 90% de los casos poseen un patrón difuso y un 8% de casos, específicamente del grupo de riñones normales procedentes de España mostraron un predominio basal, y en ningún caso se observó predominio apical (gráfica 3.33). La diferencia intergrupos peritumorales mostró significancia estadística entre el grupo Español y el resto de grupos. También la diferencia mostrada en las tendencias de los PEC, entre los dos tipos de muestras

sin ccRCC, se analizaron con la prueba del Chi-cuadrado de Pearson resultando estadísticamente muy significativa con un $\alpha= 0.00$.



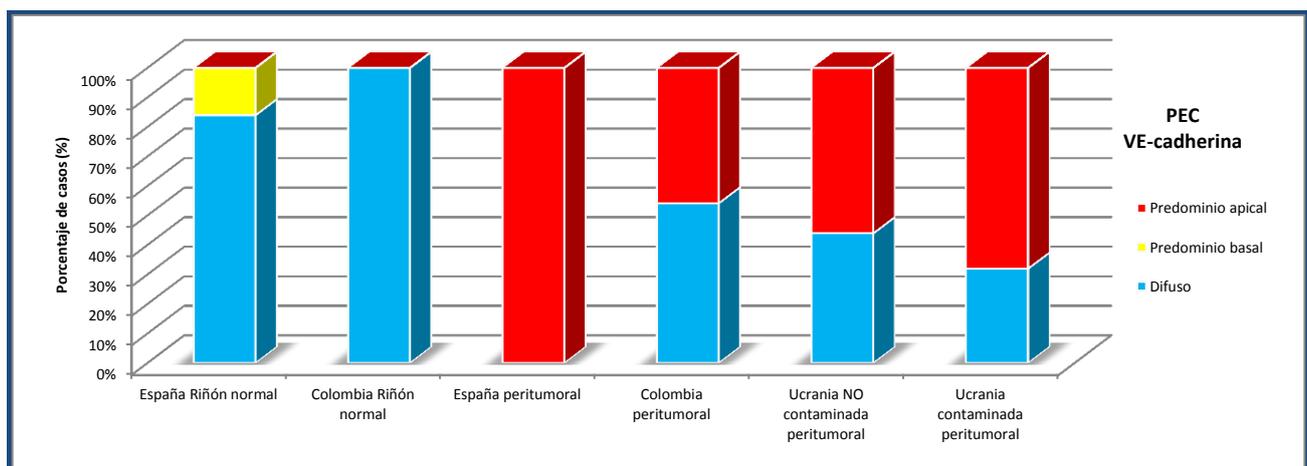
Gráfica 3.33 PEC de FGF-2 por grupos sin ccRCC

En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras sin ccRCC, para el PDGFR- α se observó una tendencia muy diferente entre los dos subgrupos sin ccRCC del estudio. Para las muestras peritumorales se observó en dos grupos un patrón difuso en 56% de sus casos (Colombia y Ucrania contaminada), mientras que en los otros dos grupos (España y Ucrania zona limpia) mostraban un predominio apical en 88% y 96% de sus casos respectivamente, el español en un 100% de sus casos mientras que los otros grupos en un intervalo entre 52 al 68% de casos; en ningún caso mostraron patrón con predominio basal. Para el grupo control se evidenció que el 100% de los casos evidenciaron un patrón difuso, y en ningún caso se observó un patrón con predominio apical ó basal (gráfica 3.34). La diferencia intergrupos peritumorales mostró significancia estadística. También la diferencia mostrada en las tendencias de los PEC, entre los dos tipos de muestras sin ccRCC, se analizaron con la prueba del Chi-cuadrado de Pearson resultando estadísticamente muy significativa con un $\alpha= 0.00$.



Gráfica 3.34 PEC de PDGFR- α por grupos sin ccRCC

En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras sin ccRCC, para la VE-cadherina se observó una tendencia muy diferente entre los dos subgrupos sin ccRCC del estudio. Para las muestras peritumorales se observó una tendencia donde el grupo procedente de Colombia mostró un 56% de sus casos con un patrón difuso y los grupos europeos (España y ambas zonas de Ucrania) mostraron un predominio apical de su expresión, el Español en un 100% de sus casos, mientras los otros dos grupos mostraron el mencionado patrón en 56 a 68 % de casos; en ningún caso mostraron patrón con predominio basal. Para las muestras renales normales se evidenció una tendencia donde más del 80% de los casos poseen un patrón difuso y un 16% de casos, específicamente del grupo de riñones normales procedentes de España mostró un patrón con predominio basal, y en ningún caso se observó predominio apical (gráfica 3. 53). La diferencia intergrupos peritumorales mostró significancia estadística entre el grupo Español y el resto de grupos. También la diferencia mostrada en las tendencias de los PEC, entre los dos tipos de muestras sin ccRCC, se analizaron con la prueba del Chi-cuadrado de Pearson resultando estadísticamente muy significativa con un $\alpha= 0.00$.



Gráfica 3.35 PEC de HIF-1 α por grupos sin ccRCC

Para los resultados del patrón de expresión celular de muestras con ccRCC, en el grupo de España encontramos 25 de los casos (100%) con un patrón periférico para la expresión del VEGFR-2 y la VE-cadherina; para la expresión de VEGFR-1 y el PDGFR-2 en 18 de los casos (72%) observamos un patrón periférico y en 7 de los casos (28%) difuso; para el VEGFR-3 en 23 de los casos (92%) se observó un patrón periférico y en 2 de los casos (8%) difuso; para el FGF-2 en 22 de los casos (88%) el patrón fue periférico y en 3 de los casos (12%) difuso; para la expresión de HIF-1 en 21 de los casos (84%) se observó un patrón difuso y en 4 de los casos (16%) fue periférico; y para el VEGF en 20 de los casos (80%) se observó un patrón periférico y en 5 de los casos (20%) fue difuso (tabla 3.9).

En el grupo de muestras tumorales de Colombia encontramos 24 de los casos (100%) con un patrón periférico para la expresión del FGF-2, el VEGFR-1, el VEGFR-2, el HIF-1 y la VE-cadherina; para el VEGF y el PDGFR-2 en 23 de los casos (96%) se observó un patrón periférico y en 1 caso (4%) fue difuso; y para el VEGFR-3 en 19 de los casos (79%) se observó patrón periférico y en 5 de los casos (21%) fue difuso (tabla 3.9).

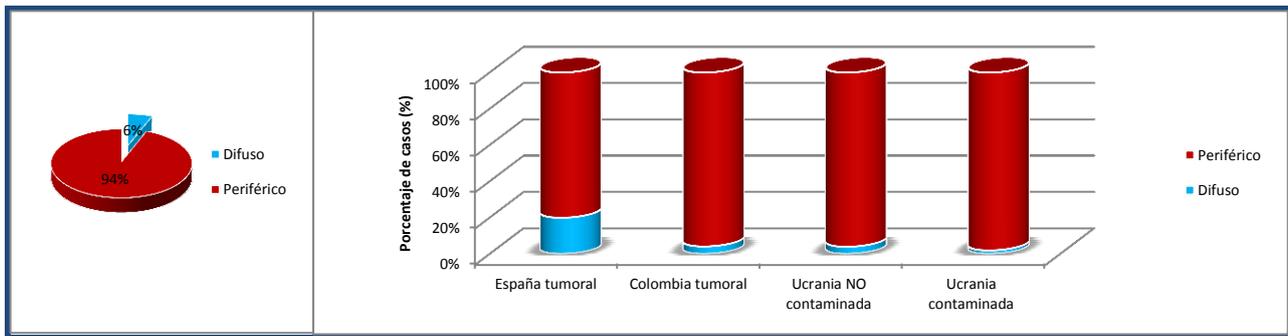
En el grupo de muestras tumorales procedentes de la zona limpia de Ucrania encontramos 25 de los casos (100%) con un patrón periférico para la expresión del FGF-2 y el VEGFR-2; para la expresión del VEGF y el VEGFR-1 en 24 de los casos (96%) observamos un patrón periférico y 1 caso (4%) fue difuso; para el VEGFR-3 y la VE-cadherina en 23 de los casos (92%) se observó un patrón periférico y en 2 de los casos (8%) fue difuso; para el HIF-1 en 19 de los casos (76%) se observó un patrón periférico y en 6 de los casos (24%) fue difuso; y para el PDGFR-2 en 21 de los casos (84%) se observó un patrón periférico y en 4 de los casos (16%) fue difuso (tabla 3.9).

En el grupo de muestras tumorales procedentes de la zona contaminada de Ucrania encontramos 50 de los casos (100%) con un patrón periférico para la expresión del VEGFR-1 y el VEGFR-2; para la expresión del VEGF y el FGF-2 en 49 de los casos (98%) observamos un patrón periférico y 1 caso (2%) fue difuso; para el VEGFR-3 en 47 de los casos (94%) se observó un patrón periférico y en 3 de los casos (6%) fue difuso; para el PDGFR-2 en 46 de los casos (92%) se observó un patrón periférico y en 4 de los casos (8%) fue difuso; para el HIF-1 en 45 de los casos (90%) se observó un PEC periférico y en 5 de los casos (10%) fue difuso y para la VE-cadherina en 35 de los casos (70%) se observó un patrón periférico y en 15 de los casos (30%) fue difuso (tabla 3.9)

Factor	PEC	España tumoral	Colombia tumoral	Ucrania NO contaminada Tumoral	Ucrania contaminada Tumoral
VEGF	Difuso	5 (20%)	1 (4%)	1 (4%)	1(2%)
	Periférico	20 (80%)	23 (96%)	24 (96%)	49 (98%)
VEGFR-1	Difuso	7 (28%)	-	1 (4%)	-
	Periférico	18 (72%)	24 (100%)	24 (96%)	50 (100%)
VEGFR-2	Difuso	-	-	-	-
	Periférico	25 (100%)	24 (100%)	25 (100%)	50 (100%)
VEGFR-3	Difuso	2 (8%)	5 (21%)	2 (8%)	3 (6%)
	Periférico	23 (92%)	19 (79%)	23 (92%)	47 (94%)
HIF	Difuso	21 (84%)	-	6 (24%)	5 (10%)
	Periférico	4 (16%)	24 (100%)	19 (76%)	45(90%)
FGF-2	Difuso	3 (12%)	-	-	1 (2%)
	Periférico	22 (88%)	24 (100%)	25 (100%)	49 (98%)
PDGFR-2	Difuso	7 (28%)	1(4%)	4 (16%)	4 (8%)
	Periférico	18 (72%)	23 (96%)	21 (84%)	46 (92%)
VE-CAD	Difuso	-	-	2 (8%)	15 (30%)
	Periférico	25 (100%)	24(100%)	23 (92%)	35 (70%)

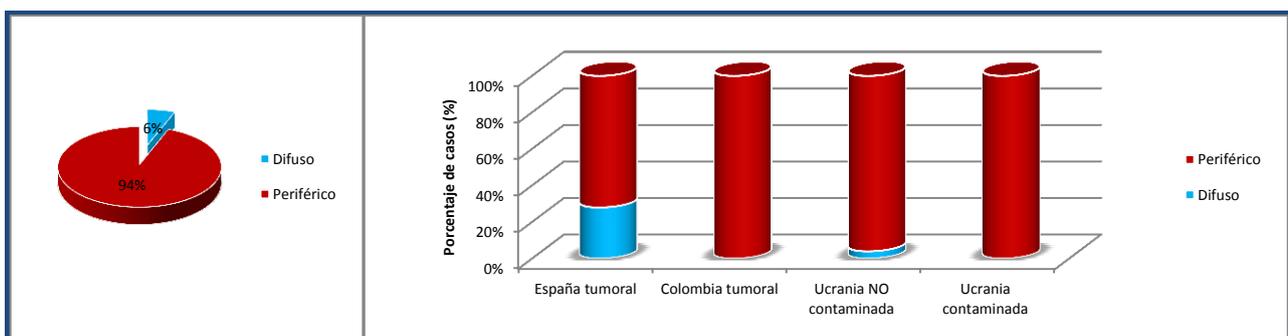
Tabla 3.9 Distribución porcentual del patrón de expresión celular PEC en ccRCC

En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras con ccRCC, para el VEGF observamos un homogéneo predominio del patrón de expresión celular periférico en todos los grupos tumorales. Un 91,5 % de casos tumorales en el estudio mostraron un PEC periférico (gráfica 3.36). En el grupo de muestras tumorales de España se observó un 20% de casos con PEC difuso y en los demás grupos no se observó más de 2 casos (8%) con el patrón difuso (gráfica 3.37).



Gráfica 3.36 PEC de VEGF en ccRCC Gráfica 3.37 PEC de VEGF por grupos con ccRCC

En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras con ccRCC, para el VEGFR-1 observamos un homogéneo predominio del patrón de expresión celular periférico en todos los grupos tumorales. Un 92 % de casos tumorales en el estudio mostraron un PEC periférico (gráfica 3.38). En el grupo de muestras tumorales de España se observó un 20% de casos con patrón difuso y en los demás grupos no se observó más de 1 caso (4%) con el patrón difuso (gráfica 3.39).

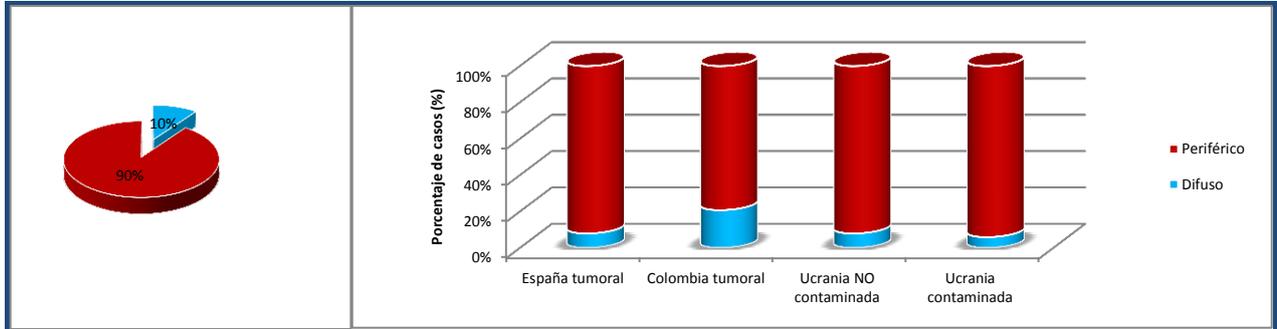


Gráfica 3.38 PEC de VEGFR-1 en ccRCC Gráfica 3.39 PEC de VEGFR-1 por grupos con ccRCC

En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras con ccRCC, para el VEGFR-2 observamos un homogéneo predominio del patrón de expresión celular periférico en todos los grupos tumorales. Un 100 % de casos tumorales en el estudio mostraron un PEC periférico.

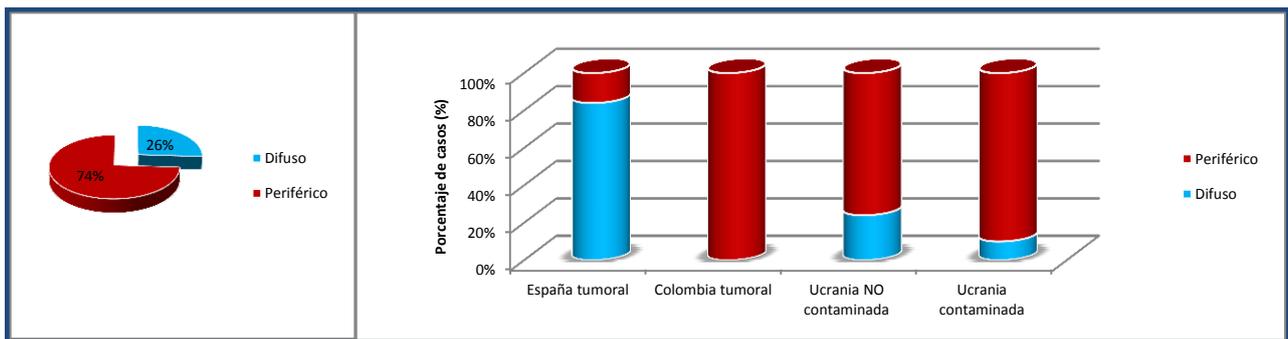
En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras con ccRCC, para el VEGFR-3 observamos un homogéneo predominio del patrón de expresión celular periférico en todos

los grupos tumorales. Un 88,5 % de casos tumorales en el estudio mostraron un patrón periférico (gráfica 3.40). En el grupo de muestras tumorales de Colombia se observó un 24% de casos con patrón difuso y en los demás grupos no se observó más de 2 casos (8%) con ese patrón (gráfica 3.41).



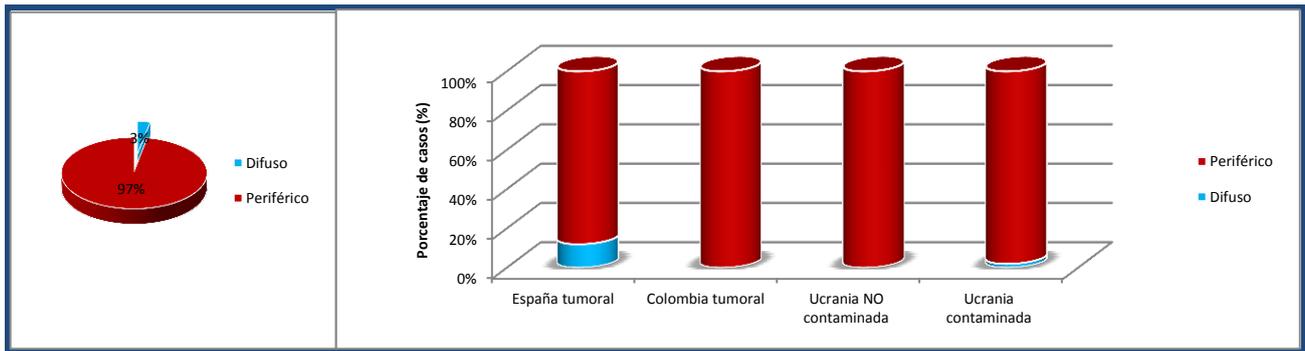
Gráfica 3.40 PEC de VEGFR-3 en ccRCC Gráfica 3.41 PEC de VEGFR-3 por grupos con ccRCC

En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras con ccRCC, para el HIF-1 α observamos un homogéneo predominio del patrón de expresión celular periférico en tres de los grupos tumorales, solo en el grupo tumoral español predominó el patrón difuso. Un 69,5 % de casos tumorales en el estudio mostraron un PEC periférico (gráfica 3.42). En el grupo de muestras tumorales de España se observó un 84% de casos con patrón difuso y en los demás grupos no se observó más de 6 casos (24%) con dicho patrón (gráfica 3.43). La diferencia entre el grupo tumoral español con el resto de grupos tumorales, por la prueba estadística de Chi-cuadrado de Pearson resultó estadísticamente significativa con un $\alpha=0,00$.



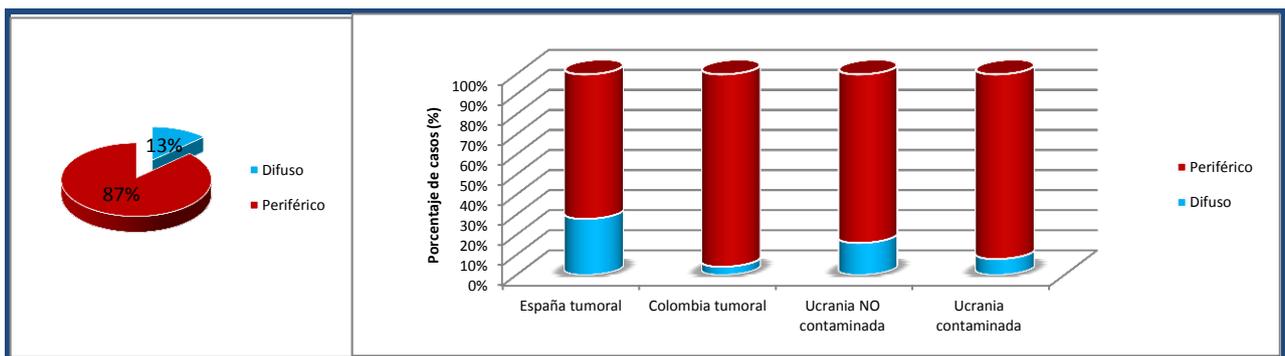
Gráfica 3.42. PEC de HIF-1 α en ccRCC Gráfica 3.43. PEC de HIF-1 α por grupos con ccRCC

En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras con ccRCC, para el FGF-2 observamos un homogéneo predominio del patrón de expresión celular periférico en todos los grupos tumorales. Un 97% de casos tumorales en el estudio mostraron un patrón periférico (gráfica 3.44). En el grupo de muestras tumorales de España se observó un 12% de casos con patrón difuso y en los demás grupos no se observó más de 1 caso con ese patrón (gráfica 3.45).



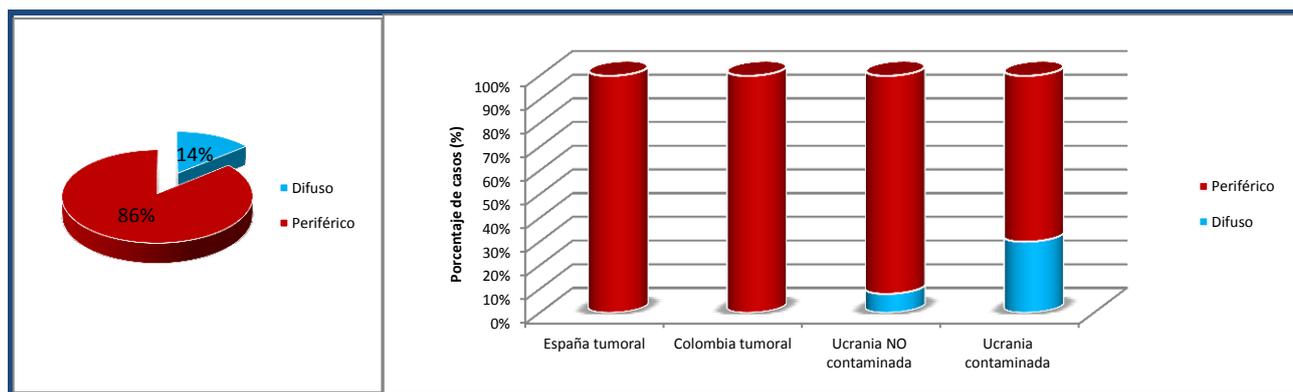
Gráfica 3.44 PEC de FGF-2 en ccRCC Gráfica 3.45 PEC de FGF-2 por grupos con ccRCC

En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras con ccRCC, para el PDGFR-2 observamos un homogéneo predominio del patrón de expresión celular periférico en todos los grupos tumorales. Un 85 % de casos tumorales en el estudio mostraron un patrón periférico (gráfica 3.46). En el grupo de muestras tumorales de España se observó un 28% de casos con patrón difuso y en los demás grupos no se observó más de 4 casos (16%) con dicho patrón (gráfica 3.47).



Gráfica 3.46. PEC de PDGFR en ccRCC Gráfica 3.47. PEC de PDGFR por grupos con ccRCC

En los resultados de los patrones de expresión celular de los grupos de muestras con ccRCC, para la VE-cadherina observamos un homogéneo predominio del patrón de expresión celular periférico en todos los grupos tumorales. Un 90,5 % de casos tumorales en el estudio mostraron un patrón periférico (gráfica 3.48). En el grupo de muestras tumorales de la zona contaminada de Ucrania se observó un 30% de casos con patrón difuso y en los demás grupos no se observó más de 2 casos (8%) con dicho patrón (gráfica 3.49).



Gráfica 3.48 PEC de VE-cadherina en ccRCC Gráfica 3.49 PEC de VE-cadherina por grupos con ccRCC

3.1.3 Correlación entre las características generales de los grupos

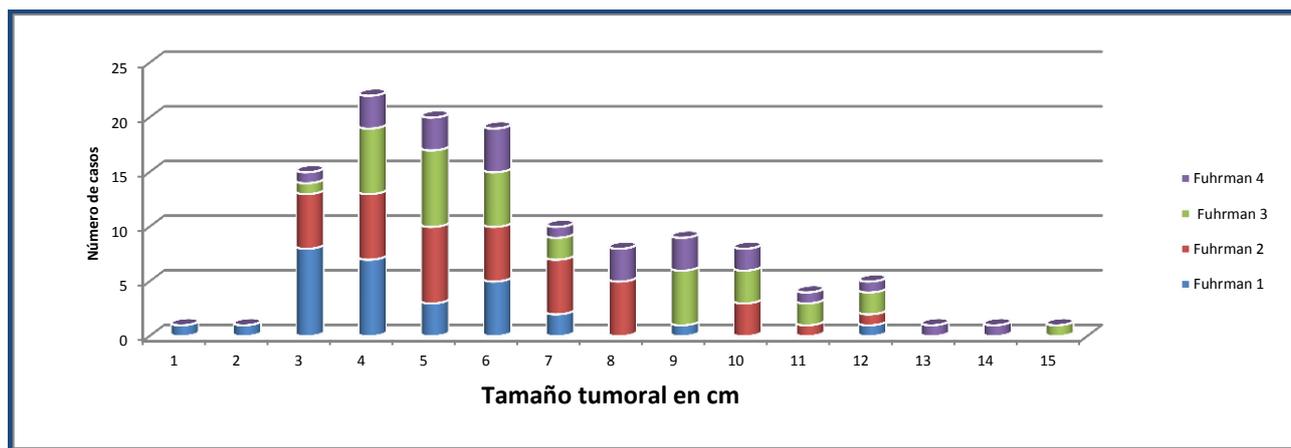
3.1.3.1 Tamaño tumoral por grado nuclear de Fuhrman

Al estudiar el grado nuclear de Fuhrman en todos los tumores encontramos que en el grado (1) el tamaño tumoral medio fue de 4,66 cm; de 6,11 para el grado (2); de 7,24 para el (3) y de 7,58 para el (4). En el grupo español fue, expresado en centímetros, de 4,43 para el grado (1); de 5,78 para el grado (2); de 6,43 para el (3) y 6,50 para el (4). En el grupo colombiano fue de 4,63 para el grado (1); de 7,27 para el grado (2); de 13,67 para el (3) y de 10,67 para el (4). En el grupo de la zona limpia de Ucrania fue de 4 para el grado (1); de 3,5 para el grado (2); 6,71 para el (3) y de 5,43 para el (4). Y en el grupo de la zona contaminada de Ucrania fue de 6,20 para el grado (1); de 5,81 para el grado (2); de 6,65 para el (3) y de 8,25 para el (4) (tabla 3.10).

Grado nuclear de Fuhrman	Tamaño tumoral medio			
	España	Colombia	Ucrania Zona limpia	Ucrania Zona contaminada
1	4,43	4,63	4	6,20
2	5,78	7,27	3,5	5,81
3	6,43	13,67	6,71	6,65
4	6,50	10,67	5,43	8,25

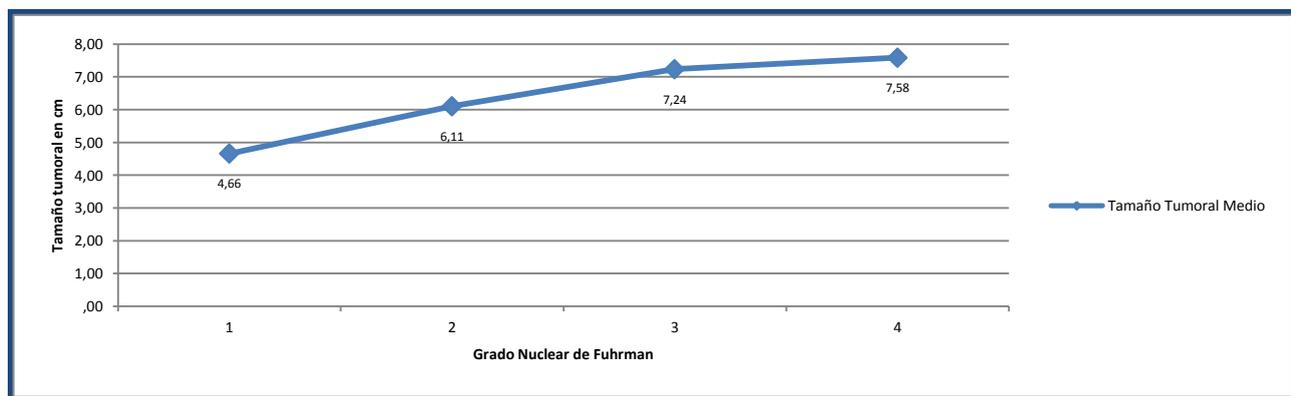
Tabla 3.10 Tamaño tumoral medio en grado nuclear por grupo, expresado en centímetros

Se observa una tendencia en el grupo en general, que a mayor tamaño tumoral es más fácil encontrar grados de Fuhrman más altos, de una asociación lineal de 15.9 con una significancia estadística de $\alpha=0.00$ (gráfica 3.50).

