

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL

**Análisis molecular del carcinoma renal de células claras.
Identificación de un perfil de micrornas como factor
pronóstico en pacientes en estadio I-II**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Natalia Rocío Miranda Utrera

DIRECTOR

Ángel Tejido Sánchez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**ANÁLISIS MOLECULAR DEL CARCINOMA RENAL DE
CÉLULAS CLARAS. IDENTIFICACIÓN DE UN PERFIL DE
MICRORNAS COMO FACTOR PRONÓSTICO EN PACIENTES
EN ESTADIO I-II.**

TESIS DOCTORAL

Natalia Rocío Miranda Utrera

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**ANÁLISIS MOLECULAR DEL CARCINOMA RENAL DE
CÉLULAS CLARAS. IDENTIFICACIÓN DE UN PERFIL DE
MICRORNAS COMO FACTOR PRONÓSTICO EN PACIENTES
EN ESTADIO I-II.**

Autor: Natalia Rocío Miranda Utrera

Director: Ángel Tejido Sánchez

Madrid, 2015

La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio.

Gregorio Marañón

A mis padres, por concederme la libertad para elegir

Agradecimientos:

Al Dr. Ángel Tejido Sánchez. Por tomarse esto como algo personal, por ser mi ejemplo a seguir, por estar siempre ahí y por tu tiempo (y el de Nati), paciencia y generosidad conmigo. Sin tu ayuda este trabajo no habría sido posible.

A Ángel Gámez y Juan Ángel Fresno. Por vuestra buena disposición a compartir conmigo vuestro trabajo y conocimientos.

Al Dr. Felipe Villacampa y al Dr. Daniel Castellano. Soñasteis este proyecto mucho antes de que yo llegara.

A la Dra. Ángela Alsasua. Por tu interés en mis progresos y tus palabras de ánimo.

Al Dr. Félix Guerrero. Mi compañero y amigo. Maestro de trucos y salvavidas oportuno. Por compartir conmigo y escucharme.

ACRÓNIMOS

CR: Carcinoma Renal

CRCC: Carcinoma Renal tipo Células Claras

HTA: Hipertensión Arterial

IMC: Índice de Masa Corporal

VHL: Von Hippel Lindau

FHIT: Fragile Site Histidine Triad

WHO: World Health Organization

TNM: Clasificación Tumor Node Metastasis

CA-IX: Anhidrasa carbónica IX

UISS: University California, Los Ángeles, Integrated Staging System

ECOG-PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status

SSIGN: Stage Size Grade Necrosis Score

ASA: Clasificación de la American Society of Anesthesiologist

SG: Supervivencia Global

SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad

SCE: Supervivencia Cáncer Específica

IC: Intervalo de Confianza

HR: Hazard Ratio

INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. OBJETIVOS	2
III. MATERIAL Y MÉTODOS	3
IV. RESULTADOS	5
V. CONCLUSIONES	6
ABSTRACT	8
I. INTRODUCTION	9
II. OBJECTIVES	9
III. MATERIALS AND METHODS	10
IV. RESULTS	12
V. CONCLUSIONS	13
INTRODUCCIÓN	14
I. HISTORIA	15
II. INCIDENCIA DEL CÁNCER RENAL	15
III. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER RENAL	18
a. CR esporádico	18
b. CR hereditario o familiar	20
o Enfermedad de Von Hippel-Lindau	22

o	Esclerosis Tuberosa.....	23
o	Translocaciones constitucionales 3p	23
IV. SCREENING Y ASOCIACIONES CLÍNICAS		24
V. PATOLOGIA DEL CÁNCER RENAL		26
VI. ESTADIO TUMORAL		29
VII. FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CÁNCER RENAL.....		31
a.	Factores Anatómicos	31
b.	Factores Histológicos	33
c.	Factores Clínicos.....	34
d.	Factores Moleculares.....	34
e.	Modelos Pronósticos.....	37
o	“UCLA <i>integrated staging system</i> ” (UISS):.....	37
o	SSIGN “ <i>Stage Size Grade Necrosis Score</i> ”:.....	38
o	Nomograma postoperatorio de Karakiewicz (76):.....	38
o	Nomograma postoperatorio de Kattan (77):.....	38
VIII. MICRO-RNAS		40
a.	Síntesis de un microRNA	41
o	Vía Canónica de Biosíntesis de un miRNA:	41
o	Vía no canónica de generación de miRNAs:.....	43

b. Nomenclatura de un microRNA.....	45
c. Importancia Biológica de los microRNAs.....	45
HIPÓTESIS	47
OBJETIVOS.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS	51
I. DISEÑO DEL ESTUDIO	52
a. Tipo de Diseño.....	52
b. Selección de pacientes.....	52
c. Criterios de Inclusión.....	52
d. Criterios de Exclusión	53
II. PROCESAMIENTO ANATOMOPATOLÓGICO DE LA PIEZA DE NEFRECTOMÍA	54
a. Estudio macroscópico de la pieza de nefrectomía.....	54
b. Procesamiento de la pieza de nefrectomía.....	54
III. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MICRORNAS	56
a. Corrección del efecto de lotes.....	57
b. Modelos predictivos, BRB.	58
IV. ANALISIS ESTADÍSTICO	59
a. Variables de estudio.....	59

b. Estadística descriptiva de las variables a estudio	61
c. Estudio de las Variables Predictoras.....	61
d. Análisis de Supervivencia	64
e. Precisión de mediciones	64
RESULTADOS	65
I. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA COHORTE.....	66
II. CURVAS DE SUPERVIVENCIA	68
III. ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES PREDICTORAS Y VARIABLES RESULTADO (PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD Y MUERTE POR CÁNCER DE RIÑÓN) DE FORMA UNIVARIADA:.....	70
a. Asociación entre el estadio clínico, el grado nuclear de Fuhrman, nomograma UISS agrupado, nomograma de Kattan, nomograma de Karakiewicz y perfil de miRNA con progresión de la enfermedad.....	70
b. Asociación entre tamaño tumoral con progresión de la enfermedad.	71
c. Asociación entre el estadio clínico, el grado nuclear de Fuhrman, nomograma UISS agrupado, nomograma de Kattan, nomograma de Karakiewicz y perfil de miRNA con muerte por cáncer.....	72
d. Asociación entre tamaño tumoral con muerte por cáncer.	73
IV. MODELOS PREDICTIVOS	74
V. ANÁLISIS UNI Y MULTIVARIANTE:	77

a. Análisis Univariante para SLE (Regresión de Cox).....	77
b. Análisis Multivariante para SLE (Regresión de Cox multivariable).....	82
c. Análisis Univariante para Supervivencia Cáncer Específica (Regresión de Cox)	
83	
d. Análisis Multivariante para Supervivencia Cáncer Específica (Regresión de	
Cox multivariado)	87
DISCUSIÓN.....	88
I. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CÁNCER DE	
RIÑÓN.....	89
a. Subtipo histológico	89
b. Grado Nuclear de Fuhrman	89
c. Tamaño tumoral	90
d. Estadio Clínico	91
e. Factores Clínicos	91
f. Nomogramas	92
II. CÁNCER DE RIÑÓN Y MICRORNAS	93
III. PREDICTOR 9-miRNAs	99
o <i>hsa-miR-425</i>	101
o <i>hsa-miR-204</i>	101

IV. COMPARACIÓN ENTRE PREDICTOR 9-miRNAs Y OTROS MODELOS	
PREDICTIVOS.....	103
CONCLUSIONES.....	106
BIBLIOGRAFÍA	108

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

El Cáncer de Riñón (CR) representa el 2-3% de las neoplasias en adultos. En España en el año 2012 se registró una incidencia de 6.474 casos por 100.000 habitantes con un predominio hombre:mujer 3:2.

El CR es el más letal de los cánceres del espectro urológico siendo el responsable de 2.295 muertes por 100.000 habitantes por año.

El CR comprende un grupo heterogéneo de entidades con distintas características histopatológicas y citogenéticas, lo que determina un comportamiento desigual de la enfermedad.

Se han identificado multitud de factores pronósticos y se han desarrollado nomogramas y modelos pronósticos a fin de poder determinar el curso de la enfermedad. Sin embargo, hasta el momento no se han tenido en cuenta factores moleculares como podría ser un perfil de microRNAs.

En estadios tempranos de la enfermedad (estadios I y II), el tratamiento actual consiste en la extirpación completa del tumor. En estadios tempranos no se emplea ningún fármaco como tratamiento adyuvante. El CR en estadios tempranos presenta una tasa de recaída global cercana al 15%, y es en este grupo donde interesaría identificar con mayor precisión aquellos pacientes con mayor riesgo de progresión de enfermedad.

II. OBJETIVOS

Objetivo principal del estudio es identificar un perfil de microRNAs que pueda estar relacionado con alto riesgo de progresión de la enfermedad en pacientes con CRCC estadio I y II.

Definimos además tres objetivos secundarios:

- Identificar un perfil de microRNA que pueda estar relacionado con supervivencia cáncer específica en pacientes con CRCC estadio I y II.
- Identificar otros factores pronósticos relacionados con progresión y muerte por cáncer.
- Determinar la relación existente entre el perfil de microRNA con otros factores ya conocidos (clínicos y anatomopatológicos) y relacionados con el pronóstico.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realiza un estudio observacional hacia delante donde se incluyen todas las nefrectomías radicales y parciales practicadas en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, entre los años 1999 y 2008.

De un total de 164 pacientes, seleccionamos 71 que cumplían los siguientes criterios de inclusión: histología células claras, estadio tumoral I (T1N0M0) y II (T2N0M0), cualquier grado de Fuhrman, cualquier tamaño tumoral confinado al riñón (menor o igual a T2b), cualquier ECOG, pacientes asintomáticos o con síntomas relacionados.

Se excluyó del estudio cualquier paciente que cumpliera alguna de las características siguientes: estadio tumoral mayor o igual a T3 (22 pacientes), cualquier N+ (7 pacientes), cualquier M+ (15 pacientes), cualquier otra histología (13 papilares, 18 cromóforo, 7 diferenciación sarcomatoide y 1 células pequeñas), tiempo de seguimiento menor de 1 año (4 pacientes), ausencia de datos suficientes en la historia clínica y/o ausencia de muestras en parafina para el análisis de microRNA (9 pacientes).

Se procedió a la extracción del ARN a partir de las muestras tumorales fijadas en formol y embebidas en parafina, siguiendo las normas del fabricante (miRNA Microarray System Protocol, Agilent Technologies).

El modelo predictivo se construyó empleando el programa BRBArray Tools. Este modelo está compuesto por la expresión de nueve miRNAs. El score del predictor se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$\sum_i w_i x_i - 2.896583$ donde w_i y x_i son el peso y el valor de expresión del microRNA i .