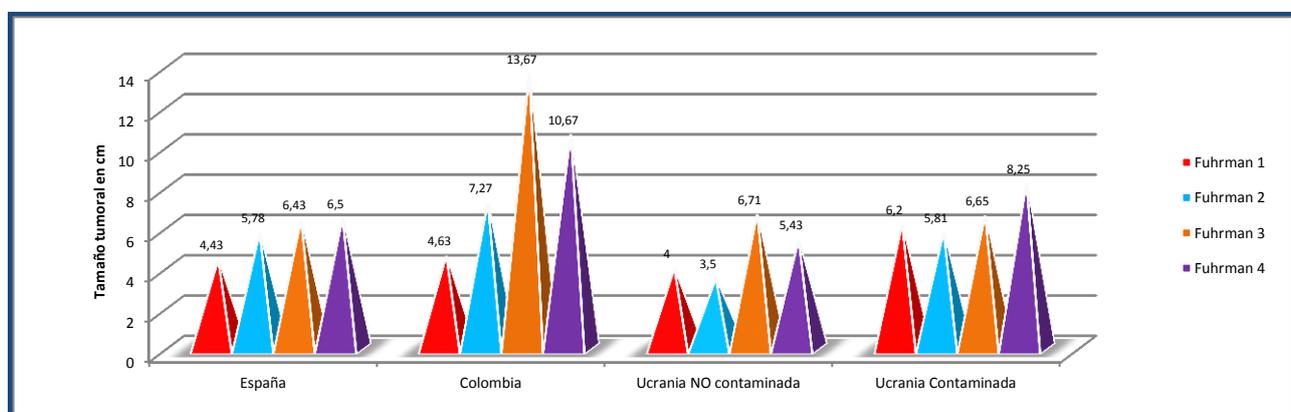


Gráfica 3.50 Distribución de grados de Fuhrman por tamaño tumoral

Observamos tanto en la población total de estudio (gráfica 3.51), como en cada grupo, mayor media de tamaño tumoral entre más alto es el grado nuclear del carcinoma. La diferencia de medias entre los grados 1 y 4 fue más evidente en los grupos de Colombia y de la zona contaminada de Ucrania, 6 y 3 cm respectivamente (gráfica 3.52). Al realizar el análisis de varianzas ANOVA la diferencias de tamaño tumoral por grado nuclear resultó estadísticamente significativa $\alpha=0.00$.



Gráfica 3.51 Tamaño tumoral medio en grados de Fuhrman



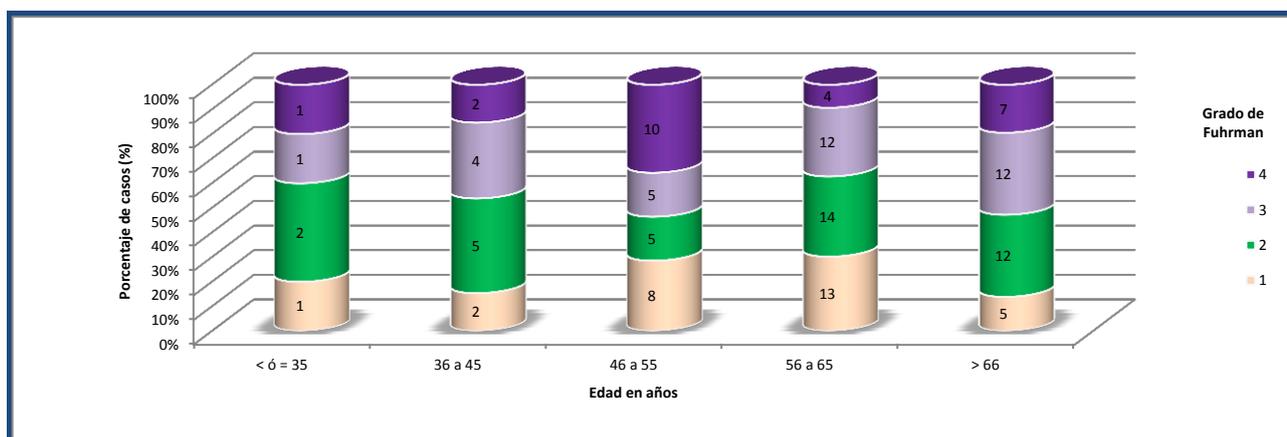
Gráfica 3.52 Tamaño tumoral medio en grados de Fuhrman por grupo

3.1.3.2 Grado nuclear de Fuhrman por nivel de edad

En 4 de los niveles de edad la mayoría de los casos fueron clasificados con un grado nuclear de Fuhrman 2 y 3, solo en el nivel de 46 a 55 años, se obtuvo una mayor cantidad de casos con un Fuhrman de 4 y 1 (tabla 3.11 y gráfica 3.53); estas diferencias resultaron estadísticamente no significantes y fueron analizadas por la prueba del Chi-cuadrado de Pearson, con un $\alpha=0,380$.

Edad en años	Grado nuclear de Fuhrman				Total
	1	2	3	4	
< ó = 35	1	2	1	1	5
36 a 45	2	5	4	2	13
46 a 55	8	5	5	10	28
56 a 65	13	14	12	4	43
>66	5	12	12	7	36
Total	29	56	27	13	125

Tabla 3.11 Media de vasos totales/género por grupo



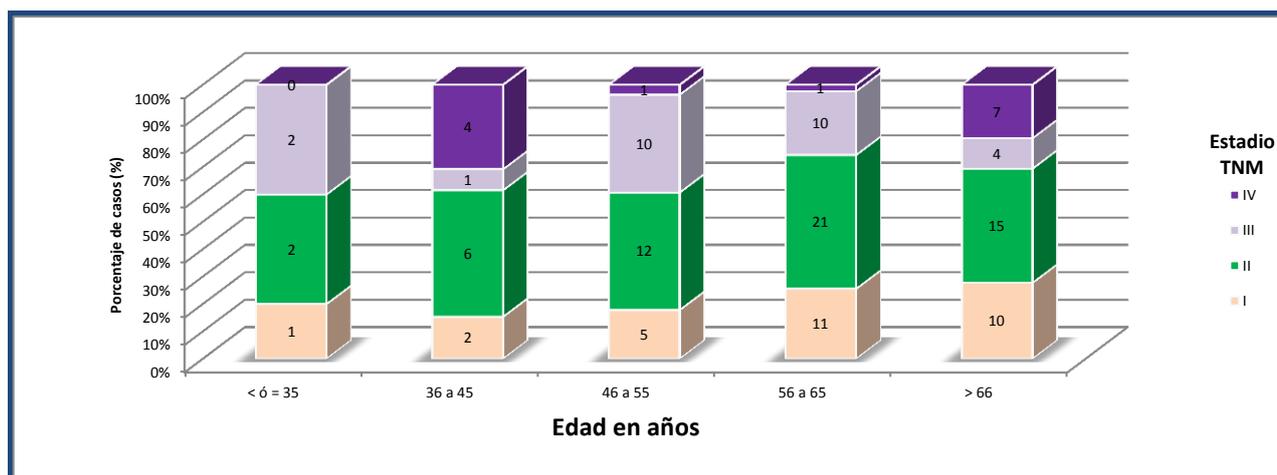
Gráfica 3.53 Porcentaje de distribución de grado de Fuhrman por niveles de edad

3.1.3.3 Estadio TNM por nivel de edad

En 4 de los niveles de edad la mayoría de los casos fueron clasificados en un estadio TNM II, solo en el nivel para menores de 35 años se obtuvo una mayor cantidad de casos con un estadio TNM III (tabla 3.12 y gráfica 3.54); estas diferencias resultaron estadísticamente no significantes y fueron analizadas por la prueba del Chi-cuadrado de Pearson, con un $\alpha=0,061$.

Edad en años	Estadio TNM				Total
	I	II	III	IV	
< ó = 35	1	2	2	0	5
36 a 45	2	6	1	4	13
46 a 55	5	12	10	1	28
56 a 65	11	21	10	1	43
>66	10	15	4	7	36
Total	29	56	27	13	125

Tabla 3.12 Media de vasos totales/género por grupo



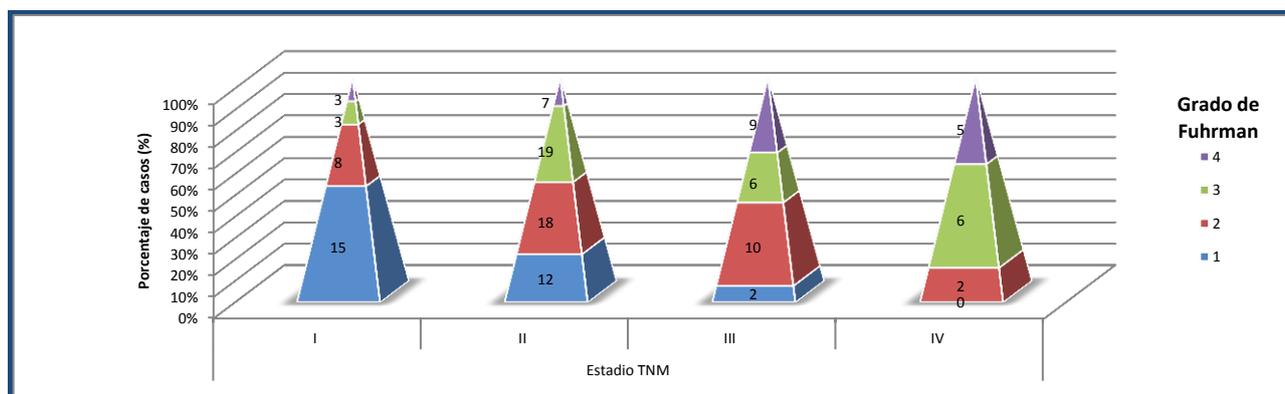
Gráfica 3.54 Porcentaje de distribución de estadios TNM por niveles de edad

3.1.3.4 Grado nuclear de Fuhrman por estadio TNM

En el estadio TNM I, 51% de los casos fueron clasificados con grado de Fuhrman 1; para el estadio II predominaron los grados 2 y 3 con un 32 y 34% de casos respectivamente; en el estadio III los grados 2 y 4 con un 37 y 33% de casos respectivamente y en el estadio IV los grados 3 y 4 con un 46 y 38% de casos respectivamente (tabla 3.13 y gráfica 3.55); estas diferencias, analizadas por la prueba del Chi-cuadrado de Pearson, resultaron estadísticamente muy significativas con un $\alpha=0,000$.

		Estadio TNM				Total
		I	II	III	IV	
Grado nuclear de Fuhrman	1	15	12	2	0	29
	2	8	18	10	2	38
	3	3	19	6	6	34
	4	3	7	9	5	24
Total		29	56	27	13	125

Tabla 3.13 Media de vasos totales/género por grupo



Gráfica 3.55 Media de vasos totales/género por grupo

3.1.4 Relación entre las características generales y los mecanismos de angiogénesis

3.1.4.1 Media del total de vasos por género

En los casos de riñón normal femeninos, la media del total de vasos fue de 520 y de 481 vasos en los masculinos. En los casos femeninos españoles fue de 482 y en los colombianos de 559 vasos; en los casos masculinos españoles fue de 442 y en los colombianos de 519.

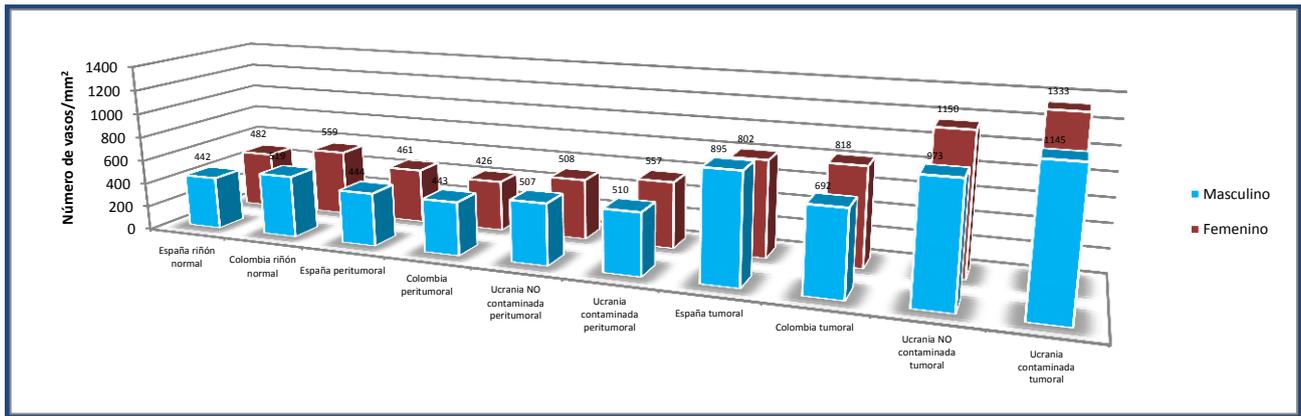
En las muestras peritumorales, la media total de vasos de los casos femeninos fue de 488 y de 476 vasos en los masculinos. En los casos femeninos españoles fue de 461; en colombianos de 426 vasos; en ucranianos de la zona limpia 508 y en los de la zona contaminada 557. En los casos masculinos españoles fue de 444; en colombianos de 443 vasos; en ucranianos de la zona limpia 507 y en los de la zona contaminada de 510.

En los casos con ccRCC femeninos, la media del total de vasos fue de 1025 y en los masculinos de 926. En los casos femeninos españoles fue de 802; en colombianos de 818 vasos; en los ucranianos de la zona limpia 1150 y en los de la zona contaminada 1333. En los casos masculinos españoles fue de 895; en colombianos de 692 vasos; en ucranianos de la zona limpia 973 y en los de la zona contaminada de 1145 (tabla 3.14).

GRUPO	MVD/mm ² en Hombres	MVD/mm ² en Mujeres
España riñón normal	442	482
Colombia riñón normal	519	559
Muestras renales normales	481	520
España peritumoral	444	461
Colombia peritumoral	443	426
Ucrania NO contaminada peritumoral	507	508
Ucrania contaminada peritumoral	510	557
Muestras peritumorales	476	488
España tumoral	895	802
Colombia tumoral	692	818
Ucrania NO contaminada tumoral	973	1150
Ucrania contaminada tumoral	1145	1333
Muestras tumorales	926	1025

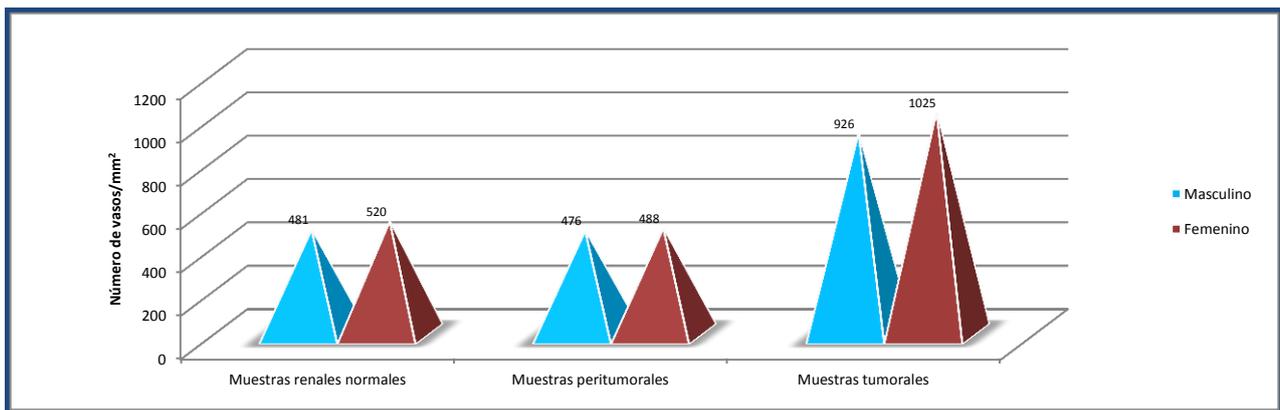
Tabla 3.14 Media de vasos totales por género por grupo

La relación obtenida entre las variables género y media de vasos, mostró una leve diferencia de la media del total de vasos a favor del sexo femenino en casi todos los grupos, a excepción del grupo peritumoral español, siendo a favor de los hombres (gráfica 3.56). En los casos femeninos ucranianos la diferencia fue ligeramente mayor, sin embargo, dichas diferencias en ningún caso fueron estadísticamente significativas.



Gráfica 3.56 MVD de vasos totales por género en grupos de estudio

Al agrupar por tipos de muestra se evidenció la pequeña diferencia a favor del género femenino (tabla 3.14 y gráfica 3.57), pero al analizar sus varianzas (ANOVA), dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa.



Gráfica 3.57 MVD de vasos totales por género en los tipos de muestra

3.1.4.2 Media del total de vasos por estadio TNM

En la población total tumoral del estudio para el estadio TNM I, la MVD de vasos por mm^2 fue de 941 y la de capilares de 582; de 1023 y 613 para el estadio II; de 1107 y 672 para el III y de 1021 y 611 para el IV respectivamente.

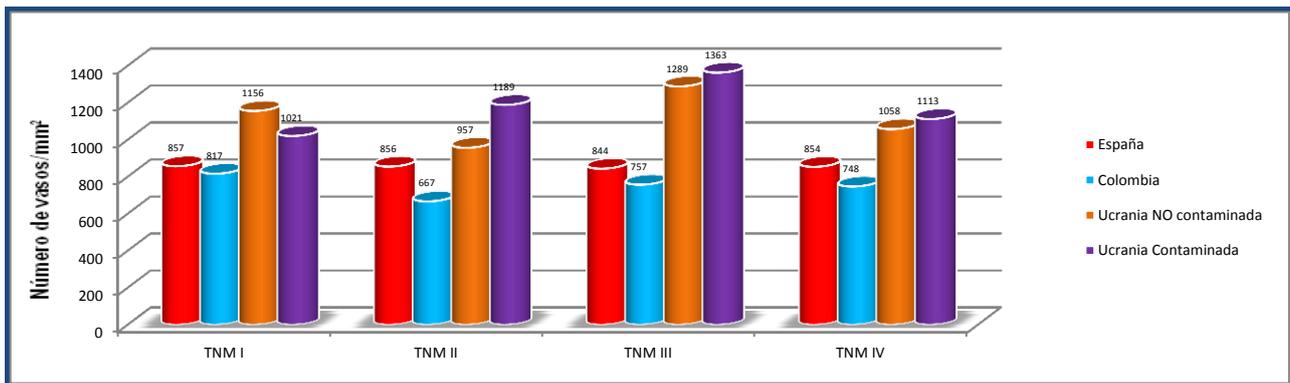
En el grupo español la MVD de vasos por mm^2 fue de 857 y la de capilares de 525 para el estadio I; de 856 y 517 para el estadio II; de 844 y 495 para el III y de 854 y 517 para el IV. En el grupo colombiano fue de 817 y 489 para el estadio I; de 667 y 359 para el estadio II; de 757 y 363 para el III y de 748 y 369 para el IV. En el grupo de la zona limpia de Ucrania fue de 1156 y 784 para el estadio I; de 957 y 541 para el estadio II; de 1289 y 751 para el III y de 1058 y 633 para el IV. En el

grupo de la zona contaminada de Ucrania fue de 1021 y 587 para el estadio I; de 1189 y 734 para el estadio II; de 1363 y 884 para el III y de 1113 y 616 para el IV respectivamente (tabla 3.16).

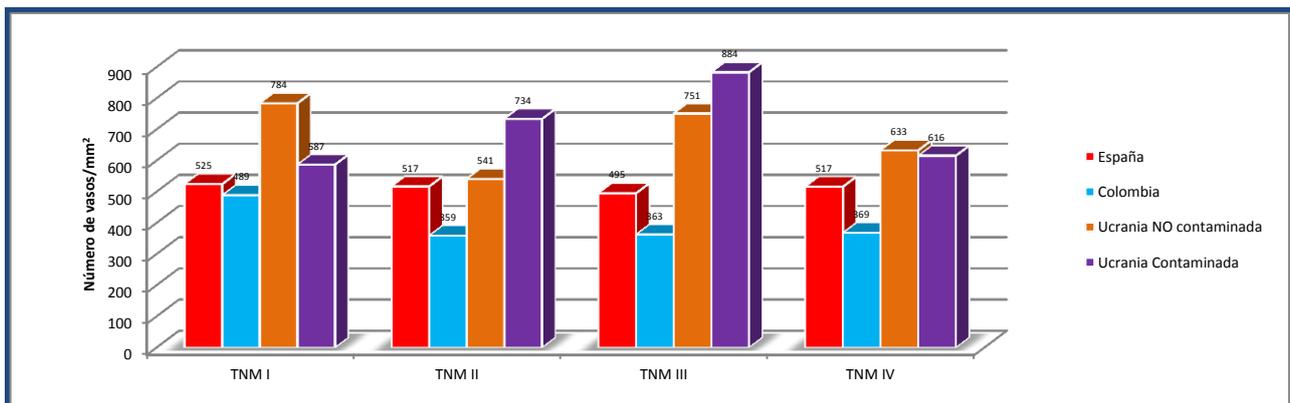
Estadio TNM	España tumoral		Colombia tumoral		Ucrania NO contaminada tumoral		Ucrania contaminada tumoral	
	X Total vasos	X Capilares	X Total vasos	X Capilares	X Total vasos	X Capilares	X Total vasos	X Capilares
I	857	525	817	489	1156	784	1021	587
II	856	517	667	359	957	541	1189	734
III	844	495	757	363	1289	751	1363	884
IV	854	517	748	369	1058	633	1113	616

Tabla 3.16 Media de vasos totales/ y capilares en estadios TNM por grupo

Se observa una tendencia de incremento de la media del total de vasos (gráfica 3.58) y en la de capilares (gráfica 3.59) para los grupos procedentes de Ucrania sobre los casos españoles y colombianos, especialmente en los estadios invasivos III y IV (gráfica 3.58 y 3.59). Sin embargo, estas diferencias según la prueba del Chi cuadrado no resultaron estadísticamente significativas.



Gráfica 3.58 MVD de vasos totales en estadios TNM por grupo



Gráfica 3.59 MVD de capilares en estadios TNM por grupo

3.1.4.3 Media del total de vasos por grado nuclear de Fuhrman

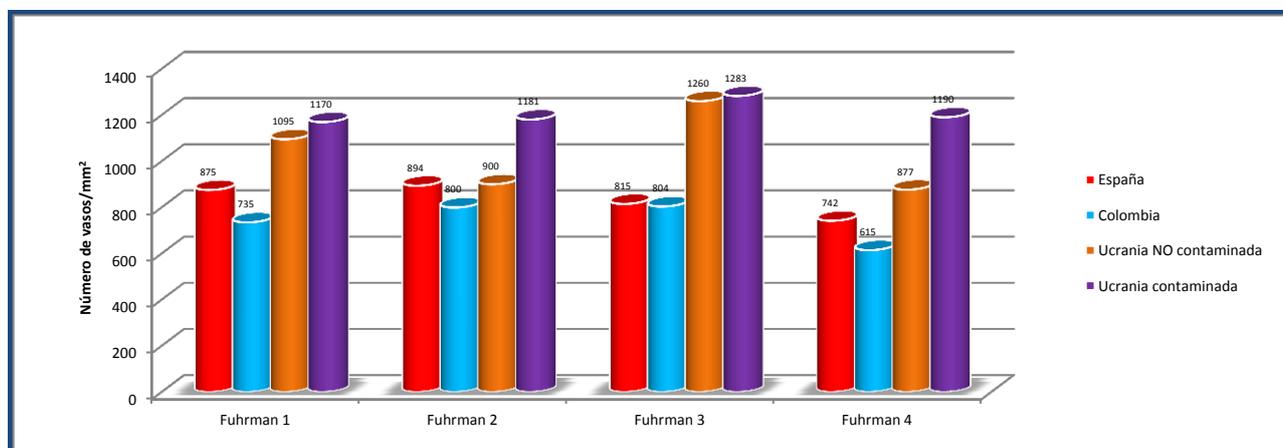
En la población tumoral del estudio para el grado de Fuhrman (1) la MVD/mm² del total de vasos fue de 950 y la de capilares de 576; de 988 y 586 para el grado (2); de 1139 y 696 para el (3), y de 990 y 568 respectivamente para el (4).

En el grupo español la MVD/mm² del total de vasos fue de 875 y la de capilares de 554 para el grado (1); de 894 y 527 para el grado (2); de 815 y 480 para el (3), y de 742 y 469 para el (4). En el grupo colombiano fue de 735 y la de capilares de 414 para el grado (1); de 800 y 417 para el grado (2); de 804 y 398 para el (3) y de 615 y 299 para el (4). En el grupo de la zona limpia de Ucrania fue de 1095 y la de capilares de 660 para el grado (1); de 900 y 575 para el grado (2); de 1260 y 762 para el (3), y de 877 y 486 para el (4). En el grupo de la zona contaminada de Ucrania fue de 1170 y la de capilares de 713 para el grado (1); de 1181 y 738 para el grado (2); de 1283 y 820 para el (3), y de 1190 y 699 respectivamente para el (4) (tabla 3.18).

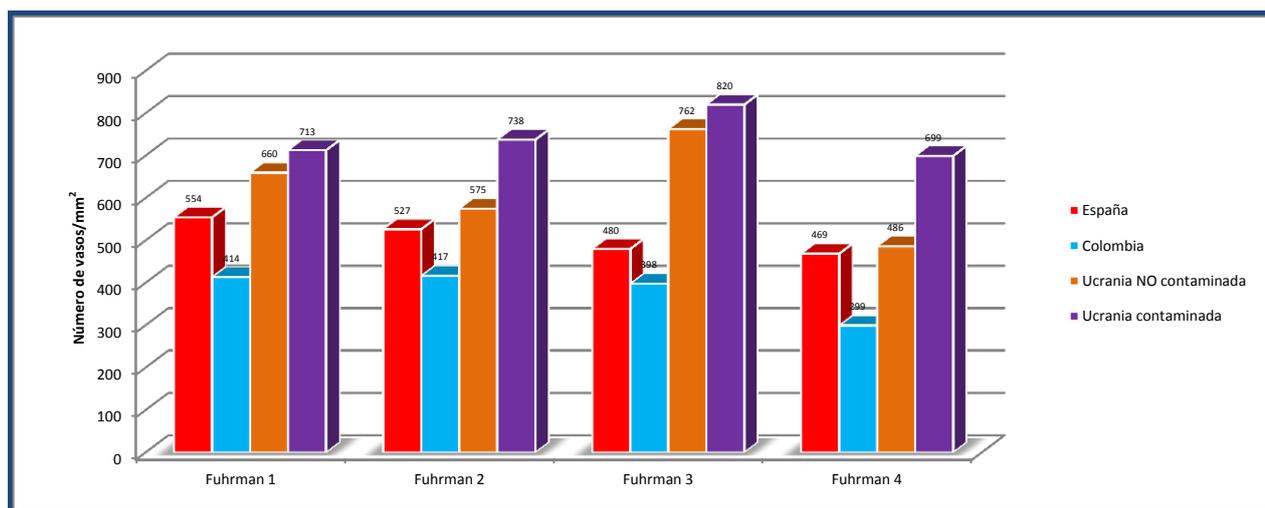
Nivel grado nuclear de Fuhrman	España Tumoral		Colombia tumoral		Ucrania NO contaminada tumoral		Ucrania contaminada tumoral	
	X Total vasos	X Capilares	X Total vasos	X Capilares	X Total vasos	X Capilares	X Total vasos	X Capilares
1	875	554	735	414	1095	660	1170	713
2	894	527	800	417	900	575	1181	738
3	815	480	804	398	1260	762	1283	820
4	742	469	615	299	877	486	1190	699

Tabla 3.17 Media de vasos totales/capilares en grado nuclear de Fuhrman por grupo

Se observa una tendencia de incremento de la media del total de vasos (gráfica 3.60) y en la de capilares (gráfica 3.61) para los grupos procedentes de Ucrania sobre los casos españoles y colombianos, especialmente en los grados 3 y 4 (gráfica 3.70 y 3.71). Sin embargo, estas diferencias según la prueba del Chi cuadrado no resultaron estadísticamente significativas $\alpha=0,315$.



Gráfica 3.60 MVD de vasos totales por grado de Fuhrman en grupos de estudio



Gráfica 3.61 MVD de capilares por grado de Fuhrman en grupos de estudio

3.1.4.4 Porcentaje de capilares por género

En los casos de riñón normal femeninos el porcentaje medio de capilares fue de 69% y en los masculinos de 73%. En los casos femeninos españoles fue de 66% y en colombianos de 72%. En los casos masculinos españoles fue de 68% y en colombianos de 77% (tabla 3.18).

En los casos peritumorales femeninos, el porcentaje medio de capilares fue de 75% y en los masculinos de 74%. En los casos peritumorales femeninos españoles fue de 78%; en colombianos de 78%; en los ucranianos de la zona limpia 75% y en los de la zona contaminada de 71%. El porcentaje medio de capilares en los casos peritumorales masculinos españoles fue de 78%; en colombianos de 70%; en ucranianos de la zona limpia 75% y en los de la zona contaminada de 73% (tabla 3.18).

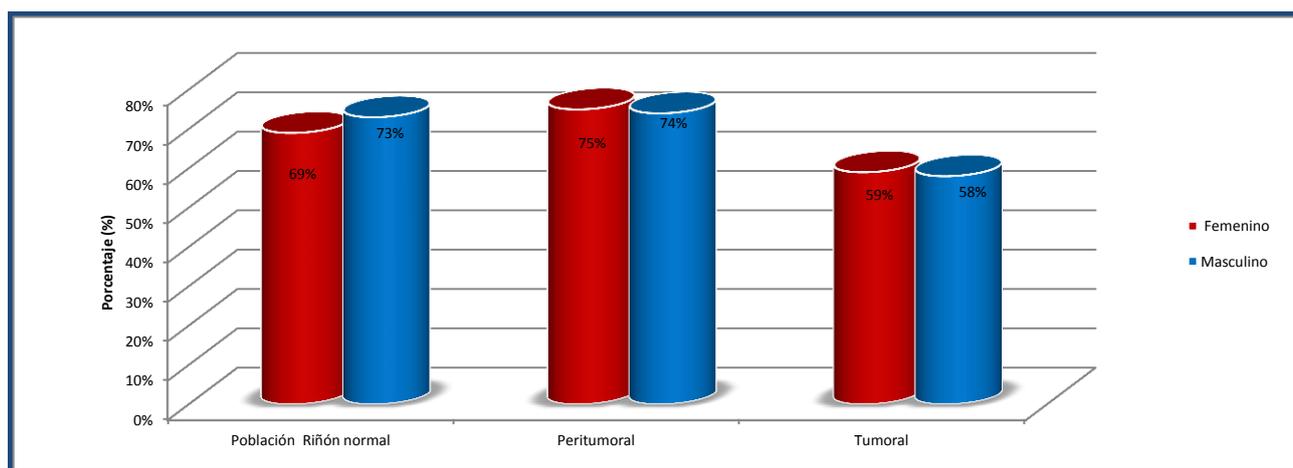
En los casos con ccRCC femeninos, el porcentaje medio de capilares fue de 59% y en los masculinos de 58%. El porcentaje medio de capilares en los casos con ccRCC femeninos españoles fue de 59%; en colombianos de 53%; en los ucranianos de la zona limpia 61% y en los de la zona contaminada de 62%. El porcentaje medio de capilares en los casos con ccRCC masculinos españoles fue de 60%; en colombianos de 52%; en los ucranianos de la zona limpia 56% y en los de la zona contaminada de 59% (tabla 3.18).

Grupo	Porcentaje de Capilares por grupo (%)	Porcentaje de Capilares en Mujeres (%)	Porcentaje de Capilares en Hombres (%)
España renal normal	66	66	68
Colombia renal normal	75	72	77
Población renal normal	70.5%	69%	73%
España peritumoral	77	78	78
Colombia peritumoral	74	78	70
Ucrania NO contaminada peritumoral	74	75	75
Ucrania Contaminada peritumoral	72	71	73
Población peritumoral	74.3%	75%	74%
España tumoral	60	59	60
Colombia tumoral	53	53	52
Ucrania NO contaminada tumoral	60	61	56
Ucrania Contaminada tumoral	62	62	59
Población tumoral	58.7%	59%	58%

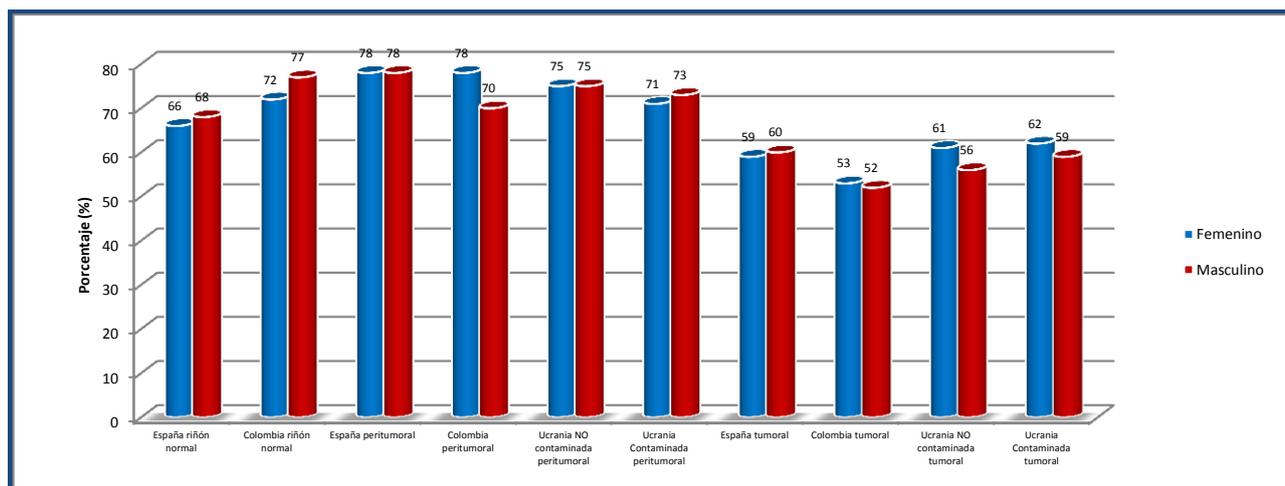
Tabla 3.18 Porcentaje de capilares en géneros por grupo

En el grupo de muestras de riñón normal se obtuvo una leve diferencia del 4% en el porcentaje de capilares entre géneros, a favor del masculino. En las muestras peritumorales y tumorales la diferencia entre géneros fue solo del 1%. Dichas diferencias sin significancia estadística (tabla 3.18 y gráfica 3.62).

En la relación del porcentaje de capilares entre géneros de cada grupo de estudio, las mayores diferencias se observaron en los grupos colombianos sin ccRCC (riñón normal y peritumoral), del 5 y 8% respectivamente y en el grupo tumoral de la zona limpia de Ucrania del 5% (gráfica 3.63). Sin embargo, sin significancia estadística.



Gráfica 3.62 Porcentaje de capilares por género en los tipos de muestra



Gráfica 3.63 Porcentaje de capilares por géneros en grupos de estudio

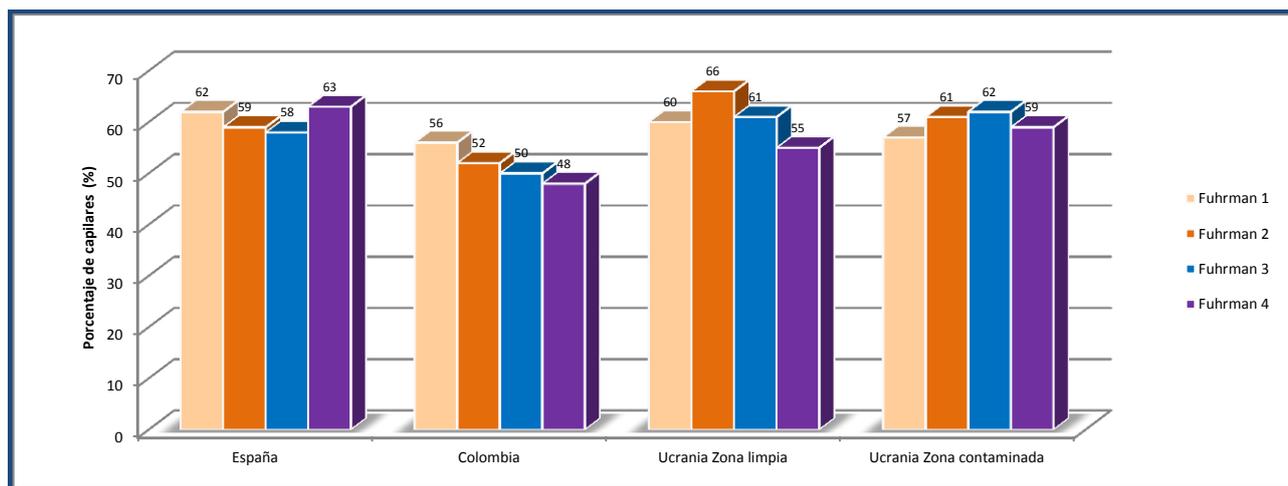
3.1.4.5 Porcentaje medio de capilares por grado nuclear de Fuhrman

En la población tumoral del estudio para el grado Fuhrman (1) el porcentaje medio de capilares fue de 59%; 58% para el grado (2); 60% para el (3) y de 57% para el (4). En el grupo español fue de 62% para el grado Fuhrman (1); 59% para el grado (2); 58% para el (3) y 63% para el (4). En el grupo colombiano fue de 56% para el grado (1); 52% para el grado (2); 50% para el (3) y de 53% para el (4). En el grupo de la zona limpia de Ucrania fue de 60% para el grado (1); 66% el grado (2); 61% el (3) y de 55% para el (4). En el grupo de la zona contaminada de Ucrania fue de 57% para el grado (1); de 61% el grado (2); de 62% el (3) y de 59% para el (4) (tabla 3.19).

Grado nuclear de Fuhrman	Porcentaje de capilares (%)			
	España	Colombia	Ucrania Zona limpia	Ucrania Zona contaminada
1	62	56	60	57
2	59	52	66	61
3	58	50	61	62
4	63	48	55	59

Tabla 3.19 Porcentaje de capilares en grado nuclear por grupo

En el grupo colombiano se observó una disminución leve y secuencial del porcentaje de capilares de acuerdo al mayor grado nuclear. En el grupo español se obtuvo una disminución solo en los grados 2 y 3, mientras que en los Grupos ucranianos en eso mismos grados se aumentó ligeramente el porcentaje de capilares (gráfica 3.64).



Gráfica 3.64 Porcentaje de capilares por grado de Fuhrman

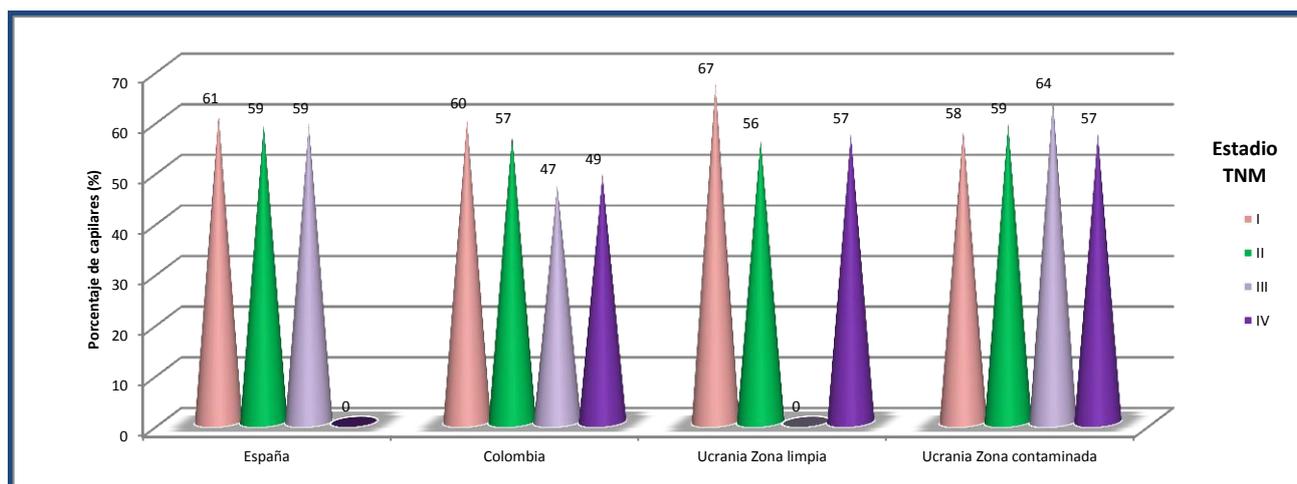
3.1.4.6 Porcentaje medio de capilares por estadio TNM

En la población tumoral del estudio para el estadio TNM I el porcentaje medio de capilares fue de 61%; de 58% para el estadio II; de 58% para el III y de 53% para el IV. En el grupo español fue de 61% para el estadio I; de 59% para el estadio II; de 59% para el III y sin casos para el IV. En el grupo colombiano fue de 60% para el estadio I; de 57% para el estadio II; de 47% para el III y de 49% para el IV. En el grupo de la zona limpia de Ucrania fue de 67% para el estadio I; de 56% para el estadio II; sin casos para el III y de 57% para el IV. En el grupo de la zona contaminada de Ucrania, fue de 58% para el estadio I; de 59% para el estadio II; de 64% para el III y de 57% para el IV (tabla 3.20).

Estadio TNM	Porcentaje de capilares (%)			
	España	Colombia	Ucrania Zona limpia	Ucrania Zona contaminada
I	61	60	67	58
II	59	57	56	59
III	59	47	-	64
IV	-	49	57	57

Tabla 3.20 Porcentaje de capilares en estadios TNM por grupo

Hemos encontrado un menor porcentaje de capilares en los estadios TNM más altos; a excepción del grupo de la zona contaminada, donde en el estadio III el porcentaje de capilares fue mayor al de los otros estadios (gráfica 3.65), sin que las diferencias fueran estadísticamente significativas.



Gráfica 3.65 Porcentaje de capilares en Estadios TNM por grupo

3.1.4.7 Media del total de vasos, capilares y porcentaje de capilares por niveles de edad

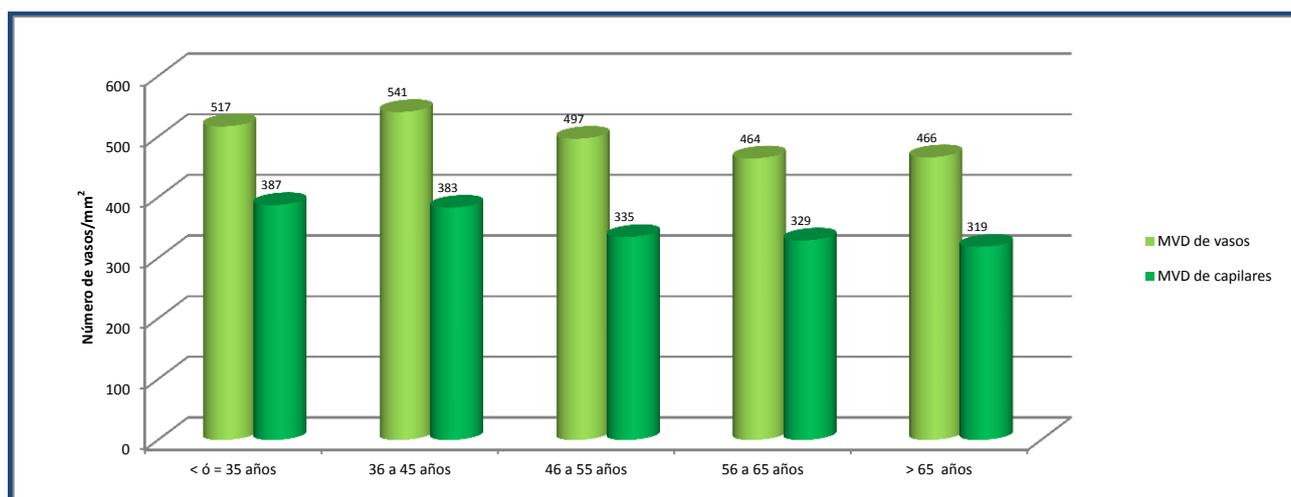
Estratificamos la variable edad de acuerdo a que el número de casos en cada rango fuese significativo para el análisis tanto del riñón normal como del neoplásico. Colocamos un estrato inferior para menores de 35 años, unos intervalos intermedios de 10 años y un estrato superior para mayores de 66 años.

De los 50 casos renales normales, obtuvimos una MVD/mm² en 14 casos menores de 35 años de 517 vasos y 387 capilares; 8 casos entre 36 y 45 años con 541 y 383; 16 casos entre 46 a 55 años con 497 y 335; 7 casos entre 56 a 65 años con 464 y 329; y 5 casos mayores de 65 años con 466 y 319 de media del total de vasos y de capilares respectivamente (tabla 3.21).

Edad en años	Media del total de vasos	Media de capilares	Porcentaje de capilares
< ó = 35	517	387	75
36 a 45	541	383	72
46 a 55	497	335	68
56 a 65	464	329	71
> 66	466	319	69

Tabla 3.21 Vasos por niveles de edad en riñones normales

En las muestras de riñón normal se evidenció una disminución en las MVD del total de vasos y de capilares cuanto mayor fue la edad. Las diferencias fueron estadísticamente significativas con la prueba de ANOVA entre edades extremas $\alpha= 0.010$ (gráfica 3.66)



Gráfica 3.66 Distribución de vasos en muestras renales normales por niveles de edad

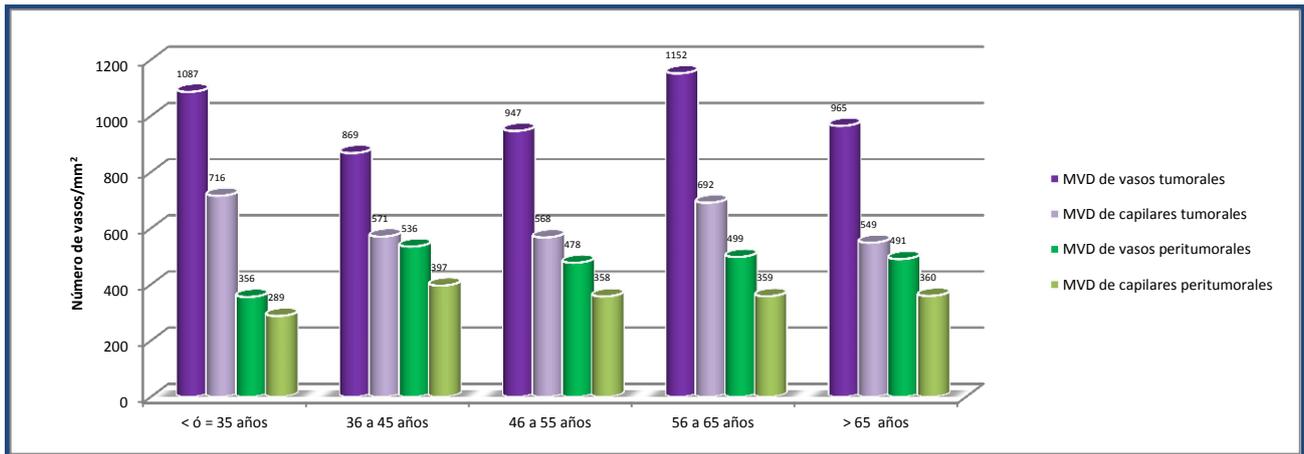
Con la misma clasificación por edad, en los casos tumorales y sus muestras peritumorales obtuvimos los siguientes resultados (tabla 3.22):

En los 5 casos tumorales menores de 35 años, una MVD/mm² del total de vasos de 1087 y de capilares de 716; en sus muestras peritumorales 356 y 289 respectivamente. En los 13 casos tumorales entre 36 y 45 años fue de 869 y 571; en sus muestras peritumorales 536 y 397 respectivamente. En los 28 casos tumorales entre 46 y 55 años fue de 947 y 568; en sus muestras peritumorales 478 y 358 respectivamente. En los 43 casos tumorales entre 56 y 65 años fue de 1152 y 692; en sus muestras peritumorales 499 y 359 respectivamente. Y, en los 35 casos tumorales mayores de 65 años fue de 965 y 549; en sus muestras peritumorales 491 y 360 respectivamente.

EDAD en años (casos)	Media del total de vasos tumorales	Media de capilares tumorales	Media del total de vasos peritumorales	Media de capilares peritumorales	Porcentaje de capilares peritumorales (%)	Porcentaje de capilares tumorales (%)
< 35(5)	1087	716	356	289	79	64
36 a 45(13)	869	571	536	397	74	64
46 a 55(28)	947	568	478	358	76	58
56 a 65(43)	1152	692	499	359	73	58
> 65(35)	965	549	491	360	75	57

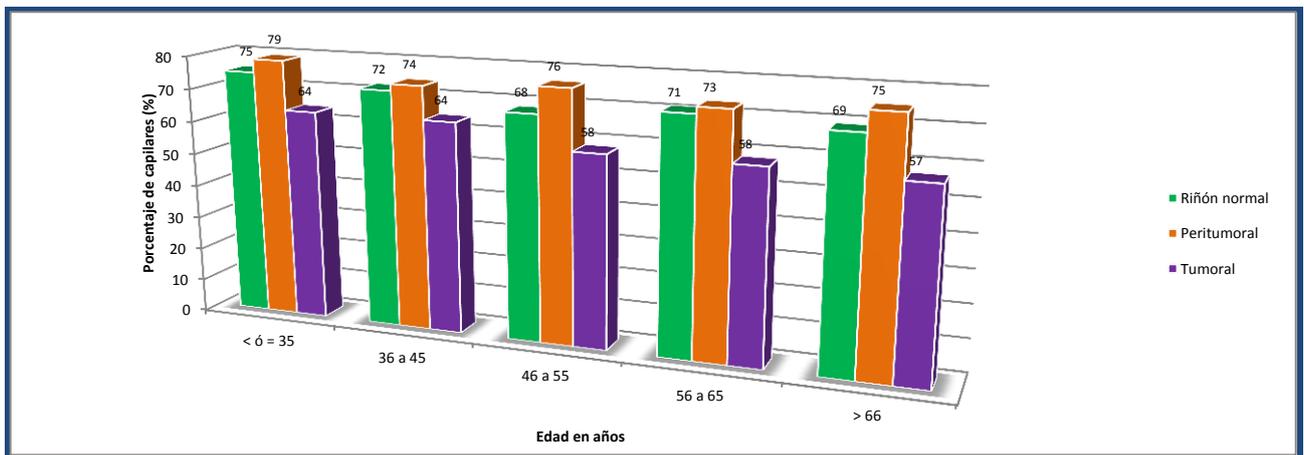
Tabla 3.22 Distribución de vasos por niveles de edad en muestras peritumorales y tumorales

Se observó el mayor promedio del total de vasos tumorales y de capilares en el grupo de casos de 56 a 65 años y en el grupo de menores de 35 años respectivamente; a su vez los mayores promedios del total de vasos y de capilares peritumorales se encontraron en el grupo de 36 a 45 años (gráfica 3.67). Las diferencias entre niveles de edad no tuvieron significancia estadística.



Gráfica 3.67 Distribución de vasos en muestras tumorales y peritumorales por niveles de edad

Se observó la disminución del porcentaje de capilares al aumentar la edad y dicha diferencia entre los niveles de edad extremos, fue analizada por el análisis de varianzas ANOVA resultando estadísticamente significativa $\alpha = 0.00$. A su vez en cada nivel de edad se observó una tendencia donde en las muestras peritumorales, se aumenta el porcentaje de capilares entre un 3 a un 8% y en las muestras tumorales respectivas disminuye dicho porcentaje, en un 9 a 13% con respecto a las muestras renales normales. La diferencia entre tumorales y peritumorales fue aun mayor del 10 al 18% (gráfica 3.68). En las tres comparaciones, a mayor edad se hizo mas evidente las diferencias y fueron analizadas mediante un análisis de varianzas ANOVA con un $\alpha = 0,00$.



Gráfica 3.68 Porcentaje de capilares/tipo de muestra por niveles de edad

3.1.4.8 Positividad de los factores y patrón de expresión celular por género

La relación entre la variable género y la positividad de cada uno de los factores estudiados, tanto en las muestras de tejido renal normal, como en las muestras con ccRCC fue análoga a las observadas para las características generales de la población correspondiente del estudio, siendo la proporción

media (hombre: mujer) de 1.4: 1. La misma proporción se observó para la relación entre la variable género y cada una de las categorías de la variable PEC de todos los factores. Las diferencias mostradas por grupos no fueron estadísticamente significativas.

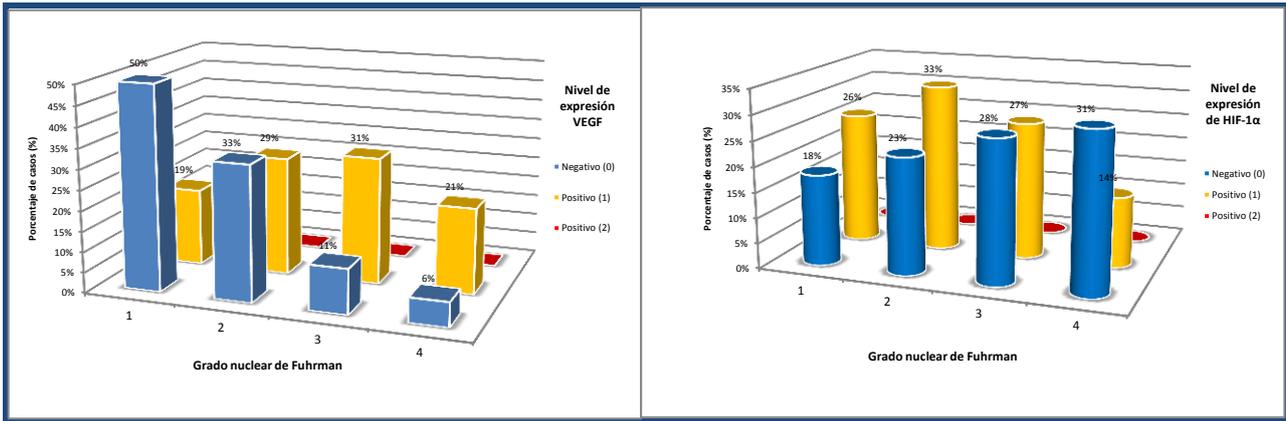
3.1.4.9 Positividad de los factores por estadio TNM y Grado de Fuhrman

Cuando correlacionamos la positividad de los factores con el grado nuclear y los estadios TNM encontramos los siguientes resultados relevantes:

- Los casos positivos para todos los factores se distribuyeron coherentemente con la distribución de medias de MVD observada para los estadios TNM. Sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.
- Los casos positivos para todos los factores a excepción del VEGF, se distribuyeron en mayor porcentaje en el grado nuclear 2, porcentajes medios y similares en los niveles 1 y 3, y el menor porcentaje de casos generalmente se halló en el nivel 4 de grado nuclear; para el VEGF la distribución fue coherente con la distribución de las medias de MVD correlacionadas con la graduación nuclear de Fuhrman. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.
- Se observó una distribución ascendente con el grado nuclear para los 39 casos con expresión negativa para el HIF, resultando una asociación lineal estadísticamente significativa con $\alpha=0.037$ (tabla 3.23 y gráfica 3.70). En cambio para los 18 casos con expresión negativa del VEGF, observamos una distribución descendente por grado nuclear, resultando diferencias estadísticamente significativas por la prueba del Chi-cuadrado, con un $\alpha=0.012$ y una asociación lineal significativa con $\alpha=0.005$ (tabla 3.23 y gráfica 3.69).

Grupo	nivel de expresión	Grado nuclear de Fuhrman			
		1	2	3	4
VEGF	0	50%	33%	11%	6%
	1	19%	29%	31%	21%
	2	-	-	-	-
HIF-1 α	0	18%	23%	28%	31%
	1	26%	33%	27%	14%
	2	0	0	0	0

Tabla 3.23 Expresión de VEGF y HIF-1 α por grado de Fuhrman

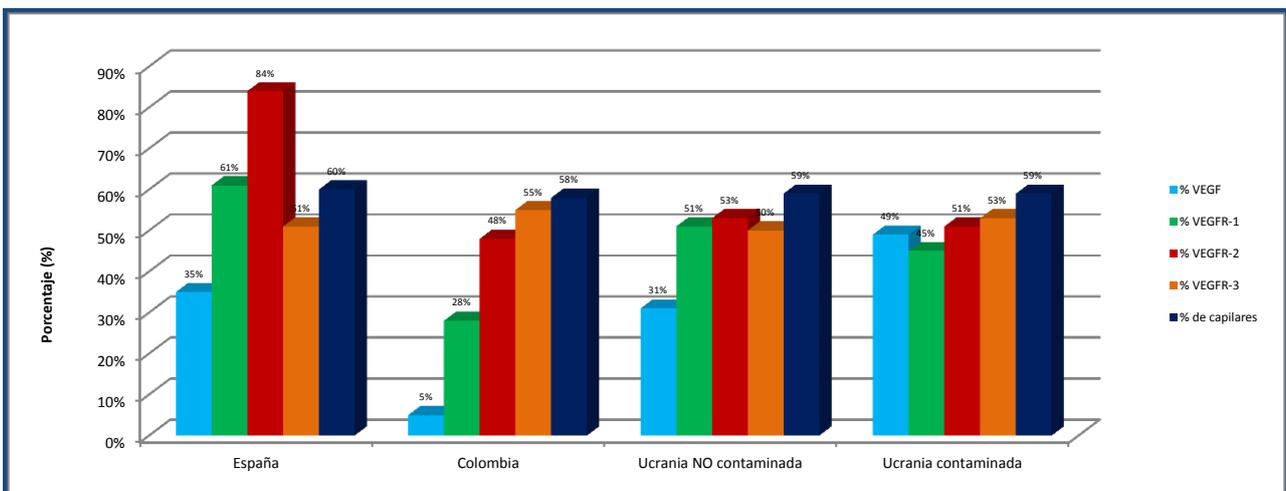


Gráfica 3.69 Positividad de VEGF por grado nuclear de Fuhrman

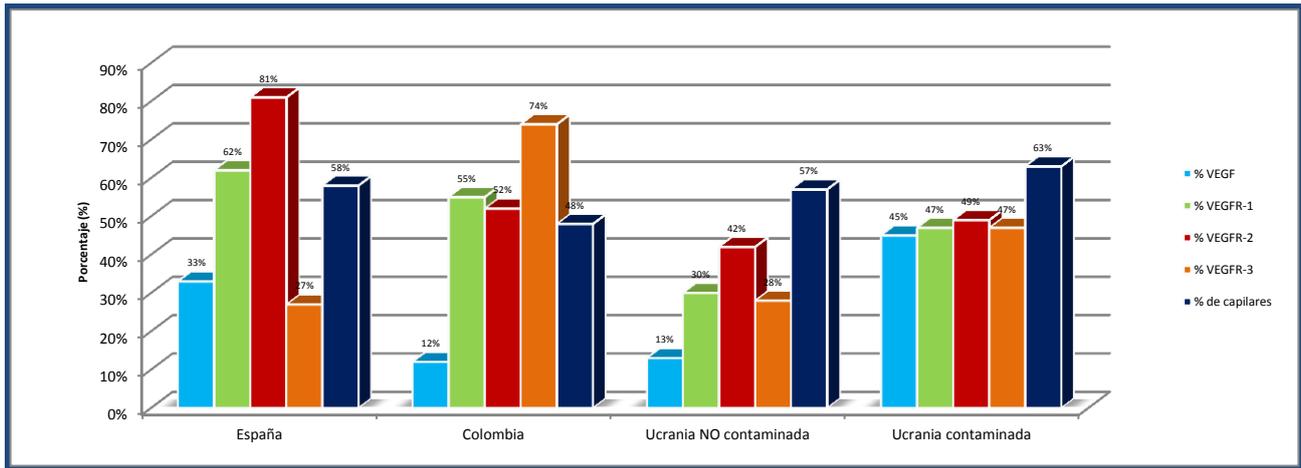
Gráfica 3.70 Positividad de HIF-1α por grado nuclear de Fuhrman

3.1.4.10 Comparaciones entre ccRCC TNM bajos y ccRCC TNM altos (Porcentaje de expresión de VEGF, sus VEGFRs y porcentaje de capilares)

Los ccRCC de nuestro estudio que fueron clasificados en los estadios TNM I y II mostraron porcentajes de capilares similares (gráfica 3.71), mientras en los clasificados como TNM III y IV se observaron diferencias estadísticamente significativas por ANOVA con $\alpha=0.000$ (gráfica 3.72). La diferencia en el promedio de expresión del VEGF siguió siendo estadísticamente significativa tanto en los ccRCC invasivos como en los no invasivos, mostrándose siempre mayor en el grupo ucraniano de la zona contaminada y bastante baja en el grupo colombiano (gráfica 3.72). La tendencia en la expresión de los VEGFRs fue muy parecido al observado en el grupo tumoral completo sin embargo las diferencias fueron estadísticamente significativas por ANOVA, para el VEGFR-1 y VEGFR-2 en los ccRCC no invasivos con $\alpha=0.021$ y $\alpha=0.000$ respectivamente (gráfica 3.71); y para el VEGFR-3 en los ccRCC invasivos con $\alpha=0.021$ (gráfica 3.72).