Para el estudio se tuvieron en consideración las siguientes variables:

- Variables Cuantitativas: Edad al diagnóstico (años), Tamaño de la pieza (mm), Tiempo de seguimiento (meses), Supervivencia global (meses) (SG), Supervivencia libre de enfermedad (tiempo hasta la progresión, meses) (SLE), Supervivencia cáncer específica (tiempo hasta el exitus por cáncer, meses) (SCE), Nomograma de Karakiewicz (% SCE a 5 años), Nomograma de Kattan (% SLE a 5 años), Nomograma UISS (% SCE a 5 años y % riesgo de progresión)

- Variables Cualitativas dicotómicas: Género (masculino/femenino), Consumo de tabaco (si/no), Índice de masa corporal (IMC) mayor a 25 (si/no), Diálisis (si/no), Hipertensión arterial (HTA) (si/no), Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG PS) (0/>1), Existencia de síntomas al diagnóstico (si/no), Lateralidad de la enfermedad (derecho/izquierdo), Supervivencia (vivo si/vivo no), Muerto por cáncer (si/no), Progresión de la enfermedad (si/no).

Se realiza un análisis descriptivo de las variables así como la asociación entre cada variable a estudio y la variable resultado (progresión de la enfermedad y muerte por cáncer de riñón) mediante tablas de contingencia (chi cuadrado y t de student).

Utilizamos una regresión de Cox para el análisis univariante y multivariante. Las curvas de supervivencia se representan de manera gráfica mediante curvas de Kaplan-Meier.

IV. RESULTADOS

La edad media de los pacientes fue de 69,4 años (\pm 11,98). El 87,3% (62) de los pacientes se encontraba en un estadio I y el 12,7% (9) restante en un estadio II.

De acuerdo con la Clasificación TNM: el 54,9% (39) eran T1a en el momento del diagnóstico, el 31% (22) T1b, el 9,9% (7) T2a y el 4,2% (3) T2b. Atendiendo a la N: el 54,9% (39) eran N0 y el 45,1% (32) restante Nx.

El grado nuclear de Fuhrman fue: 7% (5) grado 1, el 74,6% (53) grado 2 y el 18,3% (13) grado 3.

El tiempo medio de seguimiento de 85 meses (\pm 25).

Del total de la serie, progresaron el 16,9% (12) de los pacientes.

La SLE a 5 años y 10 años es de 89,5% y 82,5% respectivamente. La SCE es de 92,8% a 5 años y de 85,5% a 10 años.

Pacientes con una puntuación mayor a 0.954 se consideran de alto riesgo. El modelo predictivo cataloga de alto riesgo el 30% de los pacientes. La SLE a distancia a los 5 años fue del 93.9% para pacientes de bajo riesgo y del 61.54% para pacientes con alto riesgo (HR=12.1, $p=0.0001$) IC (3.012-37.92). Estas diferencias en el long-rank test se validaron con 10.000 permutaciones ($p<0.0013$). La SCE a los cinco años fue 95.7% y 86.4% en los grupos de bajo y alto riesgo respectivamente (HR=7.7, $p=0.0084$) IC (1,687-35.14).

No identificamos ninguna variable clínica ni anatomopatológica que se comporte como factor pronóstico independiente de SLE o de SCE.

Los *9-microRNAs* se comportan como predictor independiente de SLE y SCE tanto en el análisis univariante como en el multivariante.

V. CONCLUSIONES

- Hemos determinado un perfil de 9-miRNAs (*hsa-miR-103*, *hsa-miR-107*, *hsa-miR-204*, *hsa-miR-214*, *hsa-miR-223*, *hsa-miR-425*, *hsa-miR-340*, *hsa-miR-130b* y *hsa-miR-625*) capaz de identificar una subpoblación de pacientes con CRCC estadio I y II con alto riesgo de progresión.
- El *Predictor 9-miRNAs* previamente descrito cataloga como alto riesgo al 30% de los pacientes del estudio. La supervivencia libre de enfermedad a distancia y la supervivencia cáncer específica a los 5 años en este grupo fue del 61.54% y 86.4%, respectivamente.
- En nuestro estudio no identificamos ninguna variable clínica ni anatomopatológica como factor pronóstico de progresión de la enfermedad y muerte por cáncer.
- El *Predictor 9-miRNAs* se comporta de manera independiente y sólida frente a variables clínicas y anatomopatológicas, como tamaño tumoral, grado nuclear de Fuhrman y estadio clínico.
- Al comparar el *Predictor 9-miRNAs* con otros predictores, únicamente el Nomograma de Karakiewicz mantiene cierta relevancia pronóstica a la hora de predecir supervivencia cáncer específica.

- Por lo tanto, nuestro *Predictor 9-miRNAs* es capaz de predecir tanto SLE como SCE en una población de pacientes con CR en estadio I y II.

ABSTRACT

I. INTRODUCTION

Renal Cell Cancer (RCC) represents 2-3% of all malignancies in adults. In 2012 in Spain, an incidence of 6,474 cases per 100,000 inhabitants was registered, with a male:female preponderance of 3:2.

RCC is the most lethal urologic cancer being responsible for 2,295 deaths per 100,000 populations per year.

The CR comprises a heterogeneous group of entities with different histopathological and cytogenetic features, which determines an unequal behaviour of the disease.

Many prognostic factors have been identified as well as nomograms and prognostic models developed in order to determine the course of disease. However, molecular factors such as microRNA profiles have not been taken into account so far.

In early stages of the disease (stages I and II), current treatment involves complete removal of the tumour. In early stages no drug is employed as adjuvant treatment. RCC in early stages has an overall relapse rate close to 15%, and it is in this group where it is more interesting to accurately identify those patients at highest risk of disease progression.

II. OBJECTIVES

The main aim of the study is to identify a profile of microRNAs that may be associated with increased risk of disease progression in patients with stage I and II RCC.

We also define three secondary aims:

- Identify a microRNA profile that can be associated with cancer-specific survival in patients with stage I and II RCC.

- Identify other prognostic factors associated with cancer progression and death.
- Determine the relationship between microRNA profile with other clinical and pathological known factors related to prognosis.

III. MATERIALS AND METHODS

An observational study was carried out, where all radical and partial nephrectomies performed at 12 de Octubre University Hospital in Madrid between 1999 and 2008 were included.

From 164 patients, 71 that met the following inclusion criteria were selected: clear cell histology, tumour stage I (T1N0M0) and II (T2N0M0), any Fuhrman grade, any tumour size confined to the kidney (T2b or less), any ECOG, either asymptomatic or symptomatic.

Any patient who met any of the following characteristics was excluded: tumour stage greater than or equal to T3 (22 patients), any N + (7 patients), any M + (15 patients), any histology (13 papillary, 18 chromophobe, 7 sarcomatoid differentiation and one small cell) different from clear cell, follow-up under 1 year (4 patients), lack of enough data on the medical record and/or absence of paraffin samples for microRNA analysis (9 patients).

We proceeded to the procurement of RNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tumour samples, following the standards of the manufacturer (miRNA Microarray System Protocol, Agilent Technologies).

The predictive model was built using the BRBArray Tools program. This model consists of nine miRNAs expression. The predictor score is calculated using the following formula:

$\sum_i w_i x_i - 2.896583$ where w_i y x_i are the weight and value of i microRNA expression.

The following variables were taken into consideration for the study:

- Quantitative variables: age at diagnosis (years), specimen size (mm), follow-up (months), overall survival (OS) (months), disease-free survival (DFS) (time to progression, months), cancer-specific survival (CSS) (time to death due to cancer, months), Karakiewicz nomogram (CSS% to 5 years), Kattan nomogram (DFS% to 5 years), UISS nomogram (CSS% and % 5-year risk progression).
- Qualitative dichotomous variables: Gender (male / female), cigarette smoker (yes / no), body mass index (BMI) greater than 25 (yes / no), dialysis (yes / no), blood pressure (BP) (yes / no), Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG PS) (0 / > 1), symptoms at diagnosis (yes / no), laterality of the disease (right / left), Survival (alive yes / no), death from cancer (yes / no), disease progression (yes / no).

A descriptive analysis of the variables and their association of each variable studied and the outcome variable (disease progression and death from kidney cancer) was performed using contingency tables (Chi Square and t Student).

We used Cox regression for univariate and multivariate analysis. Survival has been graphically represented by Kaplan-Meier curves.

IV. RESULTS

The mean age was 69.4 years (± 11.98). 87.3% (62) of the patients were stage I and 12.7% (9) was stage II.

According to the TNM classification: 54.9% (39) were T1a at the time of diagnosis, 31% (22) T1b, 9.9% (7) T2a and 4.2% (3) T2b. Considering lymph nodes: 54.9% (39) were N0 and 45.1% (32) Nx.

Regarding Fuhrman nuclear grade 7% (5) were grade 1, 74.6% (53) grade 2 and 18.3% (13) grade 3.

The mean follow-up has been 85 months (± 25).

Twelve patients of the whole series (16.9%) have progressed during follow-up.

DFS at 5 and 10 years is 89.5% and 82.5% respectively. CSS is 92.8% at 5 years and 85.5% at 10 years.

Patients with a score greater than 0.954 are considered at high risk. The predictive model labels 30% of patients as high risk. Distant DFS at 5 years was 93.9% for low-risk patients and 61.54% for those at high risk (HR = 12.1, $p = 0.0001$), CI (3.012-37.92). These differences were validated with log-rank test with 10,000 permutations ($p < 0.0013$). CSS at five years was 95.7% and 86.4% in low and high-risk groups, respectively (HR = 7.7, $p = 0.0084$) CI (1,687-35.14).

We did not identify any clinical or pathological variable behaving as an independent prognostic factor for DFS or CSS.

All 9-microRNAs behave as an independent predictor for DFS and CSS in both univariate and multivariate analysis.

V. CONCLUSIONS

- We have determined a profile of 9-miRNAs (hsa-miR-103, hsa-miR-107, hsa-miR-204, hsa-miR-214, hsa-miR-223, hsa-miR-425, hsa-miR-340, hsa-miR-130b and hsa-miR-625) that can identify a subset of patients with stage I and II RCC at high risk of progression.
- The *Predictor 9-miRNAs* previously described categorized 30% of patients in the study as high-risk. Distant disease free survival and distant cancer-specific survival at 5 years in this group was 61.54% and 86.4%, respectively.
- In our study we did not identify either clinical or pathological variables that could predict disease progression or cancer death.
- The *Predictor 9-miRNAs* behaves independently and solidly against clinical and pathological variables such as tumour size, Fuhrman nuclear grade and clinical stage.
- Comparing the *Predictor 9-miRNAs* with other predictors, just Karakiewicz nomogram keeps some prognostic relevance in predicting cancer-specific survival.
- Therefore, our *Predictor 9-miRNAs* can predict both DFS and CSS in a population of patients with stage I and II RCC.

INTRODUCCIÓN

I. HISTORIA

La cirugía renal apenas tiene 150 años de historia. Hay que remontarse al año 1861, año en que Wolcott publica la primera nefrectomía documentada sobre una masa renal que había sido diagnosticada erróneamente como hepatoma. Hasta 1869 Simon no realiza la primera nefrectomía planificada como tratamiento de una fístula ureteral permanente.

Harris en 1882 publicó la primera serie histórica de más de 100 nefrectomías por diversas patologías, lo que permitió ahondar en el estudio clínico, histopatológico y quirúrgico de las afecciones renales.

En 1826 König describió por primera vez la anatomía de los tumores renales, pero no fue hasta 1855 cuando Robin demostró el origen de los tumores renales a partir de células epiteliales del túbulo proximal.

Grawitz en 1883 introdujo cierto grado de confusión al interpretar que el color amarillo característico de la estirpe de células claras del carcinoma renal (CR), debido al alto contenido graso y a su localización yuxtacapsular, debía corresponder a un origen adrenal. De ahí la denominación errónea de *tumores hipernefroides* introducida por Lubach en 1894 y al término *Hipernefroma* y *tumor de Grawitz*. En la actualidad estos nombres están en desuso y se acepta la denominación de CR especificando a continuación el subtipo histológico.

II. INCIDENCIA DEL CÁNCER RENAL

El CR representa el 2-3% de las neoplasias en adultos . En los últimos años se ha venido observado un aumento progresivo de la incidencia de esta enfermedad, en España en el

año 2012 se registró una incidencia de 6.474 casos por 100.000 habitantes con un predominio hombre:mujer 3:2 (1).

El CR es el más letal de los cánceres del espectro urológico siendo el responsable de 2.295 muertes por 100.000 habitantes por año (1). Alrededor del 25-30% de los pacientes tendrán enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico, otro 30% desarrollarán enfermedad a distancia durante el seguimiento y el 40% de los pacientes diagnosticados de CR morirán a causa de la enfermedad en contraste con el 20% de mortalidad registrado para el cáncer de próstata y vejiga.

Es predominantemente una enfermedad de pacientes añosos y su incidencia aumenta con la edad con una presentación típica entre la 6^o-7^o década de la vida (2). La mayoría de los casos son esporádicos, únicamente 2-3% son formas familiares.

El CR esporádico es más frecuente en el medio urbano que en el rural y más frecuente en la raza negra que en la caucásica. Geográficamente se distribuye de manera desigual, con las tasas más elevadas en los países occidentales y las más bajas en los países asiáticos(2).

La variante familiar de CR no tiene predominio por ningún sexo, se presenta a edades tempranas y habitualmente son multifocales y bilaterales.

El CR es infrecuente en la infancia representando únicamente el 2,3-6.6% de todos los tumores renales en niños. La edad media de presentación es entorno a los 8-9 años y su incidencias es similar en niños y niñas. Pese que el tumor de Wilms es mucho más frecuente en niños pequeños, el CR es igual de frecuente que el tumor de Wilms en la 2^o década de la vida. Su forma de presentación a diferencia de los adultos suele ser

sintomática y la histología más frecuente suele ser papilar y generalmente localmente avanzado.

La incidencia del CR ha ido en aumento desde los años 70 en parte debido al aumento de pruebas diagnósticas abdominales (tomografía axial computerizada y ecografía) y esta tendencia se corresponde con el aumento de lesiones incidentales en estadios localizados, el 60% de estos tumores son menores de 4 centímetros en el momento de su diagnóstico, mejorando la supervivencia a 5 años en este tipo de pacientes.

Sin embargo, también se ha observado un incremento en la mortalidad desde los años 80s en todas las razas y en ambos sexos. Se sugiere que un cambio en la biología del tumor ha ocurrido en las últimas décadas tal vez debido al consumo de tabaco, factores dietéticos y otros carcinógenos

Por tanto el escenario clínico de esta enfermedad ha cambiado de manera notable en las últimas décadas. Los avances en el conocimiento de los mecanismos citogenéticos y cromosómicos del CR ha permitido el desarrollo de nuevas moléculas destinadas su tratamiento en estadios avanzados. El desarrollo de técnicas quirúrgicas laparoscópicas y robóticas así como la introducción de técnicas ablativas percutáneas, como la radiofrecuencia o la crioterapia, suponen una alternativa a la nefrectomía radical y a la nefrectomía parcial convencional, permitiendo ampliar el perfil de pacientes subsidiarios de tratamiento en estadios iniciales de la enfermedad.

Sin embargo, pese a que los avances en el diagnóstico precoz y en el tratamiento del CR en todos los estadios debería suponer una mejora en el pronóstico, la mortalidad del CR apenas ha cambiado en los últimos años. Se pone así de manifiesto la heterogeneidad del CR, debido a su variedad de subtipos histológicos y amplio perfil de agresividad, y

la necesidad de caracterizar de manera más exacta los diferentes perfiles de CR para optimizar el tratamiento en cada paciente y mejorar el pronóstico.

III. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER RENAL

La etiología del CR no es bien conocida y se sabe que el CR tiene 2 formas de presentación: forma esporádica y forma hereditaria o familiar (2).

a. CR esporádico

En torno al 96% de los CR son de presentación esporádica.

El CR en su variante Células Claras (CRCC) y variante papilar se origina en las células de epitelio del túbulo contorneado proximal, sin embargo la variante cromófoba y la variante de túbulos colectores se origina en una porción más distal de la nefrona.

El factor ambiental más comúnmente aceptado es la exposición al tabaco. El tabaco duplica el riesgo de padecer CR, con un riesgo relativo de 1,4-2,5 comparado con controles. La dosis es acumulativa (paquetes/año) y el incremento del riesgo está directamente relacionado con la duración del consumo y el número de cigarrillos consumidos, disminuyendo el riesgo al cesar su consumo. Este factor de riesgo está presente en el 20-30% de hombres con CR y 10-20% mujeres

Se han descrito otros factores de riesgo a nivel ambiental que podrían justificar las altas tasas de CR en países occidentales, sin embargo muchos de éstos no tienen poder estadístico suficiente debido a que el CR es una enfermedad poco frecuente. Estos factores posiblemente implicados en el desarrollo del CR son: consumo de analgésicos del grupo de las fenacetinas, la obesidad (particularmente en mujeres), la hipertensión

arterial (HTA) y el empleo de diuréticos para su tratamiento, la exposición al asbesto, derivados del petróleo y metales pesados como el cadmio.

Actualmente la obesidad se acepta como factor de riesgo mayor para CR con un incremento del riesgo relativo de 1.07 por cada unidad de más en el IMC. El incremento de la obesidad ha contribuido al aumento de la incidencia del CR en países occidentales. Los mecanismos posiblemente implicados son: peroxidación de los lípidos, aumento de la expresión del factor de crecimiento insuline-like 1, aumento de estrógenos circulantes, aumento de nefroangioesclerosis e inflamación local.

La HTA aparece como el tercer mayor factor de riesgo. El mecanismo propuesto es que la HTA induce daño e inflamación así como cambios metabólicos y funcionales en el túbulo aumentando su susceptibilidad para la carcinogénesis.

En estudios de casos-controles se ha demostrado que es más común el CR entre individuos de bajo nivel socioeconómico y entorno urbano. La dieta occidental pobre en frutas y verduras y rica en proteínas y grasas saturadas, así como el consumo de café y té, se han relacionado con CR sin embargo el riesgo relativo es modesto.

La historia familiar de CR es otro factor a tener en cuenta, con un riesgo relativo de 2.9 para individuos con familiar en 1º o 2º grado.

También se han relacionado el desarrollo de CR con ciertas enfermedades crónicas como la poliquistosis renal adquirida o la insuficiencia renal terminal en tratamiento con diálisis (30 veces más riesgo que en la población general).

Tabla 1. Etiología y Factores Ambientales en el CR esporádico

Factores establecidos:

- Tabaco
- Obesidad
- HTA

Factores relacionados:

- Antiinflamatorios: Fenacetinas
 - Metales pesados: Cadmio y plomo
 - Exposición ocupacional: Asbesto, hidrocarburos aromáticos, tricloroetileno, industria del caucho, cloruro de vinilo.
 - Dieta (alto consumo de proteínas y grasas, bajo consumo de frutas y verduras)
 - Contrastes: Thorotrast (Dióxido de torio)
-

b. CR hereditario o familiar

Sólo un 4% de los pacientes con CR presenta una predisposición familiar. En la década de los años 80 se demostró que las deleciones y translocaciones que afectan al brazo corto del cromosoma 3 están implicadas en el desarrollo de CR de Células Claras (CRCC), en concreto 3p14.2 y 3p25-p26 (gen VHL).

La segunda alteración cromosómica más frecuentemente presente en estos tumores es la que afecta al cromosoma 5. Más del 65% de los CRCC con deleción del 3p muestran trisomía parcial del 5q o una translocación desequilibrada que afecta al 5q.

Dentro de las formas hereditarias más importantes de CR en las que el subtipo células claras es la variante histológica predominante se incluyen:

- Poliquistosis renal del adulto
- Enfermedad de Von Hippel-Lindau (VHL)
- Esclerosis tuberosa
- Cáncer familiar no VHL sin translocación del cromosoma 3
- Cáncer familiar con translocación constitucional del cromosoma 3

Es fundamental la identificación de los genes responsables de estos síndromes y de los procesos celulares en los que participan para progresar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis renal.

Tabla 2. Formas hereditarias de CR

Síndrome	Gen/proteína	Localización cromosómica	Tumor Renal asociado
Von Hippel-Lindau (VHL)	VHL/pVHL	3p25-26	CRCC múltiple y bilateral
Translocaciones constitucionales 3p	FHIT/FHIT	3p14, 3q13.3, 3q21	CRCC múltiple y bilateral
Esclerosis Tuberosa	TSC1/hamartina	9q34	CRCC
	TSC2/tuberina	16p13.3	CR papilar y cromóforo.

○ **Enfermedad de Von Hippel-Lindau**

Síndrome autosómico dominante con una incidencia aproximada de 1/40.000 individuos. Predispone a una serie de tumores benignos y malignos a nivel del sistema nervioso central, riñón, páncreas, glándula adrenal y retina.