3.71 Porcentaje de expresión de VEGF, sus VEGFRs y porcentaje de capilares en ccRCC TNM I y II

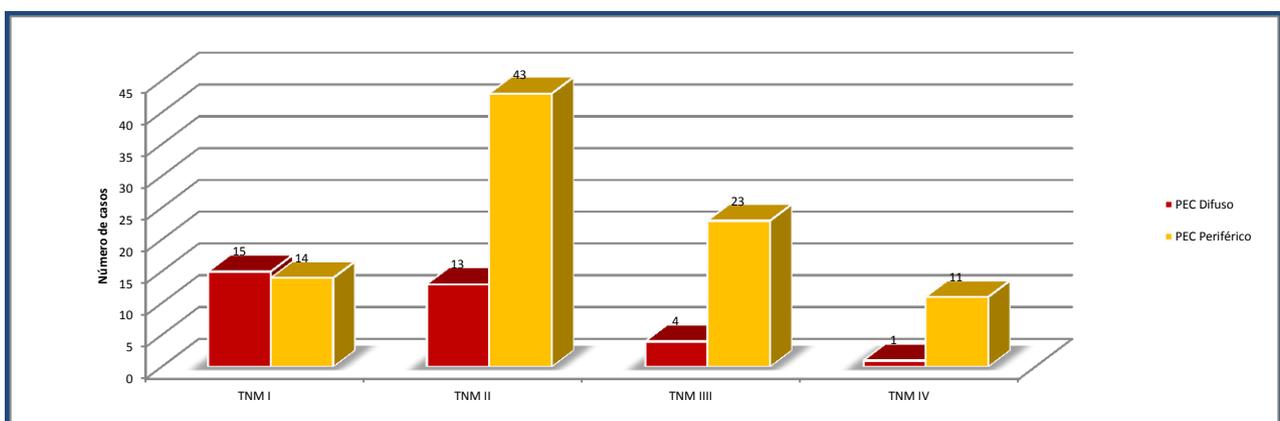


3.72 Porcentaje de expresión de VEGF, sus VEGFRs y porcentaje de capilares en ccRCC TNM III y IV

3.1.4.11 Patrón de expresión celular por estadio TNM y Grado de Fuhrman

Para la relación entre el grado nuclear de Fuhrman, el estadio TNM y el PEC de cada uno de los factores, se observó que los pocos casos con patrón difuso en el VEGF y sus tres receptores estudiados se distribuyeron uniformemente en los grados nucleares, al igual que para el mismo patrón, en el VEGF y sus receptores 1 y 3 en todos los estadios TNM. El único caso con patrón difuso para el VEGFR2 fue clasificado en el estadio TNM II.

Para el PDGFR y el HIF-1 α los 33 casos con patrón de expresión difusa mostraron una distribución uniforme en los cuatro grados nucleares; mientras, en los estadios tumorales, la distribución uniforme solo fue para el PDGFR. El HIF-1 α mostró una distribución inversamente descendente a los estadios TNM (gráfica 3.73). La prueba del Chi cuadrado de Pearson fue estadísticamente significativa, únicamente, para la relación entre el estadio TNM y el PEC del HIF-1 α con un $\alpha= 0.003$.



Gráfica 3.73 Distribución de PEC del HIF-1 α en estadios TNM

Los 4 casos con patrón de expresión difusa para el FGF-2 se distribuyeron en los dos estadios TNM más bajos y en los grados nucleares 1, 2 y 3. Por último los 17 casos con patrón difuso para la VE-cadherina se distribuyeron uniformemente en todos los estadios TNM y grados nucleares, especialmente los más altos. Ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

3.1.5 Relación entre los mecanismos de angiogénesis entre sí

3.1.5.1 Correlación entre medias del total de vasos, de capilares y de porcentaje de capilares por el nivel de inmunoexpresión

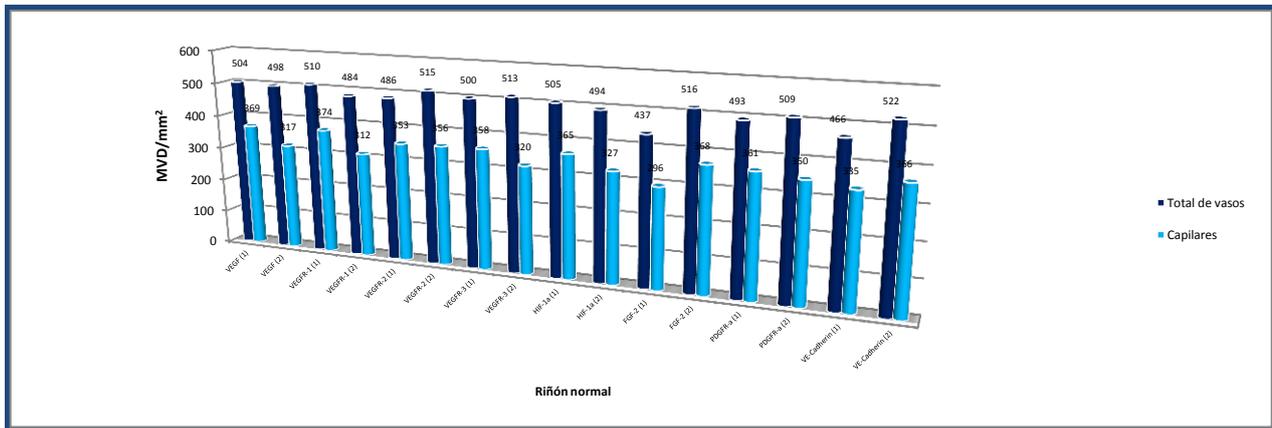
El riñón normal depende de su vascularización y en el control y mantenimiento de su red vascular influyen mecanismos de regulación que también están involucrados en la angiogénesis tumoral. Se analizó la correlación entre la MDV del riñón normal y el nivel de expresión de los factores angiogénicos, obteniéndose los siguientes resultados (tabla 3.24).

Factor	Nivel	Nº casos	Media de Vasos de riñón normal	Media de capilares de riñón normal	% de capilares de riñón normal
VEGF	0	0	-	-	-
	1	36	504	369	74
	2	14	498	317	64
VEGFR1	0	0	-	-	-
	1	34	510	374	74
	2	16	484	312	65
VEGFR2	0	0	-	-	-
	1	22	486	353	73
	2	28	515	356	69
VEGFR3	0	0	-	-	-
	1	45	500	358	72
	2	5	513	320	63
HIF	0	0	-	-	-
	1	36	505	365	73
	2	14	494	327	67
FGF	0	0	-	-	-
	1	9	437	296	69
	2	41	516	368	72
PDGFR	0	0	-	-	-
	1	23	493	361	74
	2	27	509	350	69
VE-cadherina	0	0	-	-	-
	1	18	466	335	73
	2	32	522	366	70

Tabla 3.24 Medias de MVD por nivel de expresión de cada factor en riñones normales

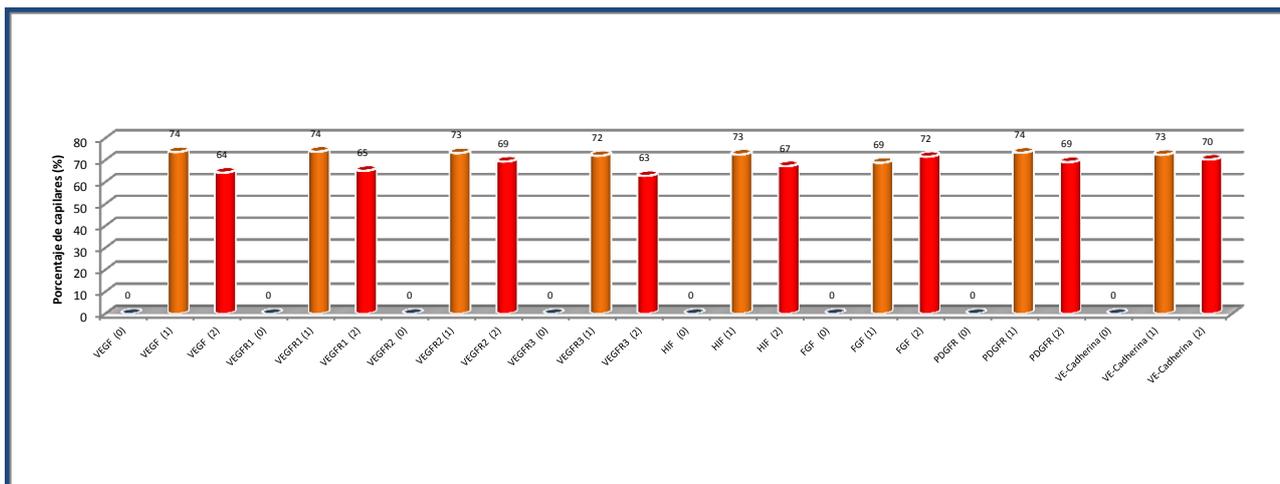
En los riñones normales, ninguno de los factores expresó negatividad y las variaciones en las MVD/mm² del total de vasos, entre los niveles de expresión 1 y 2 fueron muy pequeñas. Solo para el FGF-2, la diferencia de 81 vasos más por mm², en los casos con nivel (2), fue estadísticamente significativa por la prueba del Chi cuadrado con $\alpha=0.028$.

En la comparación de las medias de capilares para la expresión de VEGF y VEGFR1, se observaron en el nivel de expresión (1), 52 y 62 capilares por mm² más respectivamente; estas diferencias fueron estadísticamente significativas por la prueba del Chi cuadrado con $\alpha=0.032$ y $\alpha=0.005$. También para el FGF-2 encontramos 72 capilares por mm² más en las en los casos que expresaron nivel (2), diferencia estadísticamente significativa por la prueba del Chi cuadrado con $\alpha=0.009$ (gráfica 3.74).



Gráfica 3.74 MVD por nivel de expresión de los factores en riñón normal

Como evidencia funcional de la vascularización en los riñones normales, el porcentaje de capilares se observó ligeramente mayor en los casos con nivel (1) de expresión de los factores estudiados; a excepción del FGF-2 donde la relación fue inversa. Estas diferencias en el caso del VEGF y el VEGFR-1 fue de 10 y 9% respectivamente, resultando estadísticamente significativas por la prueba del Chi cuadrado con $\alpha=0.003$ y $\alpha=0.005$ respectivamente (gráfica 3.75).



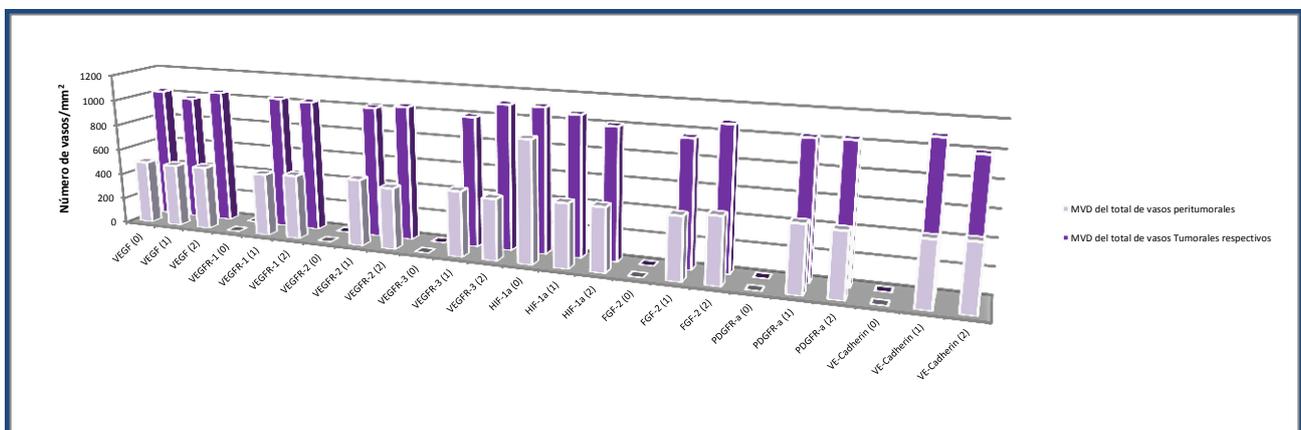
Gráfica 3.75 Porcentaje de capilares por nivel de expresión de los factores en riñón normal

La respuesta angiogénica tumoral depende de sus mecanismos de regulación autocrina y paracrina. Se analizó la correlación entre la MDV tanto en el tejido peritumoral, como en su tejido tumoral respectivo y el nivel de expresión de los factores angiogénicos (tabla 3.25).

Factor –nivel de expresión (casos)	Nivel	Nº casos	Media del total de vasos peritumorales	Media del total de vasos Tumorales respectivos	Media de capilares peritumorales	Media de capilares tumorales respectivos	Porcentaje de capilares peritumorales (%)	Porcentaje de capilares tumorales respectivos (%)
VEGF	0	10	494	1024	363	590	74	55
	1	33	487	981	360	573	75	57
	2	81	493	1046	361	635	75	59
VEGFR1	0	0	-	-	-	-	-	-
	1	65	486	1031	363	607	75	57
	2	59	498	1021	361	625	74	60
VEGFR2	0	0	-	-	-	-	-	-
	1	56	514	1013	375	601	74	58
	2	68	473	1037	350	626	75	59
VEGFR3	0	0	-	-	-	-	-	-
	1	91	500	997	368	601	75	59
	2	33	469	1109	343	654	74	57
HIF-1 α	0	1	927	1108	651	600	70	54
	1	39	489	1070	361	626	74	57
	2	84	487	1005	358	610	75	59
FGF	0	0	-	-	-	-	-	-
	1	55	477	961	361	581	76	59
	2	69	504	1078	362	643	74	58
PDGFR	0	0	-	-	-	-	-	-
	1	51	504	1023	373	606	75	58
	2	73	483	1029	353	621	75	59
VE-cadherina	0	0	-	-	-	-	-	-
	1	41	484	1088	368	682	76	61
	2	83	495	997	358	582	74	57

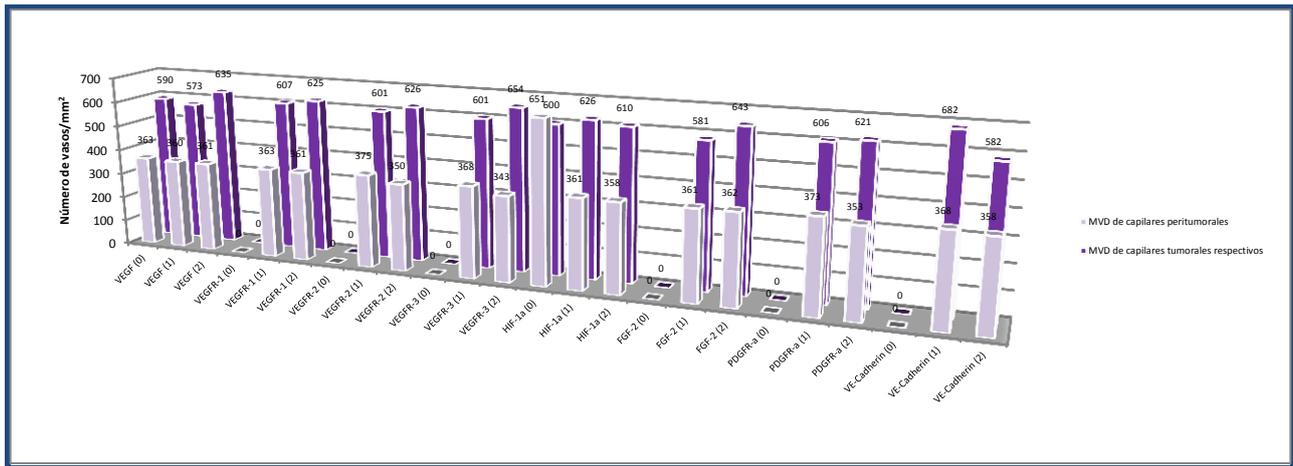
Tabla 3.25 Medias de MVD por nivel de expresión de cada factor en zonas peritumorales y su tejido tumoral homólogo

En la cantidad del total de vasos peritumorales y sus muestras tumorales respectivas, se observaron pequeñas variaciones de las medias en la mayoría de los factores, para los diferentes niveles de expresión; sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (gráfica 3.76), a excepción de lo mostrado para el HIF-1. Este, en el caso con expresión negativa mostró un aumento destacable en la MVD/mm² del total de vasos, en comparación con las de los niveles (1) y (2) (gráfica 3.76), siendo estadísticamente significativo, al análisis de varianzas ANOVA con un $\alpha=0.009$.



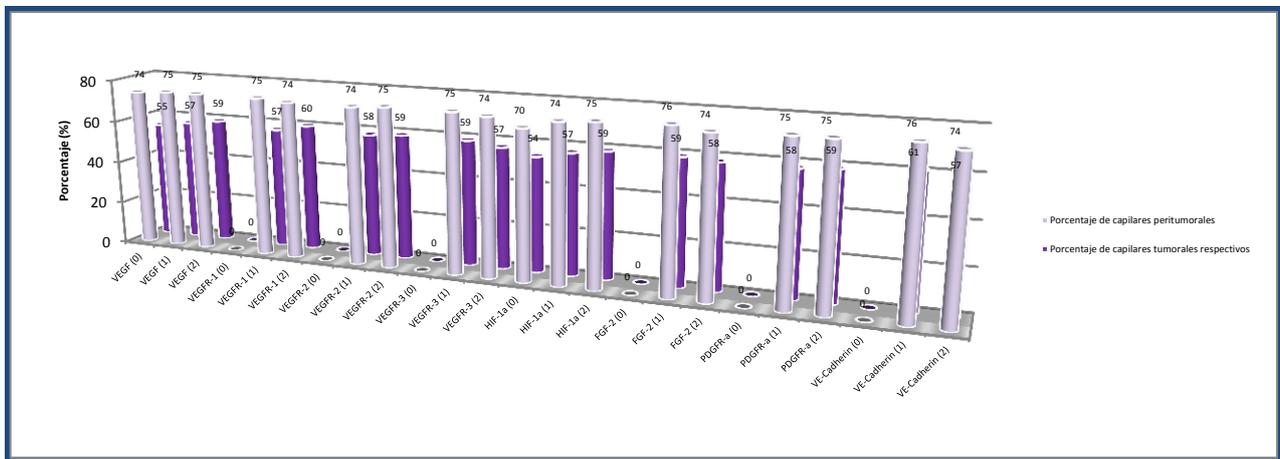
Gráfica 3.76 MVD del total de vasos por nivel de expresión de los factores en riñón peritumoral y tejido tumoral homólogo

En la MVD/mm² de capilares peritumorales y sus muestras tumorales respectivas, se observó un comportamiento similar al mostrado por el total de vasos (gráfica 3.77). Sin diferencias estadísticamente significativas, a excepción de lo observado para el HIF-1. El caso con expresión negativa mostró un aumento destacable en la media del de capilares, en comparación con las medias de los niveles (1) y (2) (gráfica 3.77), siendo estadísticamente significativo, al análisis de varianzas ANOVA con un $\alpha=0.012$.

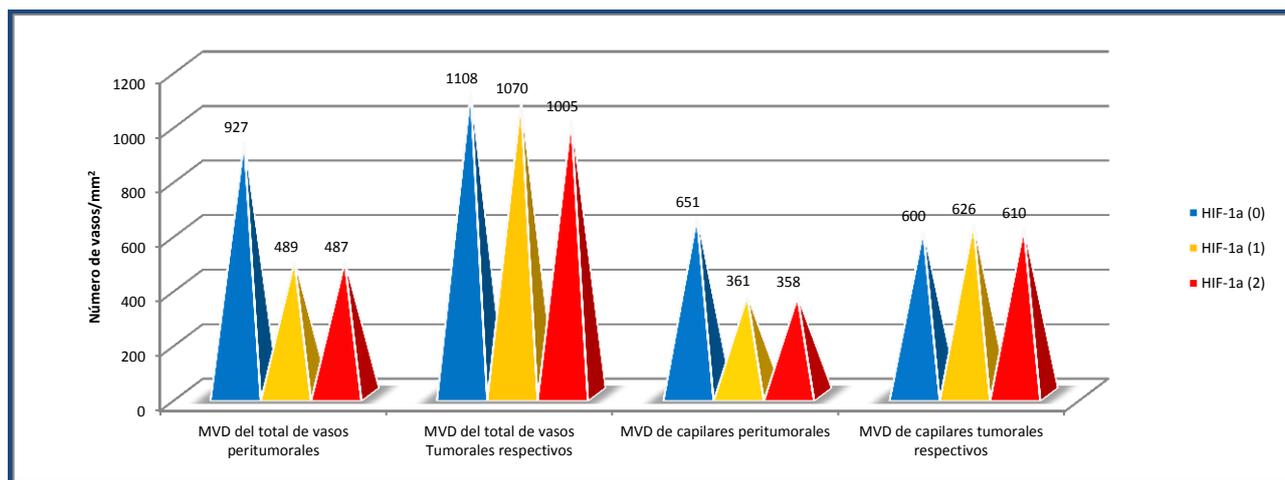


Gráfica 3.77 MVD de capilares por nivel de expresión de los factores en riñón peritumoral y tejido tumoral homólogo

El análisis del porcentaje de capilares presentado por las muestras peritumorales y sus respectivas tumorales, en sus diferentes niveles de expresión de los factores angiogénicos, mostró una disminución constante del porcentaje de capilares en las muestras con ccRCC (gráfica 3.78). La única diferencia destacable fue la mostrada por el caso de HIF con expresión negativa, observándose un porcentaje de capilares menor al de los niveles de expresión (1) y (2) (gráfica 3.79). Sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa.



Gráfica 3.78 Porcentaje de capilares por nivel de expresión de los factores en riñón peritumoral y tejido tumoral homólogo



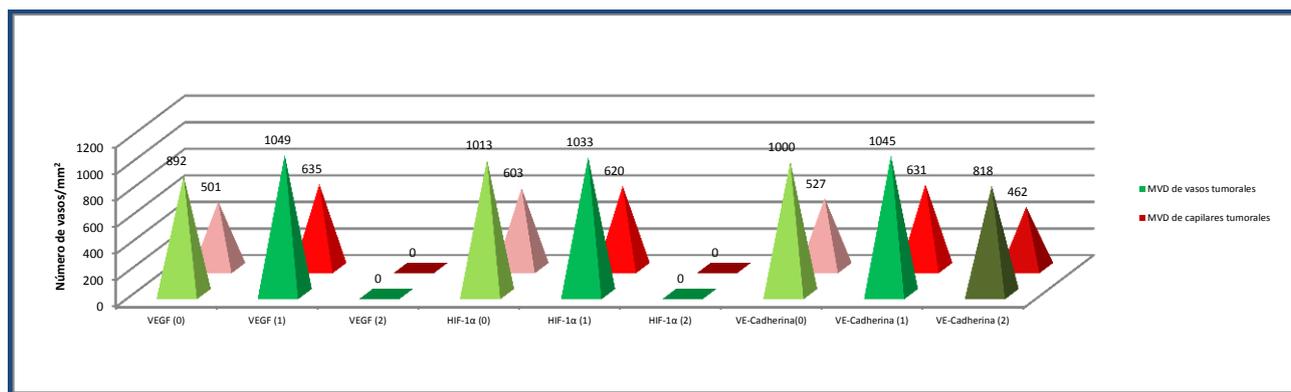
Gráfica 3.79 MVD por nivel de expresión de HIF-1α en riñón peritumoral y tejido tumoral homólogo

La modulación intrínseca de los mecanismos de crecimiento e invasión tumoral en el ccRCC es influenciada por el desequilibrio de los mecanismos de regulación angiogénica, participando activamente las propias células tumorales. Se analizó la correlación entre la MDV en el tejido tumoral y su nivel de expresión de factores angiogénicos (tabla 3.26).

Factor	Nivel	Nº casos	Media de Vasos tumorales	Media de capilares tumorales	% de capilares Tumorales
VEGF	0	18	892	501	55
	1	106	1049	635	59
	2	-	-	-	-
VEGFR1	0	2	866	401	47
	1	122	1029	618	59
	2	-	-	-	-
VEGFR2	0	1	912	370	41
	1	123	1028	617	59
	2	-	-	-	-
VEGFR3	0	3	1047	674	64
	1	121	1026	613	58
	2	-	-	-	-
HIF	0	39	1013	603	58
	1	85	1033	620	59
	2	-	-	-	-
FGF	0	122	1030	617	58
	1	2	804	471	59
	2	-	-	-	-
PDGFR	0	-	-	-	-
	1	124	1026	615	58
	2	-	-	-	-
VE-cadherina	0	5	1000	527	51
	1	110	1045	631	59
	2	9	818	462	56

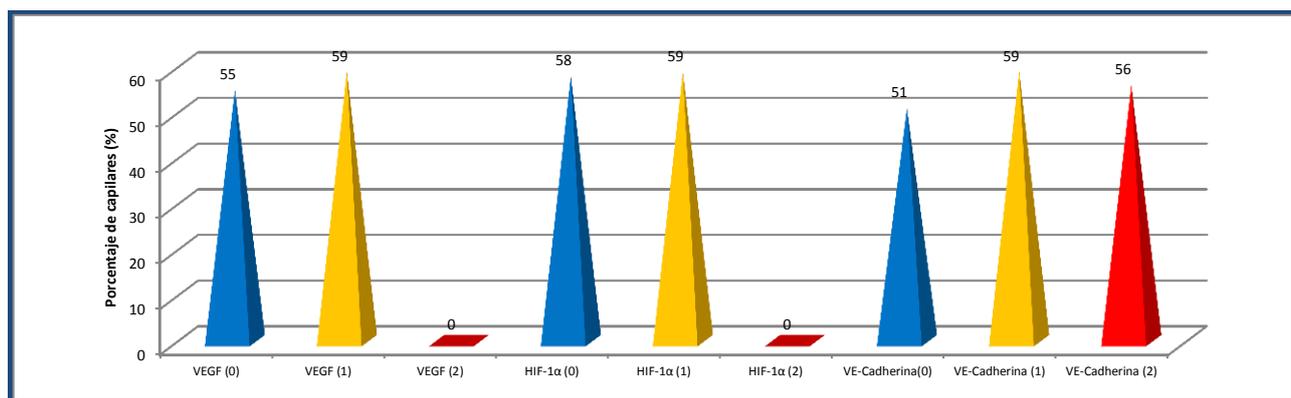
Tabla 3.26 Medias de MVD tumoral por nivel de expresión de cada factor

El VEGF, el HIF-1α y la VE-cadherina fueron los únicos factores que tuvieron distribución de casos que permitiera un análisis estadístico, en ellos encontramos un comportamiento similar, mostrando menor media de vasos y de capilares en los casos con nivel (0). La VE-cadherina mostró casos con nivel (2) en los cuales se observó mayor disminución de la media total de vasos y la de capilares (gráfica 3.80). Sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas



Gráfica 3.80 MVD tumoral por nivel de expresión de factores

Para evidenciar la funcionalidad vascular en el ccRCC, se analizó el porcentaje de capilares de la población tumoral. Se observó leve disminución de dicho porcentaje en los casos negativos para la expresión de los tres factores; la VE-cadherina también mostró disminución del porcentaje de capilares en los casos de expresión alta (2) estas diferencias no fueron estadísticamente significativas por la prueba del Chi- cuadrado (gráfica 3.81).



Gráfica 3.81 Porcentaje de capilares tumorales por nivel de expresión de factores

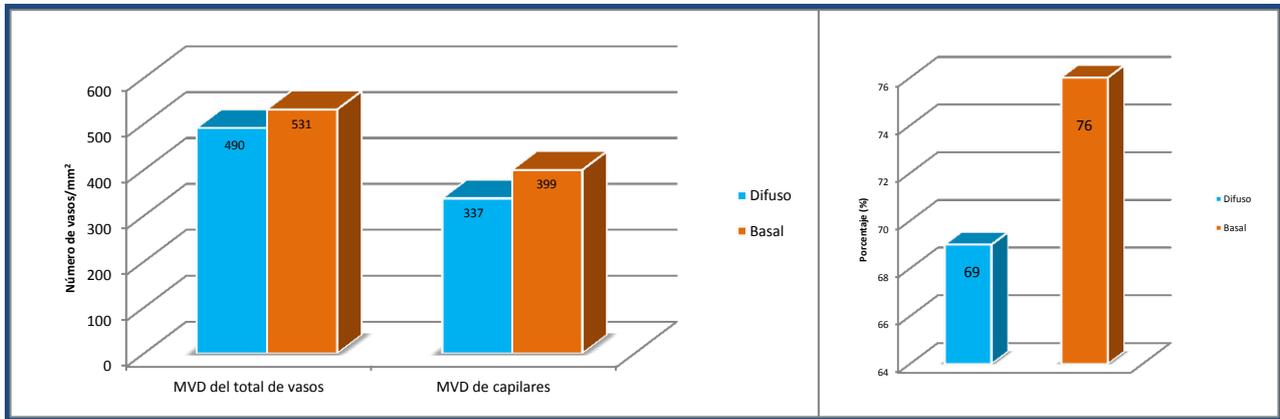
3.1.5.2 Media del total de vasos, de capilares y de porcentaje de capilares por Patrón de expresión

En los 36 casos renales normales con patrón difuso para HIF-1α, la media del total de vasos fue de 790, la de capilares fue de 543 y el porcentaje medio de capilares fue de 69%; a su vez, en los 14 casos renales normales con patrón basal, la media del total de vasos fue de 855, la de capilares fue de 643 y el porcentaje medio de capilares fue de 76% (tabla 3.27) (gráfica 3.82 y 3.83).

PEC HIF-1α en riñón normal	Media del total de vasos	Media de capilares	Porcentaje de capilares (%)
Difuso	490	337	69
Basal	531	399	76

Tabla 3.27 Medias de MVD en riñón normal por PEC de factores

Las diferencias entre las medias de capilares, a favor del patrón de expresión basal, fue estadísticamente significativa al analizarla por ANOVA con un $\alpha=0,009$. Las restantes diferencias no fueron significativas y los demás factores expresados en las muestras renales normales, no tuvieron la variabilidad suficiente para ser contrastadas.



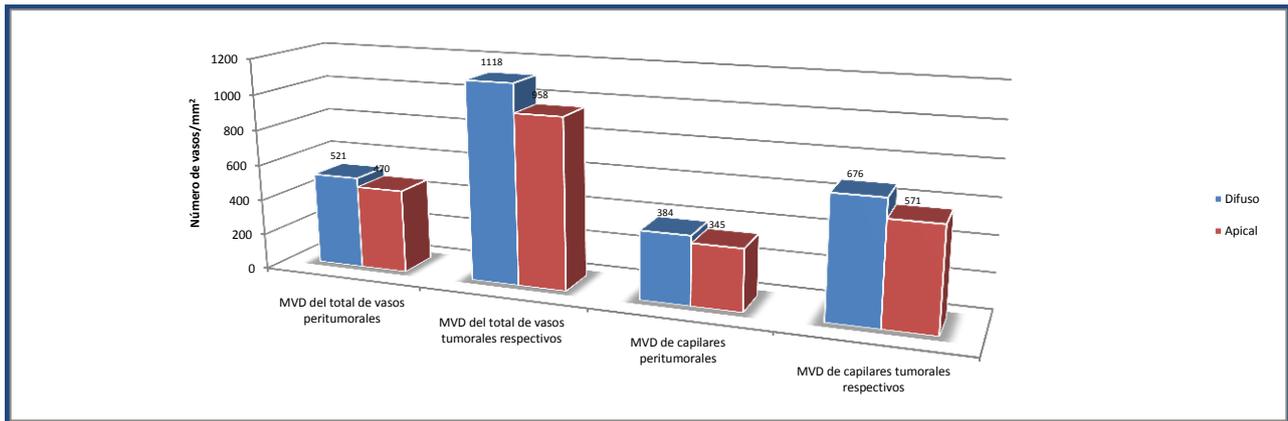
Gráfica 3.82 MVD en riñón normal por PEC de HIF-1α

Gráfica 3.83 Porcentaje de capilares en Riñón normal según PEC de HIF-1α

En los 49 casos peritumorales con patrón difuso para el VEGFR3, la media de vasos totales fue de 839, la de capilares fue de 618 y el porcentaje de capilares promedio fue de 74%; en los 76 casos peritumorales con patrón apical, la media de vasos totales fue de 757, la de capilares fue de 554 y el porcentaje de capilares promedio fue de 75%. El porcentaje de capilares tumorales respectivos fue igual en los dos patrones (tabla 3.28 y gráfica 3.84). Al análisis ANOVA se obtuvo diferencia estadísticamente significativa para la media de capilares, tanto de los casos peritumorales, como de sus tumorales respectivos; $\alpha=0,029$ y $\alpha=0,048$. De igual manera para la media del total de vasos tumorales respectivos un $\alpha=0,025$.

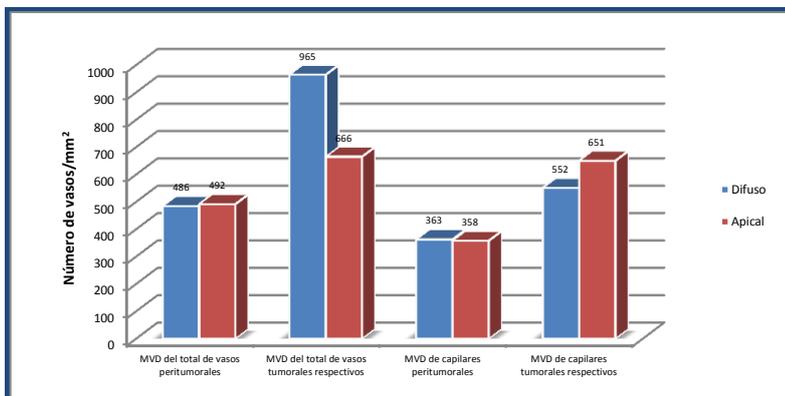
Factor/PEC peritumoral (casos)	MVD del total de vasos peritumorales	MVD del total de vasos tumorales respectivos	MVD de capilares peritumorales	MVD de capilares tumorales respectivos	Porcentaje de capilares peritumorales (%)	Porcentaje de capilares tumorales respectivos (%)
VEGFR3/Difuso (49)	521	1118	384	676	74	59
VEGFR3/Apical (76)	470	958	345	571	75	59
HIF-1α/Difuso (49)	486	965	363	552	75	55
HIF-1α/Apical (76)	492	666	358	651	74	60
FGF-2/Difuso (43)	483	1139	353	679	73	57
FGF-2/Apical (82)	493	959	363	576	75	59

Tabla 3.28 Medias de MVD peritumoral por PEC de factores

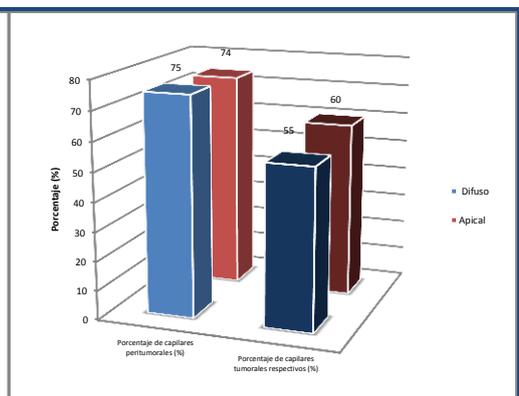


Gráfica 3.84 MVD peritumoral y sus tumorales respectivos según tipos de PEC de VEGFR-3

En los 49 casos peritumorales con patrón difuso para el HIF-1 α , la media de vasos totales fue de 782, la de capilares fue de 585 y el porcentaje de capilares promedio fue de 75%; en los 76 casos peritumorales con patrón apical, la media de vasos totales fue de 793, la de capilares fue de 577 y el porcentaje de capilares promedio fue de 74% (tabla 3.28), (gráfica 3.85 y 3.86). El porcentaje de capilares tumorales respectivos fue 5% mayor para los casos con patrón apical y al análisis ANOVA se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa con $\alpha=0,014$.

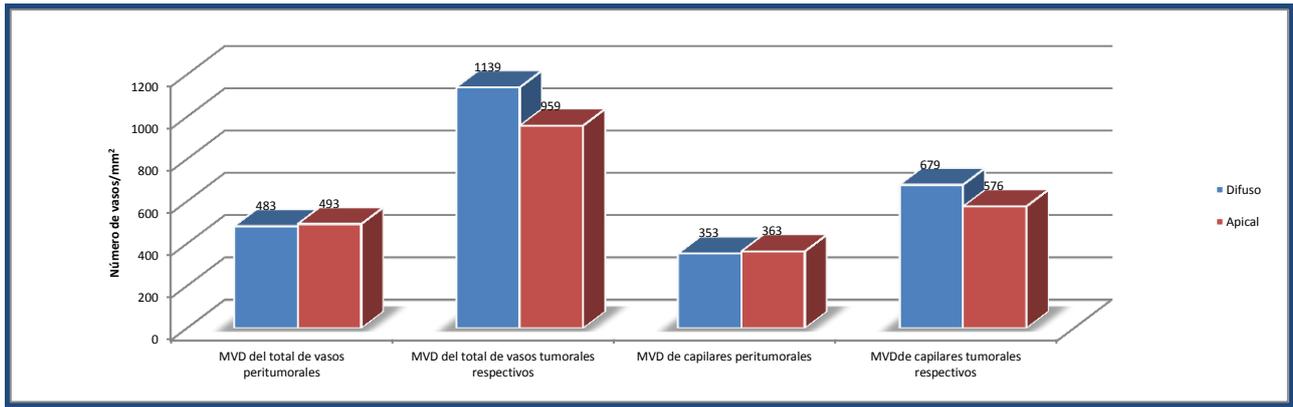


Gráfica 3.85 MVD peritumoral y sus tumorales respectivos según tipos de PEC de HIF-1 α



Gráfica 3.86 Porcentaje de capilares según PEC de HIF-1 α

En los 43 casos peritumorales con patrón difuso para el FGF-2, la media de vasos totales fue de 778, la de capilares fue de 569 y el porcentaje de capilares promedio fue de 73%; en los 82 casos peritumorales con patrón apical, la media de vasos totales fue de 795, la de capilares fue de 585 y el porcentaje de capilares promedio fue de 75% (tabla 3.28 y gráfica 3.87). La media del total de vasos tumorales respectivos fue de 291 vasos más para los casos con patrón difuso y al análisis ANOVA se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0,013$.

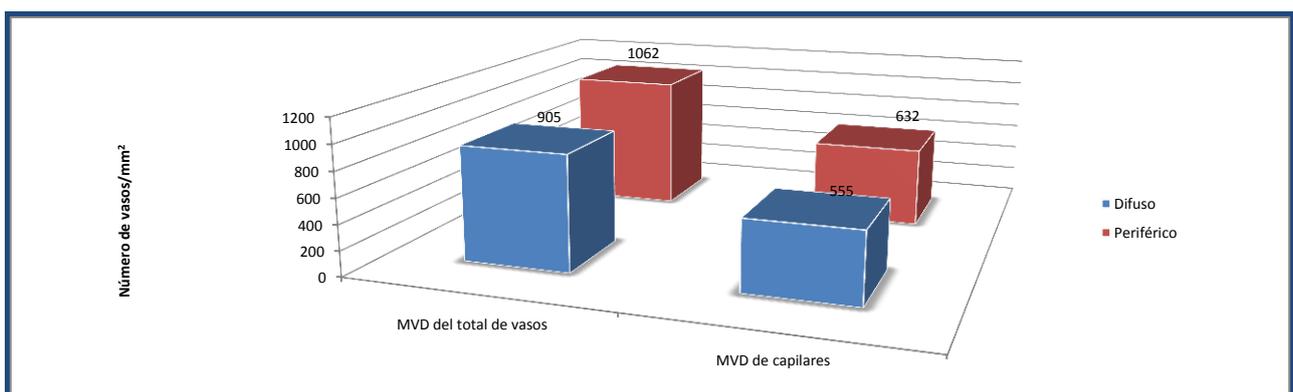


Gráfica 3.87 MVD peritumoral y sus tumorales respectivos según tipos de PEC de FGF-2

En los 33 casos tumorales con patrón difuso para el PDGFR, la media de vasos totales fue de 1458, la de capilares fue de 894 y el porcentaje de capilares promedio fue de 60%; en los 92 casos tumorales con patrón periférico, la media de vasos totales fue de 1710, la de capilares fue de 1018 y el porcentaje de capilares promedio fue de 57% (tabla 3.29 y gráfica 3.88). La media del total de vasos fue de 252 vasos más para los casos con patrón periférico y al análisis ANOVA se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0,047$.

PEC- factores angiogénicos (casos)	MVD del total de vasos	MVD de capilares	Porcentaje de capilares (%)
PDGFR /Difuso (33)	905	555	60
PDGFR /Periférico (92)	1062	632	57
VE-cadherina /Difuso (17)	1237	694	59
VE-cadherina /Periférico(108)	987	592	58

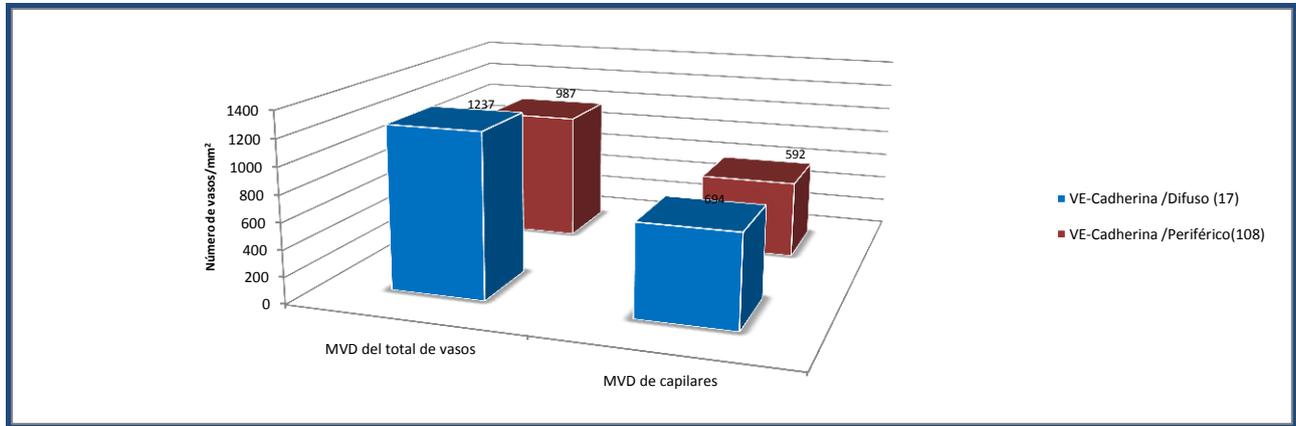
Tabla 3.29 Medias de MVD tumoral por PEC de factores



Gráfica 3.88 MVD tumoral por PEC de PDGFR-α

En los 17 casos tumorales con patrón difuso para el VE-cadherina, la media de vasos totales fue de 1992, la de capilares fue de 1118 y el porcentaje de capilares promedio fue de 59%; en los 108 casos tumorales con patrón periférico, la media de vasos totales fue de 1589, la de capilares fue de 953 y el

porcentaje de capilares promedio fue de 58% (tabla 3.29 y gráfica 3.89). La media del total de vasos fue de 403 vasos más para los casos con patrón difuso y al análisis ANOVA se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0,013$.



Gráfica 3.89 MVD tumoral por PEC de VE-cadherina

El resto de correlaciones entre los patrones de expresión celular de los diferentes factores y la cuantificación de vasos, en los casos tumorales, no fueron estadísticamente significativas.

3.2. DISCUSIÓN

El carcinoma renal de células claras es actualmente la neoplasia más común del riñón y su incidencia sigue aumentando [12,187]. La Sociedad Americana Contra el Cáncer calcula que al finalizar el año 2012 habrá alrededor de 64.770 casos nuevos de RCC en USA (40.250 en hombres y 24.520 en mujeres) [189]. De todos los carcinomas renales, del 70 al 75% corresponden al tipo histológico de células claras, caracterizado por un citoplasma de apariencia muy pálida o vacía y una membrana plasmática bien definida [12]. El origen de dichas células se atribuye a la célula epitelial de túbulo contorneado proximal [188].

Aunque la importancia de la cuantificación de la MVD en los tumores como factor pronóstico independiente ha tenido tanto defensores [38,64,152] como detractores [233,234], las referencias que se hacen al crecimiento tumoral en el ccRCC, como también en otros tumores sólidos, son claras. Se acepta que un aumento por encima del tamaño crítico de 2 mm^3 o más de 10 millones de células, requiere la formación de nuevos vasos a partir de vasos pre-existentes [10,190]. Esto ha conllevado a que se realicen numerosos estudios sobre la angiogénesis explicando las necesidades propias del crecimiento neoplásico incontrolado [2]. Los trabajos más recientes se han orientado hacia la importancia pronóstica de la MVD y el conocimiento detallado del comportamiento de angiogénesis como fundamento de terapéuticas más eficientes [156].

Los mecanismos de angiogénesis, definidos como los diferentes comportamientos de los factores angiogénicos y sus inhibidores, han sido ampliamente estudiados. Actualmente las modificaciones observadas en la expresión de las familias VEGF y HIF se aceptan como fundamentales en el análisis de la angiogénesis tumoral [38,64,65,66,152].

La validez de los trabajos sobre angiogénesis depende cada vez más de que las técnicas de análisis de imagen usadas aumenten la objetividad de sus resultados. También está influenciada por el buen uso de la combinación entre la morfometría y la inmunohistoquímica. Recientemente Romanenko y colaboradores [142], han demostrado el valor de esta combinación, siendo utilizada para la búsqueda

de información sobre la densidad microvascular en el ccRCC asociada a la exposición persistente y a bajas dosis de radiaciones ionizantes (CPLDIR). El material para estos estudios ha sido tanto la población Ucraniana cercana a la zona de contaminación ambiental oficial, veinticinco años después del accidente de la central nuclear de Chernóbil, como la población del resto de Ucrania. En estudios previos se mostró una mayor agresividad y actividad proliferativa especialmente en los ccRCC procedentes de la zona contaminada de ucrania [133, 135, 136, 137, 139, 140].

La revisión de los estudios epidemiológicos en Ucrania muestran un incremento de la tasa de incidencia del carcinoma de células renales de 4,7 a 10,7 por 100.000 habitantes [191,192] y las publicaciones del comité científico de las Naciones Unidas sobre los efectos de las radiaciones atómicas (UNSCLEAR) sugieren mayor agresividad y menor grado de diferenciación tumoral causada por la acción de la CPLDIR [143]. Estos dos aspectos sumados a las publicaciones previas de nuestro grupo de investigación, respecto al tema, justifican el diseño del presente estudio: buscamos profundizar de manera objetiva en la asociación entre la CPLDIR y los cambios epidemiológicos y anatomopatológicos observados en el ccRCC de la población ucraniana frente a dos poblaciones testigo procedentes de zonas no contaminadas por la irradiación como son España y Colombia.

Nuestro trabajo tiene por objeto adquirir mejor conocimiento sobre los mecanismos de angiogénesis en el ccRCC, a través de su estudio y análisis en diferentes poblaciones con exposiciones ambientales distintas, específicamente en relación con las bajas dosis de radiación ionizante de forma persistente. Hemos planteado el presente estudio aprovechando las mejoras de las técnicas de análisis de imagen y de inmunohistoquímica [158].

Discutiremos los resultados de 124 casos de ccRCC, 50 de ellos procedentes de la zona contaminada de Ucrania expuestos a CPLDIR (20 años después del accidente nuclear en Chernóbil), los restantes 74 casos, proceden en número similar de las tres zonas con menor exposición crónica a bajas dosis de radiaciones ionizantes (25 de Ucrania zona limpia) o sin ella (25 de España y 24 de Colombia).

Analizaremos los resultados de la angiogénesis tumoral tanto en ccRCC expuestos a CPLDIR como en no expuestos, comparándolos con la de sus tejidos homólogos sin tumor; tanto en área peritumoral, como en tejido de riñón normal. A pesar de una extensa revisión, no hemos encontrado referentes bibliográficos actualizados sobre estudios en tumores humanos con criterios equiparables al nuestro. Hemos organizado la discusión de los resultados en tres apartados: describiremos las

características clínicas de los enfermos, la densidad microvascular, los diversos factores de proliferación relacionados con la angiogénesis y los patrones de expresión celular observados.

3.2.1 Patrones de las distintas características clínicas

Edad

El carcinoma renal de células claras es el tumor más frecuente de todos los carcinomas renales, presentando una incidencia máxima entre los 60 y 70 años de edad en Europa [232,233] y de 66 años en USA [19]. La edad promedio de la población de nuestro estudio estuvo 10 años por debajo (56 años). En el caso del grupo español, el promedio estuvo más cercano al esperado (64 años), mientras que en los grupos ucranianos estuvo 8 años por debajo (58 años) y en el grupo colombiano la disminución del promedio de edad fue de 11 años (55 años).

El mayor control médico periódico en busca de alteraciones en los pacientes de áreas con posibles riesgos de carcinogénesis, solo modificaría en 3 años máximo ese promedio, tiempo necesario para llegar a ser detectable en imágenes diagnósticas y/o ser sintomático [12]. Esto apoya la asociación de un promedio de edad diagnóstica más temprana en pacientes ucranianos, posiblemente relacionable por los efectos de la exposición crónica a bajas dosis a IR. Sin embargo en contra tenemos la esperanza de vida al nacer en Ucrania que es de 70 años [234].

En el caso del menor promedio de edad observado en el grupo tumoral colombiano, podría ser debido a que la esperanza de vida del país es menor (73 años) (70 en hombres y 77 en mujeres) [231], en comparación con la esperanza de vida de los españoles (79 años) [235]. Además, las instituciones de donde provienen las muestras colombianas generalmente atienden a pacientes afiliados al régimen de salud contributivo no pensionados, que en su mayoría son personas en edad laboral; mientras que hasta hace poco, la mayoría de pensionados eran atendidos por entidades de salud especiales sólo para ellos.

Con referencia a los casos controles constituidos por riñones normales en el grupo español, la edad media fue similar a la de la población española con ccRCC; en cambio la media de edad del grupo colombiano fue menor al de su grupo de referencia. Esto se debe a las dificultades tenidas para la obtención de muestras normales procedentes de autopsias, ya que en Colombia no hay bancos de tejidos, por lo que hubo que obtener las muestras directamente de autopsias legales, gracias a la ayuda del Departamento de Medicina Legal de la región de la Costa Norte. A pesar de que se tuvieron criterios de selección en cuanto a la causa del fallecimiento y sistematización de los datos de

salud, así como un especial cuidado en que no hubiera sufrimiento del tejido renal, no hubo la misma opción de control para la edad. Además, en Colombia la realización de la autopsia clínica es obligatoria sólo si la muerte pudiera comportar un problema legal o de salud específico [190], por lo que dependíamos de esos criterios.

Género

La proporción hombre mujer en los 4 grupos tumorales estuvo siempre por debajo de la proporción 2,5:1 hombre/mujer señalada en la bibliografía [19]; conservando la tendencia con un 1,4: 1 hombre/mujer. Esta diferencia puede ser explicable por dos causas: en primer lugar por los criterios de selección de la muestra, donde los pacientes del estudio son una muestra que depende de la población específica que llega a las instituciones colaboradoras del estudio y en segundo lugar, debido a que las mujeres acuden con más frecuencia a los controles y a revisión de síntomas tempranos. Distintos autores señalan también la existencia de otros factores externos, ambientales y de hábitos evolutivos basada en la influencia de factores de riesgo externo (tabaco, actividad profesional, contaminación ambiental alcohol, estrés...etc.) [247].

Romanenko y sus colaboradores han publicado en el año 2012, en un trabajo similar, en él se aporta una distribución por género muy parecida a la del presente estudio entre los grupos ucranianos, inclusive en el grupo de la zona sin contaminación de Ucrania donde la proporción fue de 1:1 mujeres/ hombres [142].

Grado de Fuhrman

Al analizar la malignidad histológica basada en la distribución por grados de atipia nuclear según Fuhrman para los grupos que constituyen el estudio, hemos encontrado un elevado porcentaje clasificables dentro de los dos grados más bajos, concretamente un 64 y un 76%, de los casos procedentes de España y Colombia, respectivamente; frente al de 56 y 58% de casos pertenecientes a los grupos de Ucrania limpia y contaminada respectivamente, que fueron clasificados como grados nucleares altos, resultando estadísticamente significativo al compararlo con los grupos con ccRCC sin exposición aparente a IR. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ucranianos entre sí.

Se encontraron resultados similares en el reciente trabajo de Romanenko y colaboradores, con un 61% de los casos de ccRCC españoles clasificados en los grados de Fuhrman 1 y 2, y un 56 y 60% de casos para los grupos ucranianos de la zona limpia y contaminada respectivamente, clasificados

en grados 3 y 4 de Fuhrman, sin significancia estadística entre los grupos ucranianos, pero muy significativa con respecto al grupo español sin influencia por la IR [142]. Los resultados para los grupos sin exposición a CPLDIR (Colombia y España) son similares a varios trabajos en los que se analizan pacientes portadores de carcinoma renal no expuestos a IR [162,248,249]. El origen de estas diferencias podría deberse a la distinta agresividad y menor grado de diferenciación tumoral debida a la acción de la CPLDIR en los casos procedentes de Ucrania [135,138,143].

Coherencia entre el tamaño tumoral y el grado de Fuhrman.

El tamaño tumoral forma parte de los criterios de estadificación TNM y su variación no es necesariamente concordante con el grado de diferenciación nuclear. Hemos hallado un incremento del tamaño tumoral relacionado con el aumento del grado de Fuhrman, más evidente en el grupo de casos de la zona contaminada de Ucrania, con significancia estadística $\alpha=0.00$ (test de ANOVA).

De forma similar en otras series como las publicadas por Rioux-Leclercq y Gofrit, mostraron Fuhrman de alto grado en el 27% de tumores de 4 cm de diámetro, porcentaje que aumentaba directamente relacionado al incremento del tamaño tumoral [160,161]. También en el trabajo de Sejnauí encontraron 18 de 45 casos, mayores de 5 cm, de las cuales 15 presentaban un Fuhrman de alto grado (3 o 4) [162] evidenciando una asociación directa entre mayor volumen tumoral y un grado de histología más desfavorable tipo Fuhrman grado 3 o 4 [162].

Nosotros hemos encontrado una asociación entre el grado nuclear de Fuhrman alto con un aumento en el tamaño del tumor. Esta asociación en el caso del grupo de la zona contaminada de Ucrania se puede ver potenciada por las modificaciones en el ccRCC relacionadas con la influencia de CPLDIR [143], lo que podría explicarnos la mayor evidencia de la asociación entre mayor grado de Fuhrman y mayor tamaño tumoral en dichos casos.

3.2.2 Densidad microvascular en población de estudio

Cuando cuantificamos los vasos existentes en las muestras con ccRCC del estudio, nuestro análisis tuvo como referencias el estudio morfométrico realizado de modo paralelo en el tejido peritumoral correspondiente así como en el tejido renal normal procedente de España y Colombia e incluido en el estudio. Encontramos un incremento de la densidad microvascular (MVD) del total de vasos y la de los capilares por mm^2 en las muestras con ccRCC respecto a las muestras sin carcinoma renal en las diferentes localizaciones geográficas, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Datos similares a nuestros resultados han sido señalados por Ren y colaboradores en una serie de 128 casos

de ccRCC, describiendo un aumento de la MVD de la zona tumoral en comparación con sus correspondientes zonas de riñón normal con una $p < 0,0001$ [159]. En el trabajo publicado por Rubio-Briones, también encontraron mayor MVD en los carcinomas de células claras [163]. Otros estudios muestran incrementos de MVD tumoral no significativos, pero sin comparar con tejido normal en ausencia de ccRCC [172].