Las lesiones renales son frecuentes, con una prevalencia de un 30-70% de los casos, las lesiones incluyen: quistes simples y múltiples mimetizando los riñones poliquísticos y CRCC múltiples y bilaterales.

La edad de presentación es más temprana (3^o-4^o décadas) y el pronóstico es menos severo.

La mutación está presente en el 100% de los casos (80% hereditario y 20% de novo). El gen VHL funciona como un supresor tumoral, de manera que la inactivación secuencial de ambos alelos origina la carcinogénesis. En la enfermedad de VHL, los pacientes nacen con una mutación germinal de uno de los alelos; la segunda mutación somática va ligada al desarrollo de quistes o tumores.

Las familias VHL pueden clasificarse basándose en la ausencia (tipo 1) o presencia (tipo 2) de feocromocitomas. A su vez las familias tipo 2 pueden subdividirse de acuerdo con el riesgo de desarrollar CR: bajo riesgo (tipo 2A), alto riesgo (tipo 2B) o únicamente desarrollo de feocromocitomas sin otros estigmas de enfermedad (tipo 2C).

- **Esclerosis Tuberosa**

Síndrome autosómico dominante que afecta a 1/6.000 individuos y se caracteriza por la presencia de tumores benignos que implican a múltiples órganos y tejidos. Algunos pacientes desarrollan además CR del tipo células claras, papilar o cromóforo.

Se origina a partir de mutaciones germinales en los genes supresores de tumor TSC1 o TSC2 (*tuberous sclerosis complex gene*). La prevalencia de mutaciones es similar para ambos genes. El TSC1 (9q34) codifica la proteína hamartina y el TSC2 (16p13.3) codifica la tuberina; ambas participan en las vías de señalización que controlan el crecimiento celular. La vía TSC interacciona con la vía mTOR e indirectamente con la vía VHL-HIF y la pérdida de TSC2 da lugar al incremento del factor de crecimiento vascular endotelial.

- **Translocaciones constitucionales 3p**

Se han descrito algunas familias en las que los miembros portadores de una translocación constitucional equilibrada implicando el cromosoma 3p presentan predisposición a padecer CRCC.

Se ha sugerido la posible implicación del gen FHIT (*fragile site histidine triad*) localizado en el lugar frágil 3p14 (FRA3B). Se cree que el gen FHIT es un gen supresor tumoral pero su función todavía no es bien conocida.

IV. SCREENING Y ASOCIACIONES CLÍNICAS

Muchos factores hacen el screening de CR atractivo. Lo más importante es que un diagnóstico precoz y el tratamiento quirúrgico de la enfermedad optimizan la oportunidad de cura. Desafortunadamente, la posibilidad de salvar paciente con enfermedad avanzada es limitada. En base a esto, muchos opinan que el screening ofrece ventajas respecto a diagnóstico precoz o incidental del CR.(3–9)

El factor principal que limita la aplicación de un screening de CR es la relativa baja incidencia del CR en la población general. En este entorno un test de screening debe tener 100% de especificidad para evitar una tasa inaceptablemente alta de falsos positivos que podría conducir a procedimientos diagnósticos y terapéuticos innecesarios, caros y potencialmente dañinos. Además, incluso aunque el test fuera 100% sensible y específico, el marco donde se aplicaría el screening sería tan limitado que no sería considerado coste-efectivo. Incluso aunque consideremos una población con factores de riesgo para CR como género masculino, edad avanzada, consumo de tabaco, etc. un screening generalizado sería difícil de justificar debido al aumento del riesgo relativo asociado a cada uno de esos factores en 2-3 veces. Otro factor de confusión es la prevalencia de tumores clínicamente no significativos como adenomas (frecuente en autopsias 10-20%) y otros tumores benignos. Todos estos factores refuerzan la recomendación de no practicar screening en CR.

Numeroso estudios se centran en estudios moleculares de biomarcadores en sangre u orina para detectar CR. Estos estudios pueden detectar alteraciones microsátélites en el DNA, mutaciones o hipermetilaciones en el gen VHL, expresión de proteínas específicas de CR como el CA-9, sobrerregulación de actores angiogénicos incluido el VEGF.

Sin embargo, el screening debería estar centrado en poblaciones bien definidas como pacientes con enfermedad renal terminal, poliquistosis renal adquirida, esclerosis tuberosa y CR familiar. El 80% de los pacientes con IR terminal desarrollan poliquistosis y dentro de este subgrupo el 1-2% CR. El riesgo relativo de padecer CR en los pacientes con IR se estima que es 5-20 veces más alto que en la población general. El 15% de los paciente que desarrollaran CR en el contexto de una IR terminal tienen metástasis en el momento del diagnóstico.

Es en este tipo de poblaciones el que habría que tener en consideración a la hora de practicar un screening para CR.

V. PATOLOGIA DEL CÁNCER RENAL

El CR no es una entidad única sino que comprende una serie de tumores que se originan en el parénquima renal, cada uno de ellos con características histopatológicas, curso clínico y respuesta a la terapia distintos.

Desde 1990 la clasificación histológica del CR ha sufrido importantes cambios. En 2004 la WHO reflejó en su clasificación que el conocimiento actual del CR se entiende no como una única neoplasia maligna sino como un grupo de diferentes subtipos de tumor con una base genética diferente y una única presentación clínica. De acuerdo con la clasificación de la WHO 2004, dentro del CR se distinguen los siguientes subtipos histológicos: “*papilar*” (10-15%), “*cromóforo*” (4-5%) y “*de conductos colectores o de Bellini*” (< 1%). El subtipo “*células claras*” (CRCC) es el tipo histológico más frecuente y representa el 80-90% de todos los CR.

El aspecto macroscópico típico del CRCC es el de una masa solitaria, redondeada u ovoidea y que está rodeada de una pseudocápsula de parénquima comprimido y tejido fibroso más que de una verdadera cápsula. Al corte son de color amarillo, marrón o tostado con áreas de fibrosis, necrosis o hemorragia. Degeneración quística se halla en el 10-20% de los tumores y parece estar relacionada con mejor pronóstico que los tumores puramente sólidos. Las calcificaciones están presentes en el 10-20% de los casos en forma de placas o acúmulos redondeados (10).

El carácter agresivo local no es infrecuente sin embargo es más común el desplazamiento de estructuras adyacentes. La extensión de la enfermedad a órganos adyacentes o a la pared abdominal suele estar precedida de la afectación de la Gerota que actúa como una barrera natural. La invasión local, presente hasta en el 20% de los

casos, se puede manifestar como: invasión de bordes o perforación de la cápsula, invasión del seno renal o del sistema colector.

Una característica particular del CR es la predilección por la invasión venosa, presente en el 10% de los casos. Su extensión en forma de trombo tumoral que se dirige hacia caudal por la vena cava inferior y hacia craneal hasta la aurícula derecha. La infiltración tumoral de la pared de la vena renal o de la vena cava se relaciona con mal pronóstico.

La mayoría de los CR son unifocales y unilaterales. Las formas bilaterales pueden ser sincrónicas o asincrónicas y se encuentran en el 2-4% de las formas esporádicas siendo mucho más frecuente en las formas familiares del CR como el Von Hippel-Lindau.

Las formas multicéntricas, presentes en el 10-20% de los casos, son más frecuentes en la variedad papilar y formas familiares de CR. Análisis moleculares sugieren un origen clonal para tumores multifocales en el mismo riñón; sin embargo, en el riñón contralateral se trataría de un crecimiento independiente para tumores sincrónicos o metástasis para tumores asincrónicos.

Microscópicamente, el CRCC es un tumor muy vascularizado con una red de delicados sinusoides separados entre sí por acinos de células tumorales. Ultraestructuralmente, el CRCC está constituido por 2 tipos de células: células claras y células granulares, ambas procedentes de las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales (10).

Las células claras son grandes, de contorno bien delimitado y de forma típicamente redondeada o poligonal. El núcleo es central y su tamaño y formas son variables. Su citoplasma es amplio con abundante contenido en glucógeno, colesterol, ésteres y fosfolípidos todos ellos fácilmente extraíbles con los solventes usados de manera

habitual en las preparaciones histológicas, contribuyendo así a la apariencia clara de las células y a ese aspecto de “vacío” característico de este tumor.

Las células granulares tiene un núcleo redondeado de tamaño variable. El citoplasma es eosinófilo y de aspecto granular, con escaso contenido en lípidos y glucógeno y poca cantidad de órganos citoplasmáticos, siendo el órgano más abundante las mitocondrias. Aproximadamente el 50% de los casos son positivos para vimentina y expresan citokeratinas 8 y 18.

Entre un 2 y un 5% de los CRCC muestran características sarcomatoides y es frecuente encontrar también invasión venosa.

El CRCC muestra diversidad de patrones histopatológicos y su subclasificación depende fundamentalmente del hecho estructural predominante. Podemos distinguir al menos 2 patrones de crecimiento: un “*patrón sólido*” con una distribución uniforme de las células neoplásicas y un “*patrón tubular*” en el que las células se disponen formando túbulos (10).

La clasificación de Fuhrman en cuatro grados histológicos (11), se basa en las características nucleares de las *células* claras y es la clasificación más ampliamente aceptada en el CRCC (*Tabla 3*).

Tabla 3. Clasificación de Fuhrman

Grado	Tamaño del núcleo	Contorno del núcleo	Nucleolo
1	10 mm	Redondo, uniforme	Ausente
2	15 mm	Irregular	Pequeño (visible a 400x)
3	20 mm	Irregular	Prominente
4	≥ 20 mm	Bizarro, multilobulado	Prominente, acúmulos groseros de cromatina

VI. ESTADIO TUMORAL

El estadiaje de los tumores es imprescindible para establecer la estrategia terapéutica y el pronóstico evolutivo.

La clasificación más comúnmente aceptada es el sistema TNM (12), que ha sido modificada por última vez en 2010 (*Tabla 4*).

Tabla 4. Clasificación TNM

T. Tumor primario

Tx: el tumor primario no puede ser valorado

T0: no existe evidencia de tumor primario

T1: Tumor primario < 7 cm de diámetro mayor, confinado al riñón

T1a: Tumor primario < 4 cm de diámetro mayor, confinado al riñón

T1b: Tumor primario > 4 cm pero < 7 cm de diámetro mayor, confinado al riñón

T2: Tumor primario > 7 cm de diámetro mayor, confinado al riñón

T2a: Tumor primario > 7 cm pero < 10 cm de diámetro mayor, confinado al riñón

T2b: Tumor primario > 10 cm de diámetro mayor, confinado al riñón

T3: Tumor invade las venas mayores o la glándula adrenal o la grasa perirrenal sin sobrepasar las fascia de Gerota.