Diversos estudios describen la angiogénesis como base para el desarrollo del tumor y su metástasis [158,159] que en el caso del RCC sirven para la utilización clínica de drogas antiangiogénicas [3,156]. Los resultados que obtuvimos con el análisis de imagen semiautomático y estandarizado para todos los casos, comprueban el aumento significativo de la cantidad de vasos en las áreas tumorales, confirmando su importancia en el crecimiento de las neoplasias.

La MVD en ccRCC con CPLDIR

Al comparar el grupo de muestras tumorales y peritumorales procedentes de la zona contaminada de Ucrania con los grupos homólogos provenientes de España y Colombia, encontramos un incremento estadísticamente significativo de la MVD del total de vasos y capilares. Hallazgos similares han sido publicados por el grupo de Romanenko, concretamente describen un aumento del total de vasos, especialmente de capilares, en un grupo de 63 muestras de ccRCC con CPLDIR, teniendo como referencia otros 43 biopsias de ccRCC provenientes de zonas no contaminadas tanto de Ucrania (25 casos) como de España (18 casos) [142]. Sin embargo en ese estudio no se efectuaron estudios de la MVD en la zona peritumoral que sirviera como patrón de referencia. Las diferencias atribuibles en este trabajo a la exposición crónica de bajas dosis de IR son comparables con nuestros hallazgos. Nosotros hemos agregado otra población no europea y sin exposición conocida a IR (Colombia), confirmando también dichas diferencias, entre la MVD del total de vasos de las muestras peritumorales de estos grupos con un $\alpha = 0.022$. Los presentes resultados validan la existencia de una fuerte asociación entre el incremento de la angiogénesis en el grupo ucraniano que vivió continuamente en el área radiocontaminada y su respectiva exposición a bajas dosis de IR.

La MVD en ccRCC con niveles diferentes de CPLDIR

Oficialmente, en Ucrania solo se considera radiocontaminada una zona de 80 km^2 alrededor del lugar del accidente nuclear de Chernóbil, mientras en el resto del país no se señalan, oficialmente, niveles de radiocontaminación ecológica. Sin embargo, recientemente el grupo de investigación de Bazika, encontró un aumento de 1.6 veces de RCC y otros cuatro tipos de tumores sólidos, al estudiar la incidencia de cáncer en cinco ciudades ucranianas con riesgos de exposición a IR por poseer plantas

nucleares alejadas y diferentes a las de Chernóbil. Ellos sugieren que existe una asociación entre el incremento de la incidencia de cáncer y el desarrollo de la vida cercana a estas plantas nucleares en Ucrania. Esto permite suponer que las zonas de Ucrania oficialmente sin contaminación por IR, realmente no lo son [81,236].

En referencia a la radiocontaminación de toda Ucrania, nuestro estudio mostró dos aspectos a tener en cuenta: el primero fue la diferencia estadísticamente significativa entre la MVD del grupo de casos con ccRCC procedentes de la zona considerada libre de radiocontaminación en Ucrania ($633/\text{mm}^2$) y la procedente de los grupos de ccRCC de España ($517/\text{mm}^2$) y Colombia ($407/\text{mm}^2$), sin exposición a IR. El segundo aspecto de relevancia es la diferencia estadísticamente significativa, entre la MVD de los dos grupos procedentes de Ucrania, zona limpia ($633/\text{mm}^2$) y zona contaminada ($754/\text{mm}^2$). El primer hallazgo nos sugiere una muy probable radiocontaminación de la zona de Ucrania considerada oficialmente limpia como ya lo habían expresado otros autores [81,142,236], mientras el segundo aspecto nos evidencia con mayor relevancia, que los niveles de exposición a CPLDIR entre los dos grupos ucranianos mencionados son diferentes, lo que explicaría las diferencias entre las MVD tanto del total de sus vasos como de sus capilares.

Coincidiendo con estos resultados, el trabajo de Romanenko describe diferencias en la MVD de dos grupos ucranianos con ccRCC, de diferente nivel de radiocontaminación de acuerdo al criterio oficial (zona limpia y zona contaminada); pero sin ser estadísticamente significativas. Estos autores atribuyen la escasa diferencia descrita, a la posible existencia de un alto grado de radiocontaminación en toda Ucrania [142].

La relación entre el incremento de la MVD y el nivel de radiocontaminación de acuerdo a la zona de procedencia en Ucrania, no había quedado clara en el trabajo anterior de Romanenko, por lo que nuestro estudio buscó incrementar el campo microscópico visual para la cuantificación de vasos, utilizando áreas de 0.322 mm^2 , en lugar de áreas de 0.160 mm^2 utilizados en el trabajo de Romanenko; obteniendo así técnicamente una mayor área de tejido analizado sin perder el poder de resolución. De hecho, nuestros resultados hacen más evidente las diferencias entre los dos grupos con distinto nivel de CPLDIR.

Estos hallazgos hacen más factible considerar que la alimentación y la contaminación ambiental de toda Ucrania estén posiblemente influenciadas por la zona de radiocontaminación reconocida oficialmente. Algunas fuentes de agua y alimentación rodean, atraviesan o provienen de la zona contaminada; Ucrania es área de desastre ecológico, a pesar de que oficialmente no sea considerado

como tal [142,235,236]. Sin embargo a estos resultados deben sobrevenir nuevos trabajos que confirmen esta relación, especialmente en lo que respecta a la posibilidad de cuantificar los niveles ambientales de CPLDIR a los que estén expuestos las diferentes zonas de Ucrania y si es posible los pacientes, tanto en la cronicidad de la exposición como en los niveles medibles de las bajas dosis de IR.

Porcentaje de capilares como diferencial de tipos de muestra

La hipoxia se convierte en elemento esencial de un circuito cerrado compuesto por crecimiento tumoral, hipoxia, mayor angiogénesis e hipoxia persistente [183]. Del análisis de dicho ciclo nacen interrogantes como: ¿el nivel de proliferación celular es el único responsable de la persistente necesidad de oxígeno en el tumor?; ¿por qué incrementándose la angiogénesis aún persiste cierto nivel de hipoxia?; ¿es la nueva vascularización funcionalmente suficiente? Intentando responder a estas preguntas a través de nuestros resultados, analizamos la funcionalidad de la vascularización en el riñón normal y tumoral, teniendo en cuenta su dependencia de la cantidad y calidad de capilares capaces de nutrir y oxigenar el tejido. Nuestra cuantificación del total de vasos en cada caso, nos permitió diferenciar tres tipos de vasos según su diámetro y estructura (capilares, vasos pequeños y vasos medianos). De allí, se extrajo el porcentaje de capilares dentro del total de vasos, informándonos de la proporción de los vasos dedicados al mantenimiento de la integridad del tejido.

Para el análisis de la función vascular en el ccRCC usamos como patrones de referencia los porcentajes de capilares observados en la población de muestras peritumorales y de riñones normales. Estudiando el porcentaje de capilares en nuestros casos tumorales, hemos encontrado que hay una 15% menos que en la zona peritumoral y un 12% menos que en los riñones normales, con diferencia estadísticamente significativa, lo cual estaría a favor de considerar que en los tumores, a pesar de que el número de vasos es muy elevado, aun precisaría ser mayor para poder nutrir a toda la población celular presente. Concretamente revisando la tabla 1 de resultados del mencionado trabajo, hemos deducido que el porcentaje de capilares fue un 10% menor a la cifra tumoral de nuestro estudio. Sin embargo, en el trabajo no se compararon frente al porcentaje de capilares del riñón normal. La mayoría de estudios revisados no subclasifican la MVD cuantificada por sus tipos de vasos observados, haciendo referencia generalmente solo a los capilares, lo que hizo difícil comparar nuestros hallazgos.

La insuficiencia funcional de la neovascularización tumoral evidenciada es atribuible a la rapidez y desorganización en el proceso angiogénico tumoral, estimulado por células de variada diferenciación

y funcionalidad. A pesar del notable incremento de la angiogénesis, estos hallazgos sugieren que se disminuye la proporción de vasos funcionales para intercambio en el tejido, lo que parece perpetuar la influencia de la hipoxia en el mantenimiento del incremento de la neoformación vascular. A ello se aúna que el porcentaje de capilares en las muestras tumorales de este estudio fue menor conforme aumentaba el grado nuclear de Fuhrman y el estadio TNM de los casos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Ello confirmaría que a medida que crece el tumor, el grado de insuficiencia vascular funcional estimula a través de la hipoxia resultante a mantener el proceso angiogénico, no solo por el aumento del tejido tumoral, sino por la reestructuración de la trama vascular.

La neoarteriogenesis intenta dar un mejor soporte estructural al tejido tumoral muy celular y poco resistente [178] y la disminución en la proporción de capilares mantendría los niveles de hipoxia necesarios para el mantenimiento del ciclo angiogénesis-crecimiento tumoral. Este dato refuerza la hipótesis de que el crecimiento y la agresividad tumoral proporcionan las condiciones tisulares necesarias para modificar el proceso de angiogénesis resultante [169].

Porcentaje de capilares en la población tumoral

Como ya hemos visto previamente, el porcentaje de capilares estaba claramente disminuido en la población tumoral respecto al riñón normal y peritumoral. Coincidiendo con estos resultados, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las zonas de Ucrania contaminada (62%), no contaminada (60%) y España (60%). En el grupo de Colombia, sin embargo, encontramos que el porcentaje de capilares (52%) fue mucho menor que en el resto de grupos.

Relacionando los cambios del porcentaje de capilares de acuerdo a la exposición crónica a bajas dosis de IR, encontramos diferencias carentes de significancia estadística entre el grupo de ccRCC de la zona contaminada y los grupos oficialmente no expuestos procedentes de Ucrania y España. Sin embargo en el grupo tumoral colombiano, más alejado de la exposición, se observó una mayor disminución del porcentaje de capilares y su diferencia con el resto de grupos fue estadísticamente significativa. Por el contrario en el trabajo del año 2012 publicado por el grupo de Romanenko [142], se afirma que existe una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de capilares entre los dos grupos ucranianos (tanto el expuesto 49% como el no expuesto 48 %) y el grupo español (sin exposición crónica a IR de 54%).

La funcionalidad de la vascularización tumoral de los ccRCC en pacientes expuestos a CPLDIR se observó menos comprometida en nuestro estudio en comparación con el de Romanenko [142], aunque la tendencia a la evidente disminución del porcentaje de capilares fue similar en ambos estudios. La diferencia en la funcionalidad vascular, medida como el porcentaje de vasos, entre los ccRCC expuestos o no a IR podría asociarse a la significativa mayor expresión de VEGF en los casos procedentes de la zona contaminada de Ucrania que discutiremos posteriormente.

Por otra parte, la disminución acentuada del porcentaje de capilares en el grupo tumoral colombiano sin exposición a IR, podría asociarse a que la media del tamaño tumoral es mayor (7,6 cm) ya que hay un mayor porcentaje de casos en estadios clínico-patológicos altos. Como ya se explicó previamente, el grupo de Colombia tiene unas particularidades propias que explicarían el grado tumoral más elevado en estos tumores, como es el retraso en el diagnóstico del tumor debido a una ausencia de protocolos diagnósticos estandarizados [185,186].

Los estudios que insinúan la pequeña contaminación que pudo haber sufrido el resto de Europa a consecuencia de la explosión de Chernóbil [143, 237] y la ausencia casi segura de esta exposición en los casos colombianos, deja el tema abierto para futuras investigaciones. Habría que descartar niveles de CPLDIR en el resto de Europa, así como estudiar en el medio ambiente colombiano posibles factores asociados a la evidente diferencia.

La MVD por niveles de grado nuclear de Fuhrman y TNM

Analizando bibliográficamente la relación entre la cuantificación de los vasos tumorales y las clasificaciones clínico-patológicas existentes para el ccRCC, nos encontramos con conclusiones diversas y contradictorias. Nosotros hemos determinado que hay un incremento en la MVD en los tumores de bajo grado (grados 1, 2 y 3 de Fuhrman y estadio I, II y III de TNM), y por el contrario, hemos encontrado una disminución de la misma en los estadios de alto grado (Fuhrman 4 y IV de TNM), aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. Rubio-Briones y su grupo describieron resultados similares a los nuestros, pero con significancia estadística; ellos cuantificaron la MVD en 79 casos con ccRCC, mostrando una relación inversa con el diámetro tumoral y con el grado tumoral [163]. Los trabajos de Yildiz y los de Imao también muestran la misma relación inversa [164,165]. Por contra, otros autores no observaron relación entre la MVD y el estadio tumoral [168,169]. Y en el caso del trabajo de Romanenko se describieron mayor MVD en los grados tumorales de Fuhrman altos 3 y 4 [142].

En un reciente artículo de Edeline, publicado en el año 2012, se describe la existencia de dos posibles patrones en el árbol microvascular tumoral en 73 casos de ccRCC, denominados “High Angiogenic Phenotype” HAP y “Low Angiogenic Phenotype” LAP; observando una asociación estadísticamente significativa entre el patrón LAP con menor MVD, en los tumores TNM IV y grados de Fuhrman altos, relacionándolos con mayor agresividad y menor diferenciación tumoral [238]. Aunque ellos analizaron una menor cantidad de casos, sus resultados son comparables y similares a los nuestros; además, la procedencia diversa de nuestros casos aumenta el valor epidemiológico del hallazgo.

La aparente contradicción entre la relación de un carcinoma de células renales con baja MVD y su peor pronóstico, a diferencia de lo que ocurre en otros tumores, ha generado diversas hipótesis. La más defendida es la que apoya que hay una incapacidad de adaptación de la microvascularización a un gran crecimiento agresivo, dando paso al aumento de la permeabilidad vascular patológica [169]. Otra hipótesis defiende que el incremento de la MVD reflejaría una buena diferenciación, dado que la neoplasia se origina en la zona cortical renal que se encuentra muy vascularizada [170]. También se ha postulado que la formación de macrovasos por los tumores de rápido crecimiento condiciona un descenso de la MVD [171]. Por último Edeline en el año 2012, sugiere que el patrón LAP con menor MVD podría ser un paso previo a la metástasis [238].

Analizando nuestros resultados, pensamos que la misma heterogeneidad en la morfología vascular de los ccRCC, que hemos podido comprobar al seleccionar las imágenes para la cuantificación de la MVD, influiría en la proliferación vascular. Nosotros también encontramos dos regiones intratumorales: zonas periféricas de vasos largos y ramificados y zonas centrales con abundantes vasos cortos y estrechos. Las características de las denominadas zonas periféricas explicarían el sitio de inicio de las neoformaciones vasculares a partir de vasos pequeños ya existentes, mientras las zonas centrales explicarían los “hot spots” o zonas calientes de mayor angiogénesis. Estas descripciones podríamos relacionarlas con el crecimiento y diferenciación tumoral, sugiriendo que en los crecimientos máximos y poco diferenciados de los ccRCC, la abundante proliferación celular sobrepasa a los mecanismos de compensación vascular mientras que está creciendo el tumor. Esto explicaría las áreas de necrosis en las zonas centrales dejando relativamente mayor visibilidad de los vasos en las zonas periféricas, lo cual explicaría la disminución de la MVD en los ccRCC de peor pronóstico.

Un ejemplo de la relación anterior la observamos en los tres casos que fueron excluidos del estudio por poseer amplias zonas de necrosis; dichos casos fueron clasificados como TNM IV y Fuhrman 4. Además, la poca vascularización observable en estos casos inmunomarcados con CD31, era similar a nuestra descripción de las denominadas zonas periféricas.

Relación entre la MVD, la edad y los tipos de muestra

La trama vascular de órganos como el riñón muestra modificaciones a lo largo de la vida para su mantenimiento, adaptándose así a los cambios fisiopatológicos que acontecen en las diferentes etapas. Cuando analizamos en nuestros resultados la relación entre la cuantificación de los vasos y los diferentes niveles etarios, en las muestras de tejido renal normal, observamos una disminución de la MVD que fue inversa con la edad. En las muestras tumorales en cambio se observa un incremento significativo de la MVD total y de capilares en los dos grupos de edad extrema (menores de 35 y mayores de 65 años). Además, en el riñón normal y con ccRCC se observó una disminución significativa lineal del porcentaje de capilares, a medida que se aumentaba la edad. Similar a nuestros resultados son los publicados por Mehan: los pacientes mayores de 65 años de edad con ccRCC mostraron una MVD significativamente mayor [177].

Los hallazgos en la MVD por edad de nuestro estudio son atribuibles a que en el envejecimiento renal fisiológico se producen algunos fenómenos histológicos de glomerulosclerosis, atrofia tubular, fibrosis intersticial y fibrosis de la íntima arterial; dichos cambios fisiológicos podrían acelerar la progresión de algunos procesos patológicos [180,184]. También es posible que a lo largo de los años, el acoplamiento entre la neoarteriogenesis y su correspondiente angiogenesis tumoral se vea modificada y conduzca a una mayor remodelación de la microcirculación [178]. El aumento detectado de la actividad mitogénica tanto en células endoteliales como de la pared de los vasos sanguíneos de los ccRCC, sugiere que en la progresión de la neoplasia se activa la actividad angiogénica y la arteriogénica [178].

En el contexto de una isquemia tisular, la necesidad de formación de vasos más grandes (arterias colaterales) se atribuye al menor soporte estructural del tejido que está menos perfundido, al estrés, a la activación endotelial y a la afluencia de monocitos [179]. Los cambios fisiológicos del envejecimiento facilitarían la aparición de estos procesos a medida que aumenta la edad, explicando así la disminución del porcentaje de capilares por una redistribución adaptativa de la trama vascular. De igual manera el envejecimiento podría influir a nivel molecular, estructural y funcional en los vasos renales tumorales, afectando posiblemente al crecimiento neoplásico y a la formación de

metástasis [180], así como a la agresividad [181] y a los efectos de las diversas terapias [182], incluyendo los agentes antiangiogénicos. Las discrepancias observadas en los distintos trabajos respecto al valor pronóstico de la MVD en el ccRCC podrían ser explicables por las alteraciones debidas a la edad, ya que este dato habitualmente no se valora [177].

3.2.3 Expresión de factores

Comportamiento de expresión de factores en general por tipo de muestra

Actualmente el análisis de la expresión inmunohistoquímica de muchas moléculas ha sido fundamental en el diagnóstico, pronóstico y enfoque del tratamiento de diferentes entidades patológicas [173]. En el proceso angiogénico del carcinoma renal de células claras, al igual que en otros tumores sólidos, están implicados factores que estimulan tanto la proliferación celular del endotelio vascular como la reestructuración de la trama vascular del tejido neoplásico [146,148,149]. De estos, hemos analizado la expresión de una molécula de adhesión (VE-cadherina), tres factores (VEGF, FGF-2 y HIF-1 α) y cuatro receptores (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y PDGFR- α), observándose en el tejido renal sin neoplasia un mayor porcentaje y altos niveles de expresión, comparados con las muestras de ccRCC; estas diferencias resultaron estadísticamente significativas.

De forma similar a nuestro estudio, aunque con diferencias en los niveles de su expresión, encontramos que Johnson y colaboradores, en un trabajo experimental utilizando un modelo de riñón remanente, compararon la expresión del VEGF en el riñón normal y en el riñón enfermo; concluyendo que la expresión positiva en el riñón normal del VEGF podría preservar la función renal, por medio de su capacidad de estimular la reparación endotelial y mantener la densidad capilar [195]. Otros autores igualmente encontraron que la proteína VEGF-ARN_m se expresa en el cerebro, riñón, hígado, pulmón y bazo de la rata adulta sana, mediante análisis de PCR_e hibridación in situ [202]. También el grupo de Stroka detectó expresión de HIF-1 α , especialmente nuclear, en tejido renal en condiciones normóxicas (21% O₂) [173]. En otros dos estudios el HIF-1 α y 2 α ARN se expresaron intensamente en tejidos normales muy vascularizados, tales como pulmón, corazón, placenta, y riñón [200,201].

A diferencia de nuestros resultados, otros autores encuentran que los tejidos con RCC muestran un incremento de la expresión de los factores angiogénicos cuando se comparan con la del tejido renal normal, especialmente el VEGF, el HIF-1 α y el FGF y su familia de receptores [198,199,204]. Además el estudio de Talks mostró muy poca expresión de HIF-1 y 2 α en cultivos celulares de tejidos normales, con la excepción de la médula ósea [202].

Como es sabido, los factores que participan en la angiogénesis y sus receptores están en los tejidos desde la vida embrionaria [75,76], mientras que su expresión en tejidos normales en la vida adulta depende de diversas condiciones. Así, en órganos como el pulmón y el riñón, cuya función depende de su trama vascular, el mantenimiento en la concentración de oxígeno requiere un nivel de proteína HIF-1 α y de VEGF, para poder mantener la homeostasis del tejido [201]. En coherencia con lo anterior, los tejidos que requieren mejorar su condición vascular, como sucede en algunas neoplasias durante su fase de crecimiento incontrolado, alteran los patrones de expresión de los factores participantes en su regulación [36].

Es esperable que en el tejido renal tanto normal como neoplásico, se expresen positivamente los diferentes factores. En el riñón normal, debido a que el riñón adulto está continuamente remodelando su trama vascular y también a que está expuesto a continuos cambios de presiones de O₂ [201]. En el riñón neoplásico, debido a su conocida dependencia de la angiogénesis para su crecimiento [10,73,74].

Si bien podíamos esperar positividad de la expresión de los distintos factores en el riñón normal y peritumoral, nuestros resultados mostraron positivities más intensas que las encontradas en la bibliografía. Dentro de las probables explicaciones están las dificultades en la forma de obtención de las muestras, donde a pesar de utilizar un protocolo para el procesamiento uniforme de las muestras, las obtenidas por autopsia tuvieron un tiempo variable de hipoxia no controlable y en las obtenidas por medio quirúrgico (nefrectomía) resultó difícil evitar los niveles de hipoxia y sufrimiento del tejido renal. De acuerdo al tiempo de hipoxia previa del tejido, ocurren eventos celulares similares a la reacción aguda de la insuficiencia renal. También es posible que la alta intensidad de la positividad se trate de artefactos del inmunomarcaje que resultan por liberación posterior a hipoxia de biotina endógena encontrada en células ricas en mitocondrias, como las de los túbulos contorneados proximales [218,219]. Esto sucede cuando se utiliza un sistema de detección inmunohistoquímica tipo avidina-biotina (fig. 3.3), debido a la mayor actividad de unión de esa biotina endógena luego de la recuperación antigénica inducida por calor [220,221].

Comportamiento de expresión de factores por grupos de estudio

El factor de crecimiento endotelial vascular es conocido como uno de los estimulantes más específico del endotelio vascular [38,152], lo que facilita el análisis de su expresión. Al analizar la expresión del VEGF observamos variaciones sin significancia estadística en los resultados de los riñones normales y los tejidos peritumorales, mientras en nuestros casos con ccRCC fue muy

relevante el alto porcentaje de expresión de 49% en el grupo ucraniano de la zona radiocontaminada, muy por encima de los promedios observados en los otros grupos que oscilaron entre 13 y 35%. Además, mientras los ccRCC sin exposición oficial a IR algunos casos mostraron ausencia de expresión (0), en el grupo expuesto todos los casos fueron positivos (1) para dicho marcaje.

También hemos encontrado en nuestro trabajo, que en el grupo de tumores procedentes de la zona contaminada de Ucrania existe un aumento estadísticamente significativo de la MVD asociado a un aumento en la expresión de VEGF, y aunque en la bibliografía no se ha descrito que exista una correlación entre la expresión del VEGF y la exposición a irradiación, podemos apoyar nuestros resultados en la suma de dos conceptos: algunos autores describen una mayor proliferación celular influenciada por CPLDIR [143,138]; y además la angiogénesis resultante en estos casos busca suplir las necesidades de oxigenación producidas por el aumento incontrolado de células [2,10]. Así se explicaría el relevante incremento de la expresión de VEGF.

La comparación de la expresión del VEGF en los grupos sin exposición a IR no mostró un patrón específico, lo que concuerda con los diversos resultados hallados en otros estudios [243,244,245] en los que generalmente el aumento de la expresión de dicho factor se asoció con niveles altos de atipia nuclear y/o estadio clínico del ccRCC. En nuestra población tumoral sin exposición a IR no fue clara esa misma asociación del VEGF como factor pronóstico independiente, en cambio, se observaron asociaciones particulares por grupo. En los casos del grupo español, donde encontramos el mayor promedio de VEGF de los ccRCC no irradiados, también observamos un menor número de casos clasificados como Fuhrman altos, frente a los otros grupos. Otro caso particular se observó en el grupo colombiano que mostró menor promedio de VEGF teniendo un mayor número de casos con TMN III y IV.

La observación de un elevado número de casos clasificados como Fuhrman 3 y 4 dentro del grupo de la zona contaminada de ucrania, que en nuestro estudio tuvo un nivel muy elevado de expresión de VEGF, podría llevarnos a considerar a este biomarcador como un factor pronóstico independiente; sin embargo, esta independencia en su poder pronóstico disminuye cuando analizamos el otro grupo ucraniano procedente de una zona sin radiocontaminación, habiendo tenido una distribución similar en la graduación nuclear de sus casos, la expresión del VEGF y su correspondiente densidad microvascular fueron significativamente menores. Esto a su vez apoya la hipótesis de los niveles de exposición persistente de bajas dosis de radiación ionizante como el origen de estas diferencias.

El factor inducible por hipoxia HIF-1 α es un participante reconocido en muchos procesos homeostáticos celulares, especialmente como factor de transcripción envuelto en las respuestas celulares y sistémicas a la hipoxia [11,222]. La expresión del HIF-1 α es muy importante por la multiplicidad de procesos en los que se implica, si a esto le agregamos su presencia en todas las células, su formación cíclica constante y sus cortos tiempos de expresión e inhibición [223], se explican las dificultades de una correcta interpretación.

En el presente trabajo encontramos variaciones sin significación estadística de la expresión de HIF-1 α en los riñones normales y los tejidos peritumorales. En cambio en nuestros ccRCC, si bien el número de casos positivos fue similar en todos los grupos, el nivel de expresión fue muy superior en los casos procedentes de la zona radiocontaminada de Ucrania, con diferencias que fueron estadísticamente significativas

La exposición persistente a dosis bajas de radiación ionizante [142,143] y la mayor expresión de HIF-1 α [209,210] se han relacionado por separado con una mayor agresividad tumoral. Nosotros, sin embargo, podemos aseverar apoyándonos en nuestros resultados que hay una relación directa entre la CPLDIR de los ccRCC y el nivel de expresión del HIF-1 α , correspondiente con las diferencias estadísticamente significativas en la MVD presentes en los casos de Ucrania, en especial de la zona radiocontaminada. En coherencia con estos resultados están las asociaciones mostradas en trabajos realizados anteriormente entre nuestro grupo y Alina Romanenko, [133,134,135,137,142], en aspectos como la mayor inhibición de la apoptosis, alteraciones en la matriz extracelular y el aumento significativo de la MVD que sugieren la mayor agresividad de los ccRCC procedentes de Ucrania en especial de la zona contaminada sin haber sido relacionada con la expresión de factores como el HIF-1 α .

Tres de los participantes del proceso angiogénico que hemos estudiado son **el FGF-2**, que ha sido relacionado con la actividad mitogénica, básica para las células endoteliales, los fibroblastos y las células musculares lisas [150,157], **el PDGFR- α** , un receptor relacionado con la actividad del factor de crecimiento derivado de plaquetas que actúa tanto en el desarrollo embrionario, la proliferación celular, la migración celular y la angiogénesis [89,90] y **la VE-cadherina** una molécula de adhesión a la que el VEGF induce su fosforilación de las tirosinas provocando la desestabilización de los contactos entre las células endoteliales [95]. Estos factores mostraron patrones de comportamiento que confirman su participación activa en los mecanismos de angiogénesis en base a el alto

porcentaje de expresión visto en nuestro estudio, que ha sido muy similar para los tres. Sin embargo, no se observaron diferencias intergrupales significativas para cada uno de estos factores.

En otros estudios con RCC se han comunicado porcentajes de expresión altos muy similares a los vistos en nuestro trabajo [239,240,241,242], sin embargo no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que permitiese asociarlos como factores pronósticos.

La explicación para que en nuestro estudio, el **FGF y PDGF**, a pesar de haber mostrado los mayores porcentajes de expresión, no evidenciaran diferencias estadísticamente significativas entre los ccRCC procedentes de distinta influencia ambiental, es la conocida participación de ellos en múltiples y simultáneos mecanismos tisulares [89,90,151,157], lo que podría explicar sus elevados niveles junto a su poca especificidad sobre la respuesta angiogénica representada en la cuantificación de la MVD.

Con la **VE-cadherina** resultó más relevante la existencia de estructuras vasculares peor organizadas del grupo ucraniano expuesto a CPLDIR, que sus altos niveles de expresión. Estos a pesar de ser altos, eran menores que en los grupos no expuestos a CPLDIR, aunque con diferencias estadísticamente no significantes. Esta peculiaridad se puede añadir al patrón agresivo existente en los casos de ccRCC expuestos de forma crónica a bajas dosis de radiaciones ionizantes gracias a que la disminución de la expresión de las moléculas de adhesión especialmente la E-cadherina está asociado a la agresividad tumoral [242].