T3a: el tumor invade la vena renal o sus ramas segmentarias (con músculo), infiltra la grasa del seno

T3b: el tumor invade la vena cava por debajo del diafragma

T3c: el tumor invade la vena cava por encima del diafragma o infiltra la pared de la vena cava.

T4: Tumor invade más allá de la fascia de Gerota

N. Ganglios Linfáticos Regionales

Nx: no se puede valorar los ganglios regionales

N0: no se demuestran metástasis ganglionar regional

N1: metástasis a nivel de un único ganglio regional

N2: metástasis en más de un ganglio regional

M. Metástasis a distancia

M0: ausencia de metástasis

M1: metástasis a distancia

Agrupación por estadios TNM

Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1,T2,T3	N1	M0
Estadio IV	T4	cualquier N	M0
	cualquier T	N2	M0
	cualquier T	cualquier N	M1

VII. FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CÁNCER RENAL

Los factores pronósticos (FP) involucrados en el CR localizado incluyen síntomas o signos clínicos específicos, factores relacionados con el tumor y determinaciones de laboratorio (13). Pueden ser clasificados en: *anatómicos, histológicos, clínicos y moleculares* (12) (Tabla 5).

Factores relacionados con el paciente, como edad y comorbilidades tiene un impacto significativo en la supervivencia global en algunos pacientes y debería ser tenido en cuenta a la hora de planificar el tratamiento en pacientes con CR localizado (14–16).

Los factores relacionados con el tumor como estadio, tamaño tumoral, grado nuclear y subtipo histológico son factores independientes de gran utilidad. Sin embargo, desde un punto de vista integrador, combinando una variedad de factores se ha demostrado que tienen mayor potencia pronóstica (13,17–21).

a. Factores Anatómicos

El tamaño tumoral, la invasión venosa, la invasión de la cápsula renal, la afectación de la glándula suprarrenal así como la afectación ganglionar y la existencia de metástasis son factores recogidos en la clasificación TNM y que permiten planificar el tratamiento, predecir la morbilidad y el pronóstico.

La clasificación TNM distingue claramente diferentes grupos confirmando la ausencia de afectación locorregional o afectación sistémica al diagnóstico como el primer determinante de pronóstico en esta enfermedad.

Muchos estudios demuestran una supervivencia a 5 años de 70-90% para enfermedad órganoconfinada y una reducción de hasta el 15-20% de la supervivencia cuando hay invasión de la grasa perirrenal (13,22,23).

La invasión del seno renal se clasifica junto con la invasión de la grasa perirrenal como T3a y numerosos estudios sugieren que estos pacientes tienen un riesgo elevado de metástasis en relación con el acceso al sistema venoso (9,24-27).

La afectación del sistema colector también ha demostrado conferir peor pronóstico en una CR órgano confinado (28,29).

Muchos autores han demostrado que muchos pacientes con afectación directa o metástasis adrenal ipsilateral, presente en el 1-2% de los casos, fallecen por progresión sistémica, sugiriendo una diseminación hematógena o un fenotipo agresivo (30-34).

Los sistemas de clasificación más recientes reclasifican como T4 la afectación de la glándula adrenal, antes M1, para reflejar el mal pronóstico asociado (34,35).

La afectación venosa ha sido considerada como hallazgo de mal pronóstico en RC pero varios estudios han demostrado que pacientes con trombo en la vena pueden ser rescatados con un abordaje quirúrgico agresivo. Se estima una supervivencia a 5 años de 45-69% para aquellos pacientes con trombo en la vena y tumor confinado al riñón (36-41).

Pacientes con trombo tumoral en la vena y afectación linfática o metástasis sistémicas asociadas, tiene una supervivencia sensiblemente menor y aquellos con afectación de la grasa perirrenal tienen una supervivencia intermedia (39,40,42-47).

La invasión directa de la pared de la vena es un factor pronóstico más importante que el nivel que alcance el trombo venoso y ahora es clasificado como pT3c independiente del nivel del trombo tumoral (48,49).

El mayor descenso en el pronóstico se produce en aquellos pacientes en los que el tumor se extiende más allá de la fascia de Gerota e invade órganos contiguos (estadio T4), en los que rara vez hay supervivencia a 5 años, y en aquellos pacientes con afectación linfática o metástasis sistémicas (50,51). La afectación linfática está asociada con supervivencias a 5 y 10 años de 5-30% y del 0-5% respectivamente (52). En el caso de metástasis también confieren un mal pronóstico en el CR, la supervivencia a 1 año ronda menos del 50%, a 5 años entre el 5-30% y a 10 años entre 0-5%, aunque estos porcentajes han mejorado modestamente desde la introducción de nuevas moléculas para el tratamiento (53-56). Muchos pacientes con metástasis sincrónicas fallecen dentro del 1º año debido a progresión de la enfermedad. En pacientes con metástasis asincrónicas, el intervalo libre de metástasis se ha demostrado como un predictor útil ya que refleja el tiempo de progresión de la enfermedad (53,55-57).

b. Factores Histológicos

En este apartado se incluye: el grado nuclear de Fuhrman, el subtipo histológico de CR, la presencia de morfología sarcomatoide, la microinvasión vascular, la presencia de necrosis tumoral y la invasión del sistema colector.

El grado nuclear de Fuhrman (11) es el sistema de gradación histológico más comúnmente aceptado y pese a las diferencias intra e inter observador que puedan existir, es un factor pronóstico independiente en el CR (58).

Entre los subtipos histológicos de CR, se sabe que el CR cromóforo tiene que mejor pronóstico que el papilar y que el CRCC. Dentro del subtipo histológico “papilar” el tipo I (tumores de bajo grado y citoplasma cromofílico) tiene mejor pronóstico el tipo II (tumores de alto grado, tendencia a desarrollar metástasis y citoplasma eosinófilo).

c. Factores Clínicos

Los hallazgos clínicos sugestivos de un pronóstico comprometido en pacientes con CR presuntamente localizado incluyen presentación sintomática, pérdida de peso > 10% del peso corporal, pobre performance status (17,22,59–63).

La presencia de alteraciones analíticas tales como: anemia, trombocitosis (64–66), hipercalcemia, albuminuria (67), elevación de la fosfatasa alcalina, elevación de la proteína C reactiva, elevación de lactato deshidrogenasa y elevación de la velocidad de sedimentación eritrocitaria se han relacionado con pobre pronóstico en pacientes con CR (22,59,61,68).

Aunque valores anormales son más frecuentes en pacientes con CR avanzado, algunas de estas anormalidades como hipercalcemia, anemia, elevación de la velocidad de sedimentación son factores pronósticos independientes de mortalidad cáncer específica en pacientes con CR localizado después de valorar otros factores pronósticos mayores.

d. Factores Moleculares

Multitud de marcadores moleculares han sido investigados: anhidrasa carbónica IX (CA-IX) (23), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (69), factor inductor

de hipoxia (HIF), factor de proliferación Ki67, p53, E-cadenina, proteína C reactiva (PCR), y CD44.

Estos marcadores moleculares parecen servir como factores pronósticos independientes para el CR y han proporcionado importantes conocimientos acerca de la biología tumoral. Uno de ellos es el CA-IX regulado por el gen VHL y sobreexpresado en muchos de los CRCC (23,70). Estudios iniciales han demostrado que un descenso en la expresión del CA-IX se asocia de manera independiente con peor supervivencia en pacientes con CR metastásico (63,70), esta asociación no parece existir en pacientes con enfermedad localizada (23,62). El CA-IX también puede servir como marcador de la respuesta a la terapia sistémica en pacientes con enfermedad avanzada (70,71).

El B7-H1 es una molécula correguladora de los linfocitos T que parece comportarse como un factor independiente de progresión en CR. Y esta asociación se mantiene tras tener en cuenta otros factores moleculares, clínicos y patológicos (21).

El aumento de la expresión del Ki-67 también se ha relacionado con una supervivencia reducida en el CRCC (21,70,72)

Tabla 5. Factores pronósticos en CR

Anatómicos	Clínicos	Histológicos	Moleculares
Tamaño tumoral	Performance status	Grado nuclear	Factores hipoxia-
Afectación linfática	(Karnofsky, ECOG)	Fuhrman	inducidos: CA-IX, IGF-1,
Metástasis a distancia	Síntomas sistémicos	Subtipo histológico	VEGF, VEGFRs, CA-
Afectación de otros órganos por contigüidad	(caquexia, pérdida de peso >10%)	histológico	XII, CXCR3, CXCR4,
Afectación venosa	Anemia	Diferenciación sarcomatoide	HIF.
Afectación suprarrenal (directa o metastásica)	Trombocitosis	Necrosis	Moléculas
	Hipercalcemia	Invasión vascular o linfática	coestimuladoras: B7-H1,
	Elevación de:	Afectación de tejido perirrenal o grasa del seno	B7-H3, B7-H4, PD-1.
	LDH, VSG, PCR, FAlc	Afectación de sistema excretor	Reguladores del ciclo celular: PTEN, TP53,
		Márgenes quirúrgicos	Bcl2, CyclinA, CDKN1B, Skp2.
		afectos	Moléculas de Adhesión: EpCAM, EMA, E-Cad, α -catenina, Cad-6.
			Otros factores: Ki-67, CD44, Vimentina, Anexina II, Caveolin-1, Gelsolin, XIAP.

e. Modelos Pronósticos

Desde 2001, se han desarrollado multitud de modelos matemáticos con el objetivo de obtener herramientas pronósticas que ayuden en la toma de decisiones.

Los algoritmos ayudan a la clasificación de los pacientes en categorías pronósticas. Por el contrario, los nomogramas son representaciones gráficas de modelos de análisis multivariante y calculan con precisión las probabilidades de supervivencia en un paciente en concreto (73).

Existen nomogramas y modelos pronósticos, tanto para el CR localizado como para el CR metastásico, en base a las variables anatómicas, histológicas y clínicas. No obstante, no se tiene en consideración las variables moleculares ya que no se ha demostrado que éstas mejoren la precisión de los sistemas pronósticos que se emplean en la actualidad.

En concreto para el CR localizado, objeto de nuestro estudio, los modelos más comúnmente aceptados son (*Tabla 6*):

- “UCLA *integrated staging system*” (UISS):

En 2001, Zisman et al (17) propusieron reclasificar los pacientes con CR en 5 categorías distintas en función de tres variables: clasificación TNM, ECOG-PS y grado nuclear de Fuhrman. Este sistema fue creado a partir del análisis de SG de 661 pacientes sometidos a nefrectomía radical en la Universidad de California, Los Ángeles (UCLA). No se tuvo en cuenta la histología tumoral. A los cinco años la SG en el grupo I fue de 95%, 67% en el grupo II, 39% en el grupo III, 23% en el IV y 0% en el V. Esta clasificación permite distinguir 3 grupos pronósticos: bajo, intermedio y alto riesgo de progresión y muerte. La validación externa de este nomograma ha sido realizada por Han KR en 2003 (74) y Patard JJ et al en 2006 (75).