Correlaciones por grupo de la expresión de factores

Cuando la neoformación vascular se origina a partir de vasos preexistentes y no a partir de células precursoras, el VEGF estimula la supervivencia de las células endoteliales, su proliferación y su motilidad, iniciando así la gemación de nuevos capilares. Los miembros de la familia VEGF realizan su función en las células diana a través de tres receptores con actividad tirosina-quinasa intrínseca: el VEGFR-1, el VEGFR-2 y el VEGFR-3 localizados en células endoteliales y en otros tipos celulares [37,154]. La expresión de los **receptores 1, 2 y 3 del VEGF**, que fueron los tres restantes factores estudiados, se correlacionaron con la expresión simultánea del factor de crecimiento endotelial vascular en cada grupo de nuestro estudio.

En el grupo procedente de la zona contaminada de Ucrania, los tres VEGFRs y el VEGF mostraron un porcentaje de expresión similar entre ellos, incluso entre los casos que mostraron un TNM alto o

bajo. En cambio en los otros tres grupos tumorales, no expuestos a radiocontaminación, se encontró que el porcentaje de expresión de VEGF fue mucho menor para sus tres receptores, predominando significativamente la expresión del VEGFR-1 y 2 en los casos españoles clasificados como TMN I y II y la expresión del VEGFR-3 en los casos colombianos TMN III y IV. Kluger y colaboradores encontraron resultados similares a los nuestros. Para ellos la expresión de VEGF y sus receptores, especialmente el 1 y el 2, se correlacionaron significativamente tanto en los carcinomas renales como en su tejido adyacente y las células endoteliales; dicha correlación estuvo asociada significativamente con el grado nuclear, sin embargo los receptores contemplados individualmente no tuvieron significación pronóstica [226]. También para estos autores la alta expresión del VEGFR-3 se asoció con carcinomas de células renales en estadios TNM III y IV.

Análogo a lo observado en nuestros casos tumorales sin exposición a IR, para el grupo de Kato, se correlacionó significativamente la expresión del VEGF con la conjunta de sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2. En dicho trabajo estos receptores no evidenciaron una contribución directa a la progresión tumoral, a pesar de que el VEGF sí estuvo intensamente asociado con alta MVD y criterios clínico-patológicos de mal pronóstico [227].

En contra de nuestros resultados, sobre 104 pacientes con RCC Ljungberg, no encontraron significativa la correlación mencionada de los niveles de expresión de los VEGFR-ARNm [228]. La diferencia con nuestro estudio puede explicarse porque en el trabajo de Ljungberg, ellos cuantificaron la expresión del ARNm y no de la proteína del receptor; además, en su medición pudo haberse presentado la inclusión de elementos del estroma al realizar RT-PCR en sus muestras congeladas. Estos dos aspectos pudieron modificar los valores esperados.

El anticuerpo utilizado en nuestro estudio para el inmunomarcaje del VEGF es específico para VEGF-A, por lo que su relación con la angiogénesis estudiada en nuestros casos estaría más relacionada con las respuestas celulares mediadas por el VEGFR-2, sin embargo está documentado que el VEGFR-1 podría secuestrar VEGF para evitar su unión con VEGFR-2, modulando su hiperestimulación [213]. Coherente a estos datos la expresión presente en el grupo español y los dos grupos ucranianos podría explicarse como patrones específicos de respuesta a la expresión de VEGF. En el grupo español la alta expresión del receptor 2 del VEGF en los TNM bajos (I y II), es coherente con lo visto en otros estudios de angiogénesis tumoral [213]; mientras que en los grupos ucranianos el mayor aumento del VEGF, especialmente en los portadores de ccRCC con TNM altos, se acompaña de un aumento no significativo en la expresión del receptor 1, esto estaría explicable

por el intento de controlar el exceso de VEGF impidiendo una estimulación excesiva de los VEGFR-2.

Para los resultados obtenidos en el grupo de ccRCC colombianos, el incremento significativo en la expresión del VEGFR-3 en los casos estadificados como TNM III y IV, la bibliografía sugiere una asociación con los mecanismos de linfangiogénesis en los ccRCC [37,154,213]. Además si tenemos en cuenta que los casos con TNM altos en España fueron solo el 16% del total del grupo y no hubo casos con estadio IV mientras que en el grupo colombiano el 58% de sus casos se clasificaron en esos estadios altos (33% TNM III y 25% TNM IV), muy similar a lo descrito en la serie de RCC de Kluger [226], lo que nos permitiría concluir que los carcinomas renales de células claras no expuestos a CPLDIR con incremento en la expresión del VEGFR-3 están también asociados con una alta linfangiogénesis.

El factor inducible por hipoxia y el factor de crecimiento endotelial vascular tienen una conocida relación funcional. Por ello, el análisis de su expresión simultánea ha sido utilizado para intentar explicar diferentes patrones de actividad angiogénica tumoral, asociados como factores pronósticos en los carcinomas de células renales [212,215]. En nuestro estudio, la expresión de VEGF superaba a la de HIF-1 α en los grupos europeos, asociándose esta tendencia con un mayor incremento de angiogénesis y mayor porcentaje de capilares; mientras que en el grupo colombiano el patrón de correlación se mostró invertido, mayor expresión de HIF-1 α y menor de VEGF, asociándose con menor MVD del total de vasos y menor porcentaje de capilares.

Sin embargo, la máxima expresión de esta correlación la encontramos en el grupo ucraniano con una mayor exposición a CPLDIR, donde vemos que a pesar de mostrar el mencionado patrón europeo, ambos factores se expresaron con porcentajes significativamente mayores a los obtenidos en los otros grupos y a su vez un mayor incremento en su MVD del total de vasos y su porcentaje de capilares.

En coherencia con nuestros resultados la publicación del año 2009 de Dordevic describe un aumento en la expresión de VEGF-A y HIF 1 α citoplasmático en células tumorales, describiendo un subtipo más agresivo de ccRCC que podría tener ciertas implicaciones clínicas y pronósticas [212]. Ese denominado subtipo agresivo se ve exacerbado en nuestro grupo de carcinomas de células renales claras procedentes de la zona de mayor exposición a CPLDIR de Ucrania. Datos concordantes son los de Minardi, que publica en un estudio con seguimiento posterior de pacientes, la mayor expresión

del VEGF y el HIF-1 α se correlacionó con el pronóstico de tumores en estadio altos, donde VEGF fue el factor pronóstico independiente más importante de muerte por cáncer específico [229]. Este hecho no pudo ser verificable en nuestro estudio atendido el tipo de diseño que se ha escogido.

Las evidencias morfométricas obtenidas simultáneamente, tanto de la expresión de ciertos factores como de la cuantificación de su posible respuesta angiogénica, son de gran ayuda en el entendimiento del comportamiento de un tejido neoplásico. Más aún cuando analizamos procesos complejos como la angiogénesis en los ccRCC de pacientes expuestos persistentemente a un comprobado condicionante ambiental de la proliferación celular, como son las bajas dosis de radiaciones ionizantes. Por eso, el comportamiento de la correlación mostrada entre el HIF-1 α , el VEGF y la MVD tumoral de los ccRCC en cada grupo del estudio, nos permitió sugerir diferentes patrones de respuesta en los grupos de acuerdo a los diferentes niveles de exposición a CPLDIR.

La correlación de los promedios de expresión de los factores mencionados en los grupos sin exposición a IR, explicaría la diferencia en la respuesta angiogénica entre los grupos procedentes de España y Colombia. Una mejor respuesta angiogénica (mayor incremento tanto de la MVD como del porcentaje de capilares) observada en el grupo español estaría asociado con su mayor nivel de expresión del VEGF, y el menor nivel de hipoxia resultante sería la explicación de su menor nivel de HIF-1 α . En cambio para el grupo colombiano la respuesta angiogénica observada fue menor (menor incremento tanto de la MDV y como del porcentaje de capilares), coherente con su bajo nivel de expresión del VEGF, lo que sugiere que su mayor nivel de hipoxia estaría asociado con el incremento de la expresión, probablemente reactiva, del HIF-1 α .

Para el caso del grupo ucraniano de la zona más expuesta persistentemente a pequeñas dosis de IR, la tendencia en la correlación entre los dos factores en discusión es parecida a la observada para el grupo español, pero con niveles mucho más altos del VEGF, lo que sugiere su asociación con el incremento significativo en la MVD y un aumento del porcentaje de capilares. Aunque estos ccRCC expresen mayor nivel de HIF-1 α que los no expuestos, dicho nivel no supera, ni iguala al promedio del VEGF. La mayor expresión de HIF-1 α en este grupo en comparación con los no expuestos estaría asociada con la radiocontaminación, mientras que su menor nivel de expresión en comparado con el del VEGF podría ser explicado por su relativo menor nivel de hipoxia evidenciado en su mayor porcentaje de capilares.

La correlación entre estos factores y su correspondiente respuesta angiogénica para el grupo ucraniano de la zona limpia, también fue similar al observado en el grupo español, pero con un nivel

ligeramente mayor de HIF-1 α . Esta combinación sugiere que esta diferencia en el nivel de HIF-1 α podría estar debida a las transformaciones celulares influenciadas por la exposición persistente a dosis menores de IR [143], aunque también es posible que al haber una mayor cantidad de casos clasificados en estadios TNM altos, en este grupo pudiera haber distorsionado el resultado.

Las características tumorales de cada grupo de estudio tuvieron una clara influencia en el establecimiento de un patrón para la correlación existente entre la respuesta angiogénica y el porcentaje de expresión del HIF-1 α y del VEGF; pero, sin duda alguna, en nuestro estudio la CPLDIR mostró ser un factor determinante para el establecimiento de un patrón más agresivo.

3.2.4 Patrones de expresión celular

Patrones de expresión celular por tipos de muestra

La distribución intracelular de la inmunoexpresión en las células epiteliales normales de los túbulos renales o su correspondiente transformación neoplásica la hemos denominado Patrón de Expresión Celular (PEC). El estudio de este patrón nos ha permitido, en algunos casos, correlacionar la distribución de la expresión con el momento evolutivo del tumor [212].

En nuestro estudio observamos varios tipos de patrones de expresión, tres de ellos en las muestras de riñones sin neoplasia (riñón normal y zonas peritumorales): citoplasmático difuso, apical y basal; y dos en las muestras con ccRCC: citoplasmático difuso y peri-membranoso. En las muestras de tejidos renales normales predominó una distribución citoplasmática difusa; en las muestras peritumorales una expresión celular citoplasmática apical; y en las muestras tumorales una distribución citoplasmática periférica o peri-membranosa. Aunque en todos los tejidos encontramos los distintos patrones respectivos, solo en el riñón normal apareció el patrón de expresión denominado basal, aunque de forma poco evidente.

Al revisar la bibliografía disponible no hallamos descripciones de los patrones de distribución de expresión inmunohistoquímica en el riñón normal o en zonas peritumorales. La atención de las publicaciones se centra especialmente en los patrones de distribución citoplasmática difusa o citoplasmática peri-membranosa presentes en el carcinoma renal, descrito por Yildis [216] y por Jacobsen [217] para el VEGF. Este último le restó importancia a la expresión inmunohistoquímica peri-membranosa del VEGF, por suponer que era debida a el mayor tiempo de fijación de las muestras en parafina. Sin embargo para Dorevic [212], el tipo de PEC difuso ó peri-membranoso resultó ser más importante que otros parámetros pronósticos. En efecto la distribución

citoplasmática difusa del VEGF-A y C se asoció con un mayor grado nuclear, mayor tamaño del tumor, peor estadio del tumor y mayor expresión de HIF-1 α .

Las células epiteliales en general tienen una característica de polarización que permite interpretar en situaciones normales la distribución de su inmunoexpresión. La distribución basal observada únicamente en las muestras de tejido renal normal, aunque en pocos casos, podría atribuirse a acumulación de sustancias de secreción basal de función paracrina [219]; aunque una distribución de expresión inmunohistoquímica atípica podría sugerir algún tipo de artefacto producido en el procesado del tejido [219].

Es posible que en las células expuestas a hipoxia severa, en sus primeras etapas de destrucción del tejido casi imperceptible morfológicamente, se puede liberar biotina endógena existente en las células ricas en mitocondrias como las de los túbulos contorneados proximales [218,219], posteriormente durante la recuperación antigénica inducida por el calor podría incrementarse la actividad de unión de la biotina endógena a la avidina, produciéndose marcajes de falsas positivas al utilizar un sistema de detección inmunohistoquímica tipo avidina-biotina [220,221]. Este tipo de tinción se localiza con más frecuencia en el citoplasma, generalmente con patrón moteado como el observado en la distribución basal de algunos tejidos renales normales de nuestro estudio ó granular como en la distribución apical presente en numerosas muestras peritumorales. Muchos de estos cúmulos son entendidos por el sistema de cuantificación de intensidad de marcaje que hemos empleado como “strong o fuerte”, lo que pudiera haber contribuido a porcentajes mayores de positividad que habría afectado a las muestras normales y más especialmente a las peritumorales.

En las muestras con ccRCC vemos la expresión citoplasmática que evidencia dos momentos de la transformación neoplásica de la célula epitelial de los túbulos renales. El citoplasma repletos de glucógeno y lípidos, que nos hace reconocerla como una célula con abundante citoplasma claro y los límites celulares bien definidos [29,30,31]. Consideramos por ello lógicas tanto la distribución de la expresión inmunohistoquímica citoplasmática difusa como la peri-membranosa o periférica. En este estudio la mayoría de ccRCC presentaron en todos los grupos una predominante distribución de la expresión perimembranosa.

Correlación entre MVD y PEC en muestras de tejido renal normal

En la correlación entre el tipo de distribución celular de la expresión para los factores angiogénicos y la MVD en el riñón normal, únicamente tuvo significación estadística entre la mayor densidad microvascular de capilares en las muestras con patrón basal teñidos con HIF-1 α y que mostraban un patrón difuso.

Aunque no encontramos publicaciones que discuten un comportamiento similar, la importancia del HIF-1 α , y el VEGF en la regulación y mantenimiento de la trama vascular renal esta evidente tanto a nivel animal como humano [38,152,223]. Esto nos brinda la posibilidad de buscar una interpretación a este hallazgo aislado. El aumento significativo del porcentaje de expresión del HIF-1 α , en los riñones normales con PEC basal asociado con el aumento de la MVD de capilares en esos casos, sugiere una relación entre ese tipo de distribución de la expresión celular con un aumento de la actividad del HIF-1 α , que explicaría el proceso de mantenimiento de la trama vascular. Bien es cierto que los datos referentes a la expresión de otros factores como el VEGF no confirman esta apreciación.

Correlación entre MVD y PEC en muestras tumorales

Los patrones de tinción citoplasmática de ciertos factores han sido estudiados en la citología de varias neoplasias, generalmente, en busca de una posible asociación con la agresividad del tumor que permitiera atribuir un carácter pronóstico tumoral. En este estudio la distribución del patrón de expresión citoplasmática difusa de HIF-1 α fue similar a la descrita por Dorevic, mostrando mayor expresión citoplasmática difusa en los estadios TNM altos (III y IV) [212]. Por contra Lindgren ha señalado que el nivel HIF-1 α citoplasmático en pacientes con ccRCC, fue significativamente mayor en los tumores localizados (TNM I y II) que en los invasivos (TNM III y IV) [230].

A nuestro juicio los patrones de distribución de la expresión citoplasmática poseen un grado de subjetividad alta por parte del observador y dependen en gran medida de la ubicación de la muestra dentro del tumor y de donde rehaga la toma de la imagen a evaluar; de manera que en zonas de mayor o menor proliferación de células tumorales, se observarán a su vez mayor o menor cantidad de células con citoplasma peri-membranoso, típico de una célula clara de los RCC. Estos aspectos explicarían lo contradictorio y poco claro que resultan los estudios sobre el tema, preciándose un gran cuidado al diseñar el análisis de estos patrones ya que generalmente han sido analizados como observaciones secundarias dentro de trabajos diseñados para el análisis de la MVD o para los niveles

de expresión de distintos factores. Ello hace presumir que para el análisis de los PEC se utilizan también los “hot spots” escogidos para estudiar la zona más vascularizadas del tumor, causando sesgos.

En nuestros casos tumorales al comparar los dos tipos de PEC citoplasmático del VEGF y HIF-1 α , la MVD no presento diferencias significativas. Solo vimos diferencia estadísticamente significativa en muestras tumorales con una distribución difusa de la expresión para la VE-cadherina, ofreciendo un incremento de la MVD.

La proteína de adhesión denominada VE-cadherina es específica del endotelio de los vasos y participa en la reestructuración de los mismos durante el proceso angiogénico, lo que podría conllevar a una respuesta de síntesis de la misma para intentar remodelar las nuevas estructuras vasculares y las preexistentes recién transformadas [246]. Un aumento de su expresión en las células neoplásicas en los casos con patrón difuso, sugiere una mayor síntesis de la misma simultánea al aumento de la MVD.

Esta hipótesis se refleja mejor al analizar el grupo de tumores procedente de la zona contaminada de Ucrania, donde se vimos diferencias estadísticamente significativas con PEC citoplasmático difuso mostrando más alto promedio de expresión de esta molécula de adhesión acompañado de una mayor MVD del total de vasos y capilares. Aunque los patrones difusos de la expresión citoplasmática de cadherinas han sido descritas en RCC sin exposición a IR [246], en nuestro trabajo más del 80% de los casos con PEC citoplasmático difuso de la VE-cadherina pertenecieron al grupo ucraniano de la zona radiocontaminada. Esto implicaría una asociación entre la CPLDIR y una mayor presentación del PEC citoplasmático difuso con las consiguientes implicaciones antes comentada de la respuesta angiogénica.

Ello obliga a resaltar la necesidad de realizar un diseño correcto para la evaluación del PEC en los ccRCC basados en técnicas bien sistematizadas de análisis de imagen microscópica. Con ello se minimiza la subjetividad y se obtienen mejores resultados. En nuestro hemos comprobado como el estudio de los factores pro-angiogénicos y de su respuesta angiogénica (MVD), mediante técnicas de inmunohistoquímica y el complemento morfométrico sistematizado fue de gran valor para obtener de resultados comprobables científicamente.

4. CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

1.-Efectuamos un estudio morfométrico e inmunohistoquímico, mediante un análisis de imagen semiautomático, que ha permitido objetivar el comportamiento de la angiogénesis en el carcinoma renal de células claras (ccRCC), comparándolo con el tejido peritumoral y el tejido de riñones normales no portadores de tumor. Este estudio lo hemos efectuado utilizando tumores procedentes de dos zonas con diferente nivel de irradiación en Ucrania, comparándolas con dos zonas geográficas no contaminadas por la irradiación en España y Colombia.

2.- En los ccRCC la densidad microvascular (MVD), que incluye capilares, vasos de pequeño y de mediano calibre presentes por mm^2 , es superior a la existente en el tejido renal adyacente al tumor y a la existente en el riñón normal con valores estadísticamente significativos.

3.- El mayor incremento de la angiogénesis en los ccRCC está relacionada con el género en una proporción 1.4:1 hombres/mujeres, con los grupos de edad (< de 35 y > de 56 años), los grados nucleares de la clasificación histológica de Fuhrman 2 y 3, así como con el estadio clínico TNM III y IV.

4.- Confirmamos que la angiogénesis tumoral está también relacionada con la exposición a dosis bajas de radiaciones ionizantes, encontrándose su máxima expresión en la zona contaminada de Ucrania. Por el contrario es menor en los tumores de las poblaciones no expuestas a la irradiación en España y Colombia.

5.- Hemos encontrado en las células del ccRCC una expresión intensa con localización citoplásmica de VE-cadherina, FGF-2, y PDGFR- α , pero sin verse diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de población estudiados. También el grado de expresión de estos tres factores es independiente del nivel de irradiación en la población de Ucrania.

- 6.- Comprobamos que la expresión de VEGF es directamente proporcional al aumento del número de vasos y al mayor porcentaje de capilares en los ccRCC de todas las muestras estudiadas, independientes del área geográfica.
- 7.- Hemos podido determinar dos patrones distintos del comportamiento de la expresión de los receptores del VEGFR 1, 2 y 3 que están relacionados con el estadio clínico TNM, pero son independientes de su localización geográfica. Hay una mayor expresión del VEGFR-1 y 2 en los TNM I y TNM II mientras que la expresión del VEGFR-3 es más intensa en los TNM III y TNM IV.
- 8.- La expresión del HIF-1 α es proporcionalmente menor cuanto mayor es la MDV en los ccRCC procedentes de regiones no expuestas a las radiaciones ionizantes de España y Colombia.
- 9.- Analizando comparativamente la expresión de distintos factores de proliferación vascular y la angiogénesis en función de su MDV, se observan tres patrones de comportamiento distintos:
- Un índice bajo de MVD asociado a una expresión alta de HIF-1 α y baja de VEGF presente en tumores con estadios TNM III y IV de España y Colombia.
 - Un índice alto de MVD asociado a una expresión baja de HIF-1 α , y alta de VEGF presente en tumores con estadios TNM I y TNM II procedentes España y Colombia.
 - Un índice muy elevado de MVD con una expresión intensa de HIF-1 α y VEGF, en los ccRCC procedentes de las zonas expuestas a radiación ionizante en Ucrania, independiente del TNM.
- 10.- En base a los resultados logrados y a las conclusiones anteriormente expuestas podemos establecer un perfil biológico de estos tumores netamente distinto, fundamentados por los patrones de angiogénesis y de expresión de los factores de crecimiento vascular relacionados con su localización geográfica y por la irradiación recibida. Distinguimos, por tanto, los carcinomas renales de zonas geográficas libres de irradiación (España y Colombia) de los carcinomas renales procedentes de las dos zonas de exposición persistente de radiaciones ionizantes de baja intensidad (Ucrania).

5. BIBLIOGRAFIA

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Burri P, Hlushchuk R, et al. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental dynamics. An official publication of the American Association of Anatomists*, 2004; 231(3):474-488.
2. Extraído de: www.cancer.gov/espanol/cancer/entendiendo/angiogenesis/Slide3.
3. Khosravi Shahi P., et al. Angiogénesis neoplásica. *Anales de Medicina Interna* 2008;25(7):366-369.
4. Raica M. Angiogenesis in pre-malignant conditions, review, *European Journal of Cancer*, 2009; 45: 1924-1934.
5. Jiménez-Rios y Solares-Sánchez. Angiogenesis en cancer renal. *Cancerología*, 2006; 1: 113-121.
6. Boticario C. y Cascales M. Hipoxia y Cáncer. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacología*, 2010; 76(3): 379-408.
7. Djonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis, *Cell and Tissue Research*, 2003; 314(1):107-117.
8. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treatment and Research*, 2004;117:3-32.
9. De la Torre J., Sholar A. (2006). Wound healing: Chronic wounds. www.Emedicine.com. Accessed January 20, 2012.
10. Extraído de [/www.springerimages.com/Images/Biomedicine/1-10.1007_s10555-007-9094-7-0](http://www.springerimages.com/Images/Biomedicine/1-10.1007_s10555-007-9094-7-0).
11. Mizukami Y. Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis. *Clinic Cancer Research*, 2007; 13(19):5670-5674.
12. Jemal A., et al. *Cancer Statistics, 2010*. *CA Cancer Journal Clinic*, 2010; 60: 277-300.
13. Extraído de www.seom.org.es, Sociedad Española de Oncología Médica.
14. Janzen NK., et al. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. *The Urology Clinic of North America*. 2003;30: 843-852.
15. Abrams TJ., et al. SU11248 Inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor β in preclinical models of human small cell lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2003; 2: 471-478.
16. Escudier B., et al. TARGET Study Group Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *New England Journal Medicine*. 2007; 356: 125-134.
17. Oya M. Renal cell carcinoma: Biological features and rationale for molecular-targeted therapy. *Keio Journal Medicine*. 2009; 58: 1-11.
18. Parkin DM., et al. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *International Journal of Cancer*, 1999; 80: 827-841.
19. Chow WH., et al. incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA*, 1999; 281: 1628-1631.
20. Russo P. Renal cell carcinoma: presentation, staging, and surgical treatment. *Seminars in Oncology*, 2000; 27: 160-176.

21. Godley P., et al. *Renal cell carcinoma. Current Opinion Oncology*, 2002; 14: 280-285.
22. Choyke PL, et al. *Renal cell carcinoma staging. American College of Radiology. ACR appropriateness criteria. Radiology*, 2000; 215: 721-725.
23. Hari k., et al. *Molecular aspects of renal cell carcinoma: a review. American Journal Cancer Research*, 2011; 1(2): 240-254.
24. Kovacs g., et al (UICC-OMS). *The Heidelberg classification of renal cell. Journal of pathology*. 1997;183:131-133.
25. Algaba F., y cols. *Aplicación clínica de las actuales clasificaciones del cáncer renal. Actas Urológicas Españolas*, 2006; 30(4):372-385.
26. Yoshida SO, et al. *Proximal renal tubular surface membrane antigens identified in primary and metastático renal cell carcinomas. Arch Pathol Lab Med* 1986; 110; 825-832.
27. Odmer D., et al. *Understandin familial and non-familial renal cancer. Hum Mol Genet*, 2002;11: 2489-2498.
28. López José I, et al. *Carcinomas renales con células claras. Revista española de patología*, 2008; 41(3):169-182.
29. Grignon DJ, et al. *Clear cell renal cell carcinoma. Clinical Laboratory Medicine*, 2005;25(2):305-316.
30. Krishnan B, et al. *Renal epithelial neoplasms: the diagnostic implications of electron microscopic study in 55 cases. Human Pathology*, 2002; 33(1): 68-79.
31. Fuhrman SA, et al. *Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. American Journal Surgery Pathology*, 1982; 6(7): 655-663.
32. Delahunt B. *Sarcomatoid renal carcinoma: the final common dedifferentiation pathway of renal epithelial malignancies. Pathology*, 1999; 31(3): 185-190.
33. De Peralta-Venturina M, et al. *Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. American Journal Surgery Pathology*, 2001; 25(3): 275-284.
34. Cheville JC, et al. *Sarcomatoid renal cell carcinoma: an examination of underlying histologic subtype and an analysis of associations with patient outcome. American Journal Surgery Pathology*, 2004; 28(4): 435-441.
35. Yang XJ, et al. *Classification of renal neoplasms based on molecular signatures. Journal Urology*, 2006; 175: 2302-2306.
36. Berse B, et al. *Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. Clinic Experimental Immunology*, 1999; 115: 176-182.
37. Meyer M, et al. *A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. The EMBO Journal*, 1999; 18: 363-374.
38. Seghezzi G, et al. *Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endotelial growth factor (VEGF) expresión in the endotelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. Journal Cell Biology* 1998; 141: 1659-1673.
39. Ferrara N, et al. *The biology of VEGF and its receptors. Nature Medicine*, 2003; 9: 669-676.
40. Birk D, et al. *Basic Science Review: Current Insights on the Biology and Clinical Aspects of VEGF Regulation. Vascular endovascular surgery*, 2009; 42(6): 517-530.
41. Enzinger FM, Weiss SW. *Inmunohistochemistry of soft tissue lesions. En: Enzinger FM (Ed). Soft tisúes tumors. Mosby-yearNook, St Louis, Missouri*, 1995;2139-2163.

42. Makhoulf HR, et al. Epitheloid hemangioendothelioma of the liver A clinicopathologic study of 137 cases. *Cancer*, 1999; 85: 562-582.
43. Ordoñez NG. Application of immunocytochemistry in the diagnosis of soft tissue sarcomas; A review and update. *Advances in Anatomic pathology*, 1998; 5: 67-85.
44. Anthony PP, et al. Endothelial markers in malignant vascular tumours of the liver; superiority of QB-END/10 over Von Willebrand factor and Ulex europaeus agglutinin I. *Journal Clinic Pathology*, 1991; 44:29-32.
45. Parums DV., et al. JC70: A new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *Journal Clinic Pathology*, 1990; 45: 752-757.
46. Toledo G, Panizo A. Marcadores inmunohistoquímicos endoteliales. *Revista Española de Patología*, 2000; 33(1): 57-60.
47. Chao-Nan Qian, et al. Complexity of Tumor Vasculature in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer*, 2009; 2247-2375.
48. Kahn HJ, et al. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's and a subset of angiosarcomas. *Modern Pathology*, 2002;15: 434-440.
49. Fogt F, et al. Proliferation of D2-40-expressing intestinal lymphatic vessels in the lamina propria in inflammatory bowel disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 2004;13: 211-214.
50. Fogt F, et al. Identification of lymphatic vessels in malignant, adenomatous and normal colonic mucosa using the novel immunostain D2-40. *Oncology Reports* 2004;11:47-50.
51. Kahn HJ., et al. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Laboratory Investigation*, 2002; 82: 1255-1257.
52. Pertusa J. Técnicas de análisis de imagen: aplicaciones en biología. *Universitat de Valencia*, 2003: 31-33 y 93-100.
53. Weidner N., et al. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *New England Journal Medicine*, 1991; 324:1-8.
54. Tse GM., et-al. Strong immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor predicts overall survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Annal Surgery Oncology* 2007;14: 3558-3565.
55. Hannen EJ., et-al. Computer assisted analysis of the microvasculature in metastasized and nonmetastasized squamous cell carcinomas of the tongue. *Head Neck*, 2002; 24: 643-650.
56. Pardo-Mindán FJ, et al. *Metodos en Patología :en anatomía patológica*. Editorial Mosby 1997; 333-406.
57. Mariuzzi GM., et al. Some reflections on the history, and presence of quantitative pathology. *Pathological*, 1995; 87: 215-220.
58. Hemmerlein B., et al. Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinomas. *Virchows Archiv*, 2001; 439: 645-652.
59. Tomisawa M, Tokunaga T, Oshika Y et al. Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*, 1999; 35: 133-137
60. Lidgren A., et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression in renal cell carcinoma analyzed by tissue microarray. *European Urology*, 2006; 50(6): 1272-1277
61. Reynolds GM., et al. Microwave oven antigen retrieval applied to the immunostaining of citopathology specimens. *Citopathology*, 1994; 5: 345-358.
62. Shin RW., et al. Hydrated autoclave pretreatment enhances tau immunoreactivity in formalin-fixed normal and alzheimer's <disease brain tissues. *Laboratory investigation*, 1991; 64: 693-702.

63. Banfalvi A., et al. Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *Journal pathology*, 1994; 174: 223-228.
64. Syed Alwi SS., et al. In vivo modulation of 4E binding protein 1 (4E-BP1) phosphorylation by watercress: a pilot study. *British Journal Nutrition*, 2010; 104(9): 1288-1296.
65. Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discovery Today*, 2006;12 (19-20): 853–859.
66. Melillo G. Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol. Cancer Research*, 2006; 4(9): 601-605.
67. Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and role of HIF-1 in tumor progression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2000; 35: 71-103.
68. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*, 2006; 93:E73-E80.
69. Clottes E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation, involvement in carcinogenesis and target for anticancer therapy. *Bull Cancer*, 2005; 92:119-127.
70. Wang GL., et al. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor-1. *Journal of Biological Chemistry*, 1995; 1: 1230-1237.
71. Jiang BH., et al. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of HIF-1. *Journal of Biological Chemistry*, 1996; 271: 17771-17778.
72. Wang GL., et al. Hypoxia inducible factor-1 is a Basic-helix-loop-helix PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1995; 92: 5510-5514.
73. Mezquita J, Mezquita B, Pau M. Characterization of a novel form of angiopoietin-2 during chicken testicular development and regression. *Biochemical and Biophysical Research Communications of journal*, 1999; 260: 492-498.
74. Carmeliet P., et al. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000; 407: 249-257.
75. Carmeliet P., et al. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 2000; 6: 389-395.
76. Carmeliet P., et al. Developmental biology. One cell, two fates. *Nature*, 2000; 408: 43-45.
77. Extraído de : <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/423/444> . 20-04-2012.
78. Jain R.K. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer research*, 1998; 48: 2641-2658.
79. Helmlinger G., et al. Interstitial pH and pO2 gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature Medicine*, 1997; 3: 177-182.
80. Hobbs S.K., et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1998; 95: 4607-4612.
81. Zablotzka LB., et al. Radiation and the Risk of Chronic Lymphocytic and Other Leukemias among Chernobyl Cleanup Workers. *Environmental Health Perspectives*. 2012:1-31.
82. Carmeliet P., et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996; 380: 435-439.
83. Ferrara N., et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 1996; 380: 439-442.
84. Gerber H.P., et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, 1999; 126: 1149-1159.

85. Dvorak H.F., et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Current Topics of Microbiology and Immunology*, 1999; 237: 97-132.
86. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Molecular and Biological Aspects*, 1999; 237:1-30.
87. Suri C., et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 1996; 87: 1171-1180.
88. Papapetropoulos A., et al. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/surviving pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275: 9102-9105.
89. Heldin C-K and Westermark B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiological Reviews*, 1999; 79(4): 1283-1316
90. Ricardo H. et al. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clinic Proceedings*, 2006; 81(9): 1241-1257.
91. Soldi R., et al. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Embo Journal*, 1999; 18: 882-892.
92. Brooks P.C., et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 1994; 79: 1157-1164.
93. Mitjans F., et al. In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alphav integrins. *International Journal of Cancer*, 2000; 87: 716-723.
94. Gerhardt H, Wolburg H y Redies C. N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Developmental Dynamics*, 2000; 218: 472-479.
95. Esser S., et al. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal Cell Science*, 1998; 111: 1853-1865.
96. Hiraoka N., et al. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*, 1998; 95: 365-377.
97. folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp cell res*, 2006; 312(5): 594-607.
98. Javaherian K., et al. Two Endogenous Antiangiogenic Inhibitors, Endostatin and Angiostatin, Demonstrate Biphasic Curves in their Antitumor Profiles. *Dose Response*, 2011; 9(3):369-376.
99. Zachary, I. and Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovascular Research*, 2001; 49(3): 568-581.
100. Garcia Manero M., y cols. Angiogenesis y endometriosis. *Revista Médica Universidad de Navarra* 2009 ;53(2): 8-13.
101. Ferrara, N., et al. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney International*, 1999. 56(3): 794-814.
102. Letelier R. Angiogénesis y cáncer. *Medwave* 2007 Abr;7(3) doi: 10.5867/medwave, 2007;03:3546.
103. Nico B., et al. Evaluation of microvascular density in tumors:pro and contra. *Histology and Histopathology; Cellular and Molecular Biology*, 2008. 23: 601-607.
104. Givan A. Flow Citometry: An Introduction. *Methods in molecular Biology*, 2011; 1 (699): 1-29.
105. Imao T., et al. Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *International Journal Urology*, 2004;11: 948-953.

106. Esin Y, Semih A, Fahrettin G, Gokhan G, Emin G. *Relation of microvessel density with microvascular invasion, metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. BJU internacional*, 2008; 101(6): 758-764.
107. Yoshino S., et al. *Prognostic significance of microvessel count in low stage renal cell carcinoma. International Journal Urology*, 1995; 2: 156-160.
108. Paradis V., et al. *Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. Virchows Archive*, 2000; 436: 351-356.
109. Dekel Y., et al. *Significance of angiogenesis and microvascular invasion in renal cell carcinoma. Pathology Oncology Research*, 2002; 8: 129-132.
110. MacLennan MD., et al. *Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance. Urology*, 1995; 46: 27-30.
111. Slaton J.W., et al. *Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. American Journal Pathology*, 2001; 158: 735-743.
112. Delahunt B., et al. *Prognostic significance of microscopic vascularity for clear cell renal carcinoma. British Journal Urology*, 1997; 80: 401-404.
113. Rioux-Leclercq N., et al. *Clinical significance of cell proliferation, microvessel density, and CD44 adhesion molecule expression in renal cell carcinoma. Human Pathology*, 2001; 32: 1209-1215.
114. Sabo E., et al. *Microscopic analysis and significance of vascular architectural complexity in renal cell carcinoma. Clinical Cancer Research*, 2001; 7: 533-537.
115. Kohler HH., et al. *Quantitative assessment of vascular surface density in renal cell carcinomas. British Journal Urology*, 1996; 77: 650-654.
116. Hemmerlein B., et al. *Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinomas. Virchows Archive*, 2001; 439: 645-652.
117. Korkolopoulou P., et al. *Clinicopathologic correlations of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia: a morphometric study. Leukemia*, 2003; 17: 89-97.
118. Nijsten T., et al. *Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. British Journal Dermatology*, 2004; 151;(837):74-80.
119. Sharma S., et al. *Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis Histopathology*, 2005; 46: 481-489.
120. Sümer B., et al. *Thrombospondin-1, Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Microvessel Density in Renal Cell Carcinoma and Their Relationship with Multifocality. European Urology*, 2003; 44(1): 161-164.
121. Yagasaki H., et al. *Histopathological analysis of angiogenic factors in renal cell carcinoma. International Journal of Urology*, 2003; 10(4): 220-227.
122. Zhang X., et al. *Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases. Internacional Journal of Urology*, 2002; 9(9): 509-514.
123. Boyle RG and Travers S. *Hypoxia: targeting the tumour. Anticancer Agents Med Chem* 2006; 6 (4): 281-286.
124. Graeber TG, Osmanian C, et al. *Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. Nature*, 1996; 379(6560): 88-91.
125. Weidner N. *Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. Semin Diagnostic Pathology*, 1993; 10(4): 302-313.

126. Morell-Quadreny L, Romanenko A, Lopez-Guerrero JA, et al. Alterations of ubiquitylation and sumoylation in conventional renal cell carcinomas after the Chernobyl accident: a comparison with Spanish cases. *Virchows Archive*, 2011; 459: 307-313.
127. Vajkoczy I P., et al. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *Journal Clinical Investigation*. 2002; 109(6): 777-785.
128. Department of Epidemiology and Public Health, Imperial College Faculty of Medicine, St Mary's Campus, London, UK. Risks associated with ionizing radiation. *Environmental pollution and health. British Medical Bulletin*, 2003; 68(1): 259-275.
129. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). *Hereditary Effects of Radiation. UNSCEAR 2001 Report to the General Assembly, with Scientific Annex*. New York: United Nations:1-16
130. Dubrova YE., et al. Human minisatellite mutation rate after the Chernobyl accident. *Nature*, 1996; 380: 683-686.
131. Dubrova YE., et al. Nuclear weapons tests and human germline mutation rate. *Science*, 2002; 295: 1037.
133. Romanenko A, Morell-Quadreny L, Llombart-Bosch A, et al. Radiation sclerosing proliferative atypical nephropathy of peritumoral tissue of renal-cell carcinomas after the Chernobyl accident in Ukraine. *Virchows Archive*, 2001; 438(2): 146-153.
134. Romanenko A, Morell-Quadreny L, Ramos D, Llombart-Bosch, et al. Extracellular matrix alterations in conventional renal cell carcinomas by tissue microarray profiling influenced by the persistent, long term, low dose ionizing radiation exposure in humans. *Virchows Archive*, 2006; 448: 584-590.
135. Romanenko A, Morell-Quadreny L, Pellin A, et al. P16 INK4A and p15 INK4B gene alteration associated with oxidative stress in renal cell carcinomas after the chernobyl accident (pilot study). *Diagnostic Molecular Pathology*, 2002; 11(3):163-169.
136. Romanenko A, Morell-Quadreny L, Ramos D, Llombart-Bosch, et al. Alteration of Apoptotic Regulatory Molecules in Conventional Renal Cell Carcinoma Influenced by Chronic Long-term Low-dose Ionizing Radiation Exposure in Humans Revealed by Tissue Microarray. *Cancer Genomics and Proteomics*, 2006; 3(2): 107-112.
137. Morell-Quadreny L, Romanenko A, López-Guerrero JA, Calabuig S, Vozianov A, Llombart-Bosch A. Alterations of ubiquitylation and sumoylation in conventional renal cell carcinomas after the Chernobyl accident: a comparison with Spanish cases. *Virchows Archive*, 2011; 459(3): 307-313.
138. Yurakh AO, Ramos D, Calabuig-Fariñas S, López-Guerrero JA, et al. Molecular and immunohistochemical analysis of the prognostic value of cell-cycle regulators in urothelial neoplasms of the bladder. *European Urology*, 2006; 50(3): 506-515
139. Romanenko A, Morell-Quadreny L, López-Guerrero JA, et al. The INK4a /ARF locus: role in cell cycle control for renal cell epithelial tumor growth after the Chernobyl accident. *Virchows Archive*, 2004; 445(3):298-304.
140. Romanenko A, Morell-Quadreny L, Nepomnyaschy V Vozianov A, Llombart-Bosch A. Pathology and proliferative activity of renal-cell carcinomas (RCCS) and renal oncocytomas in patients with different radiation exposure after the Chernobyl accident in Ukraine. *International Journal Cancer*, 2000; 87(6):880-883.
141. Tanaka T., et al. High incidence of allelic loss on chromosome 5 and inactivation of p15INK4B and p16INK4A tumor suppressor genes in oxystress-induced renal cell carcinomas in rats. *Oncogene*, 1999; 18: 3793-3797.
142. Romanenko A. M., Ruiz-Saurí A., Morell-Quadreny L., Valencia G., Vozianov A. F., Llombart-Bosch A. Microvessel density is high in clear-cell renal cell carcinomas of Ukrainian patients exposed to chronic persistent low-dose ionizing radiation after the Chernobyl accident. *Virchows Archiv*, 2012; 460(6): 611-619.

143. Tomado de http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=11340 .The National Academies Press. *Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: BEIR VII Phase 2* (2006)
- a.- Cap.2 Molecular and Cellular Responses to Ionizing Radiation (43-64).
 - b.- Cap.3 Radiation-Induced Cancer: Mechanisms, Quantitative Experimental Studies and the Role of Genetic Factors (65-90).
 - c.- Cap.4 Heritable Genetic Effects of Radiation in Human Populations (91-131).
 - d.- Cap.9 Environmental Radiation Studies (207-238).
 - e.- Cap.10 Integration of Biology and Epidemiology (239-258).
 - f.- Cap.11 Risk Assessment Models and Methods (259-266).
 - g.- Cap.12 Estimating Cancer Risk (267-312).
144. Folkman J., et al. *Angiogenesis. Journal of Biology and chemistry*, 1992;267:10931-10934.
145. Bussolino F., et al. *Molecular mechanisms of blood vessel formation.TIBS*, 1997;22: 251-256.
146. Llombart-Bosh A., et al. *New trends in cáncer for the 21ST century. Advances in experimental medicine and biology*, 2002; 532: 69-85.
147. Hanahan D, Weinberg RA., et al.. *The hallmarks of cancer. Cell*, 2000; 100: 57-70.
148. Folkman J. *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Seminars in Oncology*, 2002; 29(6):15-18.
149. Monteagudo C., y cols. *Papel de las quimiocinas en la progresión del melanoma. Actas en dermo-sifiliográficas*, 2011; 102(7): 498-504.
150. Cross MJ., et al. *FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. Cell Press Review*, 2001; 22(4): 201-207.
151. Ornitz D.M. *FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. BioEssays*, 2000; 22: 108-112.
152. Shibuya M, et al. *Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1999; 237:59-83.
153. Luttun A. et al. *Nature Medicine*, 2002; 8:831-834.
154. Taipale J, et al. *Vascular endothelial growth factor receptor-3. Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1999; 237: 85-96.
155. Talks K.L, Harris A..L. *Current status of antiangiogenic factors. British Journal Haematology*. 2000; 109: 477-489.
156. Ferrara I Ny., et al. *Angiogenesis as a therapeutic target. Nature*, 2005; 438(15): 967-971.
157. Papetti M. y Herman I. *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis, American Journal Physiology, Cell Physiology*, 2002; 282: 947-970.
158. Lakovlev Vladimir V., et al. *Microvascular density as an independent predictor of clinical outcome in renal carcinoma: an automated image analysis study. Laboratory Investigation*, 2012;92(1):46-56.
159. Ren J. et al.: *Microvessel density and heparanase overexpression in clear cell renal cell cancer: correlations and prognostic significances. World Journal of Surgical Oncology*, 2011; 9:158.
160. Rioux-Leclercq., et ál. *The nuclear Furhman grade: a European multicentre study for the determination of the optimal grading System in term of prognosis. European Urology Suppl* 2006; 5(2): 67.
161. Gofrit ON, Shapiro A, Katz R, Landau EH et ál. *The growth rate of clinically significant renal cancer. The Journal of Urology*, 2009; 181(4): 134-139.
162. Sejnauí J.E., y cols. *Correlación entre tamaño, grado nuclear y supervivencia en el cáncer renal de células claras. Urología Colombiana*, 2011; XX (1): 13-20.
163. Rubio-Briones, J. y cols. *Expresión inmunohistoquímica de la densidad microvascular y de la anhidrasa carbónica IX en carcinoma renal: Relación con el tipo histológico y con la progresión tumoral. Actas Urológicas Españolas*, 2011; 35(2): 80-86

164. Yildiz E., et al. Relation of microvessel density with microvascular invasion, metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *BJU International*, 2008; 101:758-764.
165. Imao T., et al. Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *International Journal Urology*, 2004; 11:948-953.
168. Fukata S., et al. Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ-specific metastasis of renal cell carcinoma. *Cancer*, 2005; 103: 931-942.
169. Kohler HH., et al. Quantitative assessment of vascular surface density in renal cell carcinomas. *British Journal Urology*, 1996; 77: 650-654.
170. Herbst C., et al. Evaluation of microvessel density by computerised image analysis in human renal cell carcinoma. Correlation to pT category, nuclear grade, proliferative activity and occurrence of metastasis. *Journal Cancer Research Clinical Oncology*, 1998; 124: 141-147.
171. Delahunt B. et al. Prognostic significance of microscopic vascularity for clear cell renal cell carcinoma. *British Journal Urology*, 1997; 80: 401-404.
172. MacLennan GT., et al. Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance. *Urology*, 1995; 46: 27-30.
173. Stroka D, et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *The FASEB Journal*, 2001; 15(13): 2445-2453.
174. Minardi D, et al. VEGF and HIF in Renal Cell Carcinogenesis. *Biomarkers*, 2011; 1: 60-67.
175. Wiesener M. W., et al. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in clear cell renal carcinomas. *Cancer Research*, 2001; 61: 5215-5222.
176. Turner K. et al. Expression of Hypoxia-inducible Factors in Human Renal Cancer. *Cancer Research*, 2002; 62: 2957-2961.
177. Mehan B. et al. Age-related properties of the tumour vasculature in renal cell carcinoma. *British journal of Urology Internacional*, 2010;107: 416-424.
178. Yu JL., et al. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory and immune cells in tumour angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Research*, 2003; 5 (2): 83–88.
179. Scholz D, Cai WJ, Schaper W. Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis*, 2001; 4 (4): 247-257.
180. Ershler W.B., et al. Transfer of age-associated restrained tumor growth in mice by old-to-young bone marrow transplantation. *Cancer Research*, 1984; 44 (12 Pt 1): 5677-5680.
181. Balducci L, Ershler WB. Cancer and ageing: a nexus at several levels. *Nature Reviews of Cancer*, 2005; 5 (8): 655-662.
182. Sprenger CC., et al. Extracellular influences on tumour angiogenesis in the aged host. *British Journal of Cancer*, 2008; 98(2): 250-255.
183. Zhang, N., et al., Expression of hypoxia-inducible factor-1 α , hypoxia-inducible factor-2 α and vascular endothelial growth factor in sporadic clear cell renal cell carcinoma and their significance in the pathogenesis thereof. *Zhonghua yi xue za zhi*, 2006; 86(22): 1526-1529.
184. Zhou, X.J., et al, The aging kidney. *Kidney International*, 2008; 74(6): 710-720.
185. Castaño R.A., y cols. Evolución de la equidad en el sistema de salud colombiano. *Comisión económica para américa latina (CEPAL)*, 2001; 108: 52.

186. Céspedes J.E., y cols. *Impacto de la reforma del sistema de seguridad social en los servicios de salud en Colombia. Cad Saude Publica Río de Janeiro*, 2002; 18 (4) 1003 -1024.
187. Chow W.H., et al. *Rising incidence of renal cell cancer in the United States. JAMA*, 1999; 281: 1628-1631.
188. Yoshida S.O., et al. *Proximal renal tubular surface membrane antigens identified in primary and metastatic renal cell carcinomas. Archives Pathology Laboratory Medicine*, 1986; 110: 825-832.
189. Extraído de: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002299-pdf.pdf>
190. Kumar G. y Kiernan J. *Special Stains and H&E. Pathology, Education Guide*, 2010; Cap 26: 226-227.
191. Saydackova NA., et al. *The state of urological assistance for the population in Ukraine. Annual report. Ministry of Health in Ukraine, Kiev*, 2007:146-153.
192. Raes F., et al. *Multi-fractal nature of radioactivity deposition on soil after the Chernobyl accident. Health Physiology*, 1991; 61: 271-328.
193. Fesenko SV., et al. *Twenty years' application of agricultural countermeasures following the Chernobyl accident: lessons learned. Journal Radiological Protection*, 2006; 26(4): 351-359.
194. Williams, D. *Radiation carcinogenesis: lessons from Chernobyl. Oncogene*, 2008; 27(S2): 9-18.
195. Johnson RJ. *Microvascular and tubulointerstitial disease. Medwave*, 2003; 3(5): e951
196. Kang DH, Joly AH, Oh SW, Hugo C, Kerjaschki D, Gordon KL, et al. *Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. Journal American Society Nephrology*, 2001; 12(7):1434-1447.
197. Kang DH., Hughes J., et al. *Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. J American Society Nephrology*, 2001; 12(7): 1448-1457.
198. Tsimafeyeu, I., et al. *Overexpression of fibroblast growth factor receptors FGFR1 and FGFR2 in renal cell carcinoma. Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 2011; 45(3): 190-195.
199. B.I. Rini, E.J., et al. *Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. Journal of Clinical Oncology*, 2005; 23: 1028-1043.
200. Tian H., et al. *Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. Genes Development*, 1997; 11: 72-82.
201. Flamme I., et al. *HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. Mechanisms of Development*, 1997; 63: 51-60.
202. Monacci W.T., et al. *Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. American Journal Physiology, Cell Physiology*, 1993; 264(4): 995-1002
203. Talks KL., et al. *The Expression and Distribution of the Hypoxia-Inducible Factors HIF-1a and HIF-2a in Normal Human Tissues, Cancers, and Tumor-Associated Macrophages. American Journal Pathology*, 2000; 157(2): 411-421.
204. Kluger, H.M., et al., *Classification of renal cell carcinoma based on expression of VEGF and VEGF receptors in both tumor cells and endothelial cells. Laboratory Investigation*, 2008; 88(9): 962-972.
205. Wagner Grau P. *El factor HIF-1 inducido por la hipoxia y la sensibilidad al oxígeno: Rol del hierro intracelular. Acta médica peruana*, 2011; 28(3): 163-168.

206. Luo L, Xiong ZB, Zeng H. Expression of BNIP3 and its correlations to HIF-1 α and VEGF in clear cell renal cell carcinoma. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2012; 43(1): 79-82.
207. Hockel M., et al. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001; 93: 266-276.
208. Allan J, Pantuck A J., et al. Pathobiology, Prognosis, and Targeted Therapy for Renal Cell Carcinoma. Exploiting the Hypoxia-Induced Pathway. *Clinical Cancer Research*, 2003; 9: 4641-4652.
209. Vickers MM., et al Target Prognostic and predictive biomarkers in renal cell carcinoma. *Oncology*, 2010; 5(2): 85-94
210. Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K et al. The expression of hypoxia-inducible factor 1 α is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2005; 11: 1129-1135.
211. Kim JH, Jung CW, Cho YH et al. Somatic VHL alteration and its impact on prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep*, 2005; 13: 859-864.
212. Dordevic, G., et al. Hypoxia inducible factor-1 α correlates with vascular endothelial growth factor A and C indicating worse prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2009; 28(1): 40-47.
213. Holmes K., et al Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*, 2007; 19 (10): 2003-2012.
214. Saunders (Elsevier), ed. «Ch3-Tissue Renewal, Regeneration and Repair». *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 2010; (8th edición).
215. Liang X, Yang D, et al. Hypoxia Inducible Factor-1 α Expression Correlates with Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression and Lymphangiogenesis/Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Research*, 2008; 28 (3A): 1659-1666.
216. Yildiz E., et al. Prognostic value of the expression of Ki-67, CD44 and vascular endothelial growth factor, and microvessel invasion, in renal cell carcinoma. *BJU International*, 2004; 93: 1087-1093.
217. Jacobsen J, Grankvist K, Rasmuson T, Bergh A, Landberg G, Ljungberg B: Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. *BJU International*, 2004; 93: 297-302.
218. Cruz Spano L, Merçon de Vargas PR, Gagliardi Leite JP, Pereira do Nascimento J. False positive reaction due to endogenous biotin activity in glandular epithelium of decidua. *Brazil Journal Microbiology*, 2005; 36: 109-113.
219. Jorge Buys D.L., y cols. Interpretación básica de inmunohistoquímica. Características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. *Revista de patología latinoamericana*, 2007; 45(3): 126-140.
220. Kashima K., et al. Cytoplasmic biotin-like activity interferes with immunohistochemical analysis of thyroid lesions: a comparison of antigen retrieval methods. *Mod Pathology*, 1997; 10: 515-519.
221. Bussolati G., et al. Retrieved endogenous biotin: a novel marker and a potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry. *Histopathology*, 1997; 31: 400-407.
222. Boticario C, Cascales M. Hipoxia y cancer. *Anales Real Academia Nacional Farmacología*, 2010; 76(3): 379-408.
223. Boticario, C. & Cascales, M. Factor inducible por hipoxia (HIF-1) y cáncer. En: *Innovaciones en cáncer*. Editoras Boticario, C. & Cascales, M. UNED, 2008: 391-414.
224. Soilleux E.J., et al. Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues. *Histopathology*, 2005; 47(6): 602-610.
225. Signoretti S., et al. Tissue-Based Research In Kidney Cancer: Current Challenges And Future Directions. *Clinical Cancer Research*. 2008; 14(12): 3699-3705.

226. Kluger, H.M., et al., *Classification of renal cell carcinoma based on expression of VEGF and VEGF receptors in both tumor cells and endothelial cells. Laboratory Investigation*, 2008; 88(9): 962-972.
227. Kato H, et al. *Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) in esophageal squamous cell carcinoma. Anticancer Research*, 2002; 22(6C): 3977-3984.
228. Ljungberg BJ, et al. *Different vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-receptor 1 and -2 mRNA expression profiles between clear cell and papillary renal cell carcinoma. BJU International*, 2006; 98: 661-667.
229. Minardi D., et al. *Prognostic role of tumor necrosis, microvessel density, vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1alpha in patients with clear cell renal carcinoma after radical nephrectomy in a long term follow-up. International Journal Immunopathology Pharmacology*, 2008; 21(2): 447-455.
230. Lidgren, A., et al., *Hypoxia-Inducible Factor 1, Expression in Renal Cell Carcinoma Analyzed by Tissue Microarray. European Urology*, 2006; 50(6): 1272-1277.
231. DANE (Departamento administrativo nacional de estadísticas de Colombia). *Proyecciones de población 2005-2020. Colombia, Tablas abreviadas de mortalidad nacionales y departamentales 1985-2020*, 2007: 4-5.
232. Lipworth L, et al. *The epidemiology of renal cell carcinoma. Journal Urology*, 2006; 176(6): 2353-2358.
233. Weikert S, et al. *Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. American Journal Epidemiology*, 2008; 167(4): 438-446.
234. Instituto Nacional de Estadísticas de Ucrania. www.ukrstat.gov.ua
235. Instituto nacional de estadísticas de España. www.ine.es
236. Bazyka D.A., Prysazhnyuk A Ye., et al. *Cancer Incidence and Nuclear Facilities in Ukraine: A Community-Based Study. Experimental Oncology*, 2012; 34(2): 116-120.
237. Hoffmann W. *Fallout from the Chernobyl nuclear disaster and congenital malformations in Europe. Arch Environ Health*, 2001; 56(6): 478-484.
238. Edeline J. et al. *Description of 2 angiogenic phenotypes in clear cell renal cell carcinoma. Human pathology*, 2012; 43: 1982-1990.
239. Alamdari, F.I., et al., *Angiogenesis and other markers for prediction of survival in metastatic renal cell carcinoma. Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 2007; 41(1): 5-9.
240. Emoto N, et al. *Basic fibroblast growth factor (FGF-2) in renal cell carcinoma, which is indistinguishable from that in normal kidney, is involved in renal cell carcinoma growth. Journal Urology*, 1994; 152(5): 1626-1631.
241. Tawfik, O.W., et al. *Prognostic Significance of CD44, Platelet-Derived Growth Factor Receptor α , and Cyclooxygenase 2 Expression in Renal Cell Carcinoma. Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2007; 131(2): 261-267.
242. Markovic-Lipkovski J. et al. *Cadherins and integrins in renal cell carcinoma: an immunohistochemical study. Tumori*, 2001; 87(3): 173-178.
243. Djordjevic G, et al. *Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in clear cell renal cell carcinoma. Pathol Research Practice*. 2007; 203(2): 99-106.
244. Minardi D, et al. *Prognostic role of tumor necrosis, microvessel density, vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1alpha in patients with clear cell renal carcinoma after radical nephrectomy in a long term follow-up. Int Journal Immunopathology Pharmacology*. 2008; 21(2): 447-455
245. Yilmazer, D., et al. *A comparison of the vascular density of VEGF expression with microvascular density determined with CD34 and CD31 staining and conventional prognostic markers in renal cell carcinoma. International Urology and Nephrology*, 2007; 39(3): 691-698.

-
246. Paul, R., et al. *Cadherin-6, a Cell Adhesion Molecule Specifically Expressed in the Proximal Renal Tubule and Renal Cell Carcinoma. Cancer Research*, 1997; 57(13): 2741-2748.
247. Petersen D. *Alcohol, iron-associated oxidative stress, and cancer. Alcohol*, 2005; 35(3): 243-249.
248. Rodrigo Aliaga M. y cols. *Análisis de microsatélites de la Región 3p13-p25 en el carcinoma de células renales en humanos. Actas Urológicas Españolas*, 2002; 26 (3): 150-162.
249. Patard J.J., et al. *Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma. British Journal of Cancer*, 2009; 101: 1417–1424.
250. Kats-Ugurlu G. *Effect of neoadjuvant sorafenib treatment on histology of clear cell renal cell carcinoma and occurrence of circulating tumor fragments. Virchows Archiv*, 2012; 461(1):332.
251. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (Eds): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press, Lyon, 2004.*