- **SSIGN “Stage Size Grade Necrosis Score”:**

En 2002, Frank et al. (20) propusieron un algoritmo para predecir SCE en CR. El modelo se desarrolló a partir de una muestra de 1.801 pacientes sometidos a nefrectomía radical en la Clínica Mayo entre los años 1979-1998. Únicamente se incluyeron las variables estadísticamente significativas en el análisis multivariante: TNM ($p < 0.001$), tamaño tumoral > 5 cm ($p < 0.001$), grado nuclear de Fuhrman ($p < 0.001$) y la presencia de necrosis en el análisis microscópico ($p < 0.001$). Los autores describen 10 categorías de pacientes con distintas SCE.

Posteriormente, en 2003, el mismo grupo propuso un algoritmo similar para estimar la SLE en un grupo de 1.671 pacientes con CR no metastásico y sometidos a nefrectomía radical. En esta ocasión la clasificación es en 8 grupos en lugar de 10.

- **Nomograma postoperatorio de Karakiewicz (76):**

Este nomograma fue diseñado para predecir SCE a 1, 2, 5 y 10 años en pacientes sometidos a nefrectomía radical por CR en cualquier estadio. Se reclutaron 2.530 pacientes en un estudio multicéntrico a nivel europeo que posteriormente se validó externamente en una población de 1.422 pacientes. En el análisis multivariante se identificaron como factores predictores de SCE: clasificación TNM, tamaño tumoral, grado de Fuhrman, subtipo histológico, edad y síntomas. Todas estas variables excepto la edad, fueron incluidas en el nomograma.

- **Nomograma postoperatorio de Kattan (77):**

Este nomograma fue creado para predecir SLE. Se desarrolló a partir de una muestra de 601 pacientes con CR no metastásico y sometidos a nefrectomía radical en el Memorial Sloan Kettering Cancer Center entre 1989 y 1998. En la población estudiada se

encontró una SLE a 5 años del 86%. El análisis multivariante determinó que únicamente el tamaño tumoral ($p = 0.0005$) y el subtipo histológico ($p = 0.03$) se comportaban como variables independientes predictoras de SLE. Sin embargo, otras variables estadísticamente no significativas fueron incluidas (presencia de síntomas al diagnóstico y pT). El diseño de este nomograma ideado exclusivamente para predecir SLE limita su uso clínico (73).

Tabla 6. Nomogramas CR localizado

Nomogramas	Variables					
	Clasificación TNM	ECOG performance status	Síntomas	Grado Fuhrman	Tamaño tumoral	Necrosis tumoral
UISS	x	x		x		
SSIGN	x			x	x	x
Karakiewicz	x		x	x	x	
Kattan	x		x		x	

VIII. MICRO-RNAS

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas secuencias de RNA (22 nucleótidos de longitud), no codificantes para proteínas, pero que actúan como genes reguladores postranscripcionales mediante el apareamiento de bases con su ARN mensajero complementario.

Alrededor del 30% del genoma humano está regulado por mecanismos dependientes de miRNAs. Un único miRNA puede regular más de 200 transcritos diferentes y un mismo RNA puede ser regulado por múltiples miRNAs.

Los primeros miRNAs se descubrieron en 1993. Sin embargo no fue hasta el 2000, año en que se aisló el segundo miRNA, que los miRNA fueron considerados verdaderos marcadores moleculares o incluso dianas terapéuticas.

Los primeros miRNAs en el reino animal fueron descubiertos mediante clonación de secuencias de DNA copias procedentes de muestras de RNA total fraccionadas por tamaño (fracción de los RNA pequeños) provenientes de *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*. Anteriormente, los únicos miRNAs identificados como tales era lin-4 y let-7 (*C. elegans*), aunque eran conocidos como RNA temporales pequeños o stRNAs.

De hecho los autores de esos primeros trabajos (78–80) fueron los primeros en acuñar el término "*microRNA*" para describir ese nuevo RNA de 22 nucleótidos y cuyas características se definen así:

- No codifican un producto proteico
- Proviene de precursores endógenos con estructura de horquilla
- Son conservados filogenéticamente

- Sus secuencias son encontradas en el genoma del organismo correspondiente o alguna especie relacionada.
- Su expresión es detectada por hibridación (Northern blot)

a. Síntesis de un microRNA

En la actualidad se conocen dos vías para la biogénesis y procesamiento de los miRNA: la *vía canónica* y otras *vías alternativas llamadas vías no canónicas (81)*.

○ **Vía Canónica de Biosíntesis de un miRNA:**

En la vía canónica los miRNAs son inicialmente transcritos en el núcleo celular a partir de precursores largos de RNA llamados miRNA primarios o pri-miRNA (del inglés, *primary micro-RNAs*). La transcripción de los genes de miRNA generalmente es mediada por la polimerasa II o la polimerasa III en el caso de que los miRNA lleven asociados repeticiones del grupo *Alu*. Para la maduración de los pri-miRNA es necesario un complejo microprocesador formado por la enzima Droscha y su cofactor, la proteína de la región crítica del gen 8 del Síndrome Di George (DGCR 8, del inglés *DiGeorge syndrome critical region gen 8 protein*).

El complejo microprocesador genera una horquilla de 70 nucleótidos, llamado precursor de miRNA (*pre-miRNA*) que es exportado al citoplasma por medio de la exportina 5´.

En el citoplasma, los pre-miRNA son reconocidos por el complejo de reconocimiento de pre-miRNA formado por la enzima Dicer, la proteína de unión a RAN en respuesta a trans-activación (TRBP) y la proteína quinasa activadora independiente de RAN de cadena doble inducida por interferón (PPKRA)

En el complejo de procesamiento de pre-miRNAs, Dicer cliva los pre-miRNAs cerca del bucle terminal, generando un dúplex de miRNA maduro de aproximadamente 22 nucleótidos (miRNA:miRNA*), este dúplex contiene una cadena madura de miRNA y su cadena complementaria, la cadena pasajera (miRNA*). Este complejo se ensambla con la proteína Argonauta 2 para formar el complejo silenciador inducido por ARN (RISC, del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*), el cual selecciona la cadena madura o cadena guía. Ésta cadena guía es la responsable de dirigir el silenciamiento.

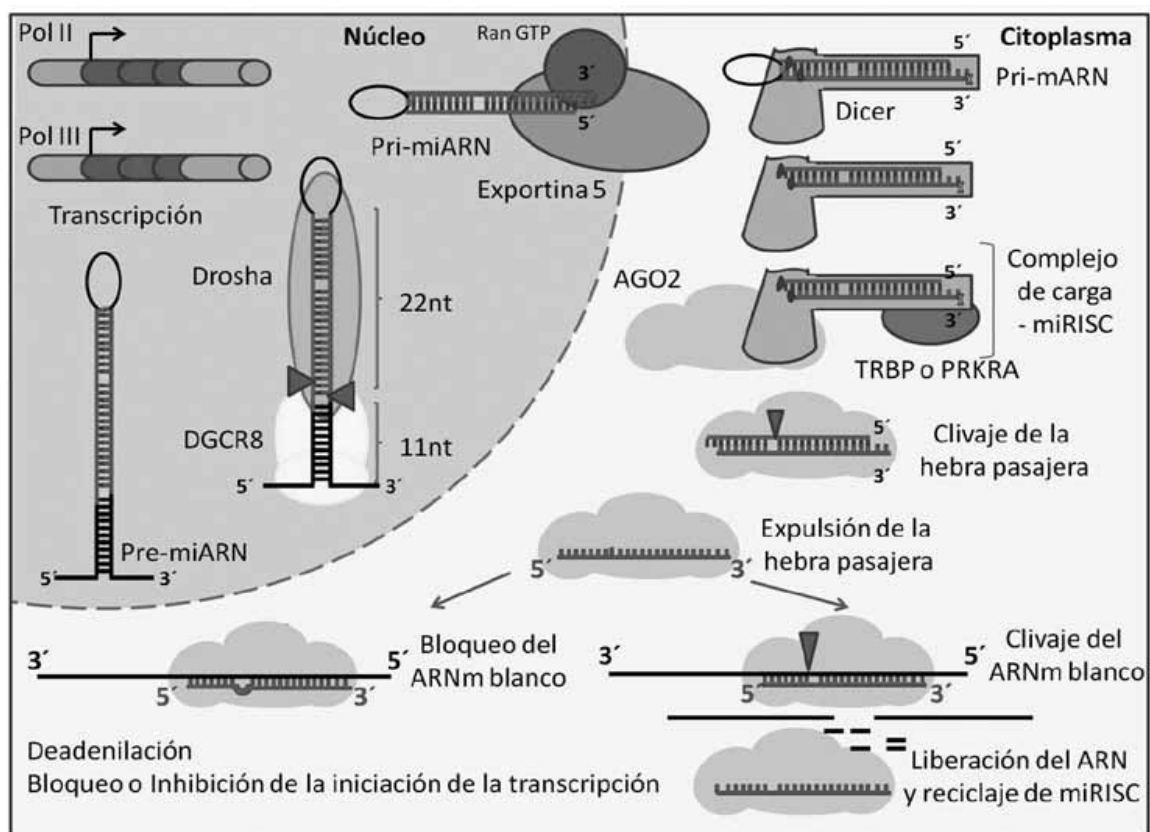


Imagen 1. Vía canónica de biosíntesis de un microRNA

○ **Vía no canónica de generación de miRNAs:**

Los miRNA generados por esta vía no cumplen la definición clásica de miRNA. La mayoría de los mamíferos y la especie *H. sapiens*, utilizan la vía canónica para la generación de los miRNAs. Sin embargo, organismos como *Drosophila megaloblaster*, *Giardia lamblia*, *Zebrafish* y *Murine Gamma-herpesvirus 68* utilizan vías no canónicas.

Las vías no canónicas son una prueba de la flexibilidad y habilidad de las células para generar estructuras en forma de horquilla como pre-miRNAs (*Tabla 7*)

La principal diferencia entra las vías canónicas y no canónicas radica en que la primera incluye en su maquinaria dos enzimas: *Drosha* y *Dicer*, que realizan su efecto a nivel del núcleo y citoplasma, respectivamente. Sin embargo, la vía no canónica tan solo puede utilizar una de estas dos proteínas y de acuerdo a la utilización de la enzima *Drosha* o *Dicer*, los miRNAs generados por la vía no canónica pueden se agrupados en dos grandes categorías (*Tabla 7*).

Tabla 7. Vías no canónicas de generación de un miRNA

Maquinaria	Vía	Organismo
	Mitrones	<i>Mamíferos y D. megalobaster</i>
	miRNA derivados de RNA nucleolar pequeño (<i>snoRNA</i>)	<i>G. lamblia y mamíferos</i>
	miRNA derivados de RNA endógenos de horquilla pequeña (<i>shRNA</i>)	<i>Mamíferos</i>
Vía independiente de Drosha	miRNA derivados de RNA de transferencia (<i>tRNA</i>)	<i>Mamíferos</i>
	Vía independiente de ribonucleasa de transferencia Z (<i>tRNasaZ</i>)	<i>Murine Gamma-herpesvirus</i> 68
	miRNA derivados de horquilla terminal de un precursor de RNA interferente pequeño endogenos (<i>endo-siRNA</i>)	<i>D. megaloblaster</i>
	Vía dependiente de Argonauta	<i>Zebrafish y mamíferos</i>
Vías independientes de Dicer	Vía dependiente de ribonucleasa de transferencia Z (<i>tRNasaZ</i>)	<i>Mamíferos</i>

b. Nomenclatura de un microRNA

El sistema de registro de secuencias de miRNAs, *miRBase Registry* (82), asigna el nombre oficial de nuevas secuencias de miRNAs de acuerdo con un sistema de nomenclatura establecido previamente.

En primer lugar se asigna un prefijo de tres o cuatro letras para indicar la especie donde fue descrito el miRNA, por ejemplo *hsa* para *Homo sapiens* (humano) y *mmu* para *Mus musculus* (ratón).

Lo siguiente es asignar el término miR que indica una secuencia de miRNA maduro, seguido de un número de identificación único que se asigna de manera secuencial de acuerdo con el orden de identificación de cada nueva secuencia (por ejemplo, *hsa-miR-103*). En el caso particular de los miRNAs que difieren por sólo uno o dos pares de bases, se agrega un sufijo (letra) al nombre original (por ejemplo, *hsa-miR-130b*).

c. Importancia Biológica de los microRNAs

La función de los miRNAs consiste principalmente en la regulación genética. Los miRNAs pueden ser interpretados como moduladores de la expresión genética mediante su unión a genes que son cruciales para controlar importantes procesos celulares como: el crecimiento celular, apoptosis, diferenciación y proliferación.

Debido a su implicación en procesos celulares básicos, su alteración se encuentra íntimamente relacionada con la carcinogénesis. Los miRNAs asociados al desarrollo de cáncer se denominan *oncomirs* (83).

La primera vez que encontró asociación entre un miRNAs y cáncer fue en la Leucemia Linfática Crónica. Desde entonces se han aislado numerosos perfiles de miRNAs

relacionados con procesos neoforativos en diferentes localizaciones anatómicas así como distintos perfiles de miRNAs relacionados con diferentes subtipos histológicos tumorales en una misma localización (84).

Diferentes mecanismos de alteración de miRNA han sido relacionados con enfermedades de todo tipo. Por ejemplo, el grupo *mir-17-92* está amplificado en el linfoma, al igual que el *mir-26a* en el glioblastoma y el *mir-17-91* está traslocado en la leucemia linfoblástica aguda de células T. La disregulación de *let-7* está asociada con cáncer gástrico, próstata, colon, ovario, melanoma y linfoma; el *mir-26a* se asocia a carcinoma hepatocelular y carcinoma de tiroides.

En la actualidad, hay más de 38.000 publicaciones relacionadas con miRNAs en PubMed. Sólo en el último año hay más de 8.000 en comparación con las 5 publicaciones recogidas en 2001. Estas cifras traducen la magnitud del interés que despiertan los miRNAs al albergar un gran potencial como blancos terapéuticos y nuevos biomarcadores para el pronóstico y diagnóstico de cáncer. La manipulación de la actividad y la biogénesis de los miRNAs podría ser una estrategia para el desarrollo de terapias contra el cáncer (85).

HIPÓTESIS

El CR comprende un grupo heterogéneo de entidades con un comportamiento desigual de la enfermedad. En el CRCC en estadios iniciales de la enfermedad (estadios I y II) interesaría identificar con mayor precisión aquellos pacientes con mayor riesgo de progresión de enfermedad. El empleo de un perfil de microRNAs como factor pronóstico ayudaría a determinar el curso de la enfermedad y a identificar a un subgrupo de pacientes en riesgo de progresión.

OBJETIVOS

- **Objetivo principal:**

1. Identificar un perfil de microRNA que pueda estar relacionado con alto riesgo de progresión de la enfermedad en pacientes con CRCC estadio I y II.

- **Objetivos secundarios:**

1. Identificar un perfil de microRNA que pueda estar relacionado con supervivencia cáncer específica en pacientes con CRCC estadio I y II.
2. Identificar otros factores pronósticos relacionados con progresión y muerte por cáncer.
3. Determinar la relación existente entre el perfil de microRNA con otros factores ya conocidos (clínicos y anatomopatológicos) y relacionados con el pronóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. DISEÑO DEL ESTUDIO

a. Tipo de Diseño

Para evaluar los objetivos propuestos se realiza un estudio observacional hacia delante donde se incluyen todas las nefrectomías radicales y parciales practicadas en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, entre los años 1999 y 2008.

b. Selección de pacientes

Se realizó un muestreo no probabilístico consecutivo para el cual se reclutó a todos los pacientes que cumplían con una serie de criterios de inclusión fijados durante el periodo de reclutamiento (2013-14).

Para adecuar la muestra a los criterios de selección se revisaron las historias clínicas de los pacientes extrayendo de ellas las variables preoperatorias, el estudio anatomopatológico de la pieza de nefrectomía y las variables postoperatorias.

c. Criterios de Inclusión

Para el estudio se incluyeron todos los pacientes sometidos a nefrectomía (radical o parcial, abierta o laparoscópica) entre 1999 y 2008.

De un total de 164 pacientes, seleccionamos 71 que cumplían los siguientes criterios:

- Histología células claras
- Estadio tumoral: estadio I (T1N0M0) y estadio II (T2N0M0)
- Cualquier grado de Fuhrman
- Cualquier tamaño tumoral, siempre que esté confinado al riñón (menor o igual a T2b)
- Cualquier ECOG
- Pacientes asintomáticos o con síntomas relacionados

d. Criterios de Exclusión

Se excluyó del estudio cualquier paciente con cualquiera de las características siguientes:

- Estadio tumoral mayor o igual a T3
- Cualquier N+
- Cualquier M+
- Cualquier otra histología (papilar, cromóforo, diferenciación sarcomatoide)
- Tiempo de seguimiento menor de 1 año
- Ausencia de datos suficientes en la historia clínica
- Ausencia de muestras en parafina para el análisis de microRNA

Se excluyeron del estudio 39 pacientes por tener otras histologías distintas a CRCC: 13 papilares, 18 cromófobos, 7 sarcomatoides y 1 células pequeñas.

Veintidós pacientes tenían un estadio tumoral mayor a T2: 7 T3a, 10 T3b, 1 T3c y 4 T4.

Siete pacientes tenían ganglios positivos: 4 N1 y 3 N2.

Quince pacientes eran M+.

Por tiempo de seguimiento se excluyeron a 4 pacientes: 1 con tiempo de seguimiento de 3 meses.

El resto de los pacientes (9) se excluyeron por falta de datos suficientes en la historia clínica o ausencia de material para el análisis de los miRNA.

II. PROCESAMIENTO ANATOMOPATOLÓGICO DE LA PIEZA DE NEFRECTOMÍA

a. Estudio macroscópico de la pieza de nefrectomía

Comprende el estudio de las características organolépticas de la pieza, tales como: ubicación de la lesión, tamaño, peso, forma, consistencia, descripción de la superficie externa y descripción de la superficie al corte.

b. Procesamiento de la pieza de nefrectomía

- Fijación: Tras recibir la pieza de nefrectomía parcial o radical, se pesa, se mide y se fija por inmersión en formaldehído (formol) al 10% durante 24-48 horas.
- Inclusión: La inclusión en parafina se realiza en un procesador automático de tejidos.
- Corte: el corte de la pieza deben seleccionar las siguientes áreas para el estudio microscópico: tumor renal, cápsula renal y tejido adiposo perirrenal, seno renal y vía urinaria, hilio renal (sección transversal de la arteria y vena renal y vena cava si se incluye), suprarrenal, parénquima normal macroscópicamente normal y ganglios regionales. Habitualmente, se realizan cortes seriados de 4-5 micras con un microtomo.
- Desparafinado e hidratación
- Tinción: se emplea Hematoxilina - Eosina por sus características iónicas que permiten diferenciar las estructuras ácidas de las básicas.
- Montaje de las muestras para su observación al microscopio óptico.

El informe emitido por el patólogo debe incluir la siguiente información:

- Tipo celular
- Grado nuclear de Fuhrman
- Estadiaje pTN
- Estado de los márgenes quirúrgicos
- Presencia o no de invasión vascular (venosa o linfática) e invasión perineural.

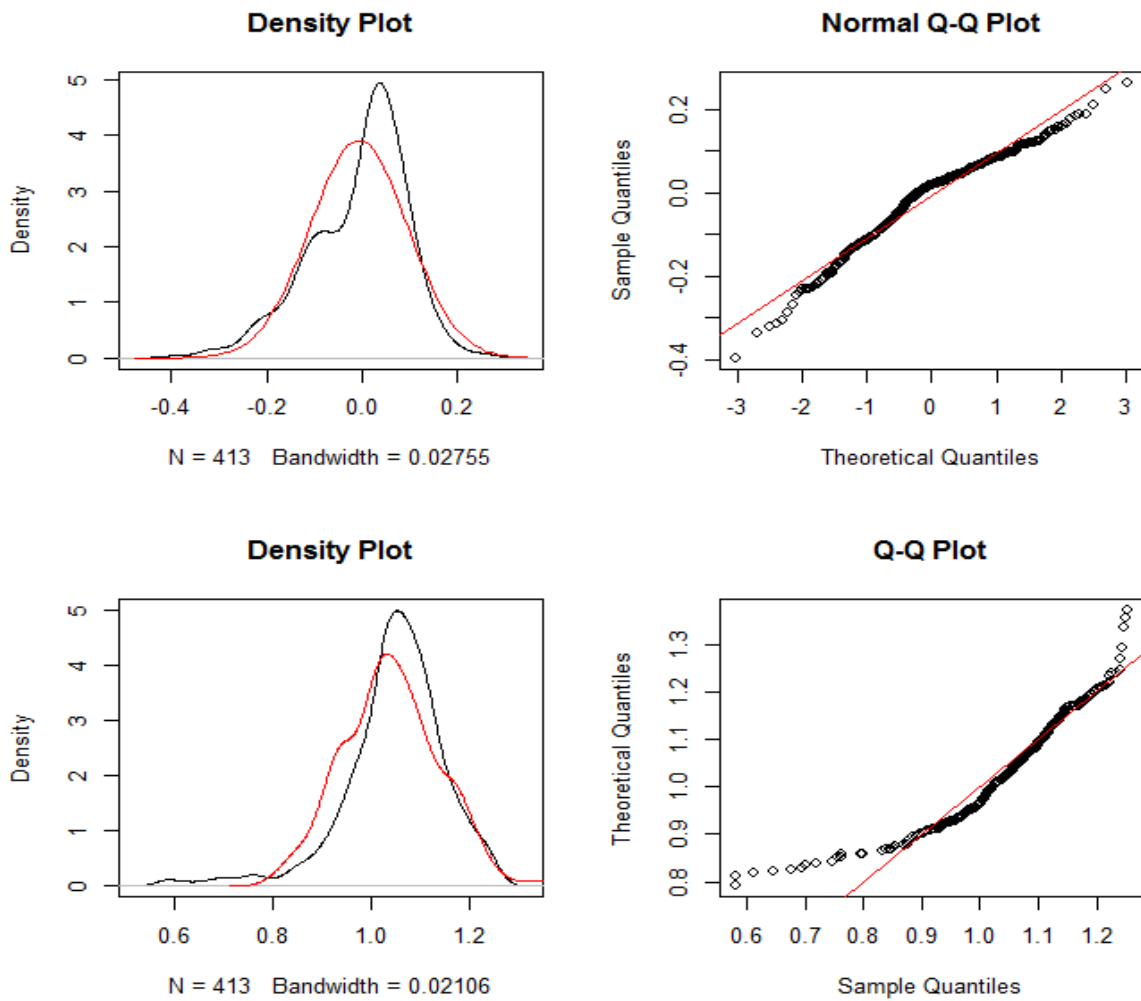
III. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MICRORNAS

Una vez construida una base de datos clínicos y seleccionados los cortes de material conservado en parafina, se procedió a la extracción del ARN a partir de dichos cortes.

Las muestras se hibridaron con microarrays de miRNA humanos versión 14.0, 8x15K (Agilent Technologies). Para marcar específicamente los miRNAs se empleó el MicroRNA Labeling Kit (Agilent Technologies). De forma sucinta, se desfosforilaron 100 ng de RNA total y se ligó una molécula de Cyanine 3-pCp al extremo 3' de cada molécula de RNA mediante el uso de la RNA ligasa de T4. El RNA marcado con Cy3 se hibridó durante 20 horas a 55 ° C en un horno de hibridación (G2545A, Agilent), con una concentración final de 1X de GE Blocking Agent y 1X de Hi-RPM Hybridization Buffer, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (miRNA Microarray System Protocol, Agilent Technologies). Las matrices se lavaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante (miRNA Microarray System Protocol, Agilent Technologies), se secaron utilizando una centrífuga a 1000 rpm durante 2 min y se escanearon con una resolución de 5µm en un Agilent ADN Microarray Scanner (G2565BA, Agilent Technologies), equipado con un software de rango dinámico ampliado (XDR). Las imágenes proporcionadas por el escáner fueron analizadas utilizando el software Feature Extraction version 10.7.3.1 de Agilent. Los datos se normalizaron con el método Cuantiles. Únicamente aquéllos miRNAs con una intensidad media por encima del percentil 20 de la intensidad global y una señal detectable en al menos un 10% de las muestras analizadas se consideraron para su posterior análisis.

a. Corrección del efecto de lotes

Los experimentos de microarrays se realizaron en tres tandas. Para evaluar las posibles diferencias entre las tandas y corregirlas, se empleó el programa ComBat (86). Como se aprecia en la figura, los datos de las distintas tandas presentan muy poca diferencia.



Gráfica 1. Corrección del Efecto de Lotes

b. Modelos predictivos, BRB.

Hemos calculado un nivel de significación estadística para cada miRNA basado en un modelo de regresión de Cox (87) con el objetivo de identificar un perfil de miRNAs cuya expresión estuviera relacionada significativamente con la supervivencia libre de enfermedad como se describe anteriormente (88). En pocas palabras, los miRNAs relacionados con supervivencia libre de enfermedad fueron filtradas en base a sus valores de p. MiRNAs que muestran un valor de $p < 0,01$ fueron utilizados para desarrollar modelos de predicción del riesgo de recurrencia utilizando el método de componentes principales supervisada de E. Bair y R. Tibshirani (89). Además, se evaluó la correlación entre los miRNAs seleccionados para establecer grupos de correlación con el fin de encontrar perfiles reducidos. Se utilizó una validación cruzada para evaluar la exactitud de predicción de los perfiles. El punto de corte se estableció a priori y para probar la significación estadística; el valor p en la prueba de log-rank para los grupos de riesgo se evaluó utilizando 10.000 permutaciones aleatorias. Los análisis se realizaron en BRB-ArrayTools v4_3_2. BRB-ArrayTools ha sido desarrollado por el Dr. Richard Simon y BRB-ArrayTools Equipo de Desarrollo.

IV. ANALISIS ESTADÍSTICO

a. Variables de estudio

Para el estudio se tuvieron en consideración las siguientes variables:

○ Variables Cuantitativas:

- Edad al diagnóstico (años)
- Tamaño de la pieza (mm)
- Tiempo de seguimiento (meses)
- Supervivencia global (meses) (SG)
- Supervivencia libre de enfermedad (tiempo hasta la progresión, meses) (SLE)
- Supervivencia cáncer específica (tiempo hasta el exitus por cáncer, meses) (SCE)
- Nomograma de Karakiewicz (% SCE a 5 años)
- Nomograma de Kattan (% SLE a 5 años)
- Nomograma UISS (% SCE a 5 años y % riesgo de progresión)

○ Variables Cualitativas dicotómicas:

- Género (masculino/femenino)
- Consumo de tabaco (si/no)
- Índice de masa corporal (IMC) mayor a 25 (si/no)
- Diálisis (si/no)
- Hipertensión arterial (HTA) (si/no)
- Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG PS) (0/>1)
- Existencia de síntomas al diagnóstico (si/no)
- Lateralidad de la enfermedad (derecho/izquierdo)

- Supervivencia (vivo si/vivo no)
- Muerto por cáncer (si/no)
- Progresión de la enfermedad (si/no)

- **Variables Cualitativas Policotómicas:**

- Riesgo anestésico (ASA) (I, II, III, IV)
- Clasificación T (T1a, T1b, T2a, T2b)
- Grado Fuhrman (1, 2, 3, 4)
- Tipo de abordaje quirúrgico (radical abierto, parcial abierto, radical laparoscópico, parcial laparoscópico)
- Tipo de síntomas al diagnóstico (dolor, hematuria, masa palpable, síndrome constitucional)

- **Transformación de variables:**

Para la realización de algunos análisis estadísticos las variables cuantitativas se recodificaron en variables cualitativas dicotómicas.

- Grado de Fuhrman (bajo grado 1-2/alto grado 3-4)
- Estadio clínico (estadio I: T1N0M0/estadio II: T2N0M0)
- Nomograma UISS, UCLA (bajo riesgo/riesgo intermedio)
- Nomograma de Kattan, MSKCC (SLE a 5 años > ó < 90%)
- Nomograma Karakiewicz (SCE a 5 años, > ó < 90 %)

b. Estadística descriptiva de las variables a estudio

La medida de tendencia central y de dispersión utilizada para expresar los resultados de las variables cuantitativas con distribución normal ha sido la media y la desviación estándar respectivamente.

La medida de tendencia central y de dispersión utilizada para expresar los resultados de las variables cuantitativas que no siguen una distribución normal ha sido la mediana y el rango intercuartílico (25-75) respectivamente.

Para describir la información contenida en las variables cualitativas se han utilizado los porcentajes (proporciones).

c. Estudio de las Variables Predictoras

Se estudió la asociación entre cada variable a estudio y la variable resultado (progresión de la enfermedad y muerte por cáncer de riñón).

Además se analizó de forma univariada y multivariada para predecir el comportamiento de cada una de las variables a estudio como factor pronóstico independiente de progresión de enfermedad y supervivencia cáncer específica.

- **Asociación entre variables predictoras y variables resultado (progresión de la enfermedad y muerte por cáncer de riñón) de forma univariada:**

La finalidad del test fue modelar cómo influye en la probabilidad de aparición de un suceso dicotómico (progresión de la enfermedad si ó no, muerte por cáncer si ó no), la presencia de diversos factores y el valor o el nivel de los mismos.

Se han usado test paramétricos (usando datos con valores reales pertenecientes a un intervalo) para el análisis estadístico de las variables cuando éstas cumplieran las siguientes condiciones:

- Independencia
- Normalidad
- Tamaño muestral > 30
- Homocedasticidad mediante test de Levene

Como test paramétrico para comparar las medias de dos muestras independientes se ha utilizado la t de student.

Para analizar variables cualitativas o categóricas comparando proporciones (o porcentajes) con la finalidad de ver si existe asociación entre ellas se ha usado como prueba de contraste de hipótesis el test de ji-cuadrado (χ^2) de Pearson. El valor de la p o probabilidad de que las diferencias encontradas se deban al azar que se ha tomado como referencia es $p < 0,05$. Cuando ha procedido se muestra el valor de la p correspondiente al test de Fisher.

La magnitud de la asociación entre las variables se ha medido mediante la Odds Ratio (OR).

Por último, se muestra el intervalo de confianza de la razón de prevalencias al 95%.

Se realizó el análisis variable por variable de manera separada.

- **Efecto independiente de las variables predictoras sobre la tasa de ocurrencia de la progresión de la enfermedad y muerte por cáncer: Regresión de Cox.**

Se empleó el modelo de regresión de Cox asumiendo que el evento, progresión de la enfermedad o muerte por cáncer, era un suceso irreversible, que ocurría sólo una vez por cada paciente y que la censura de determinados pacientes no era informativa.

Se introdujeron una a una todas las variables a estudio (análisis univariado), de modo que aquellas que resultaron significativas entraron a formar parte del modelo multivariado.

A partir de ese modelo multivariado se fueron eliminando de forma manual aquellas variables no significativas en dicho test hasta alcanzar un modelo final que era el que mejor se ajustaba.

Como parámetro de asociación se muestra la "hazard ratio" (HR) ajustada también por otras variables que no hubieran causado modificación del efecto (interacción) o distorsión de la medida de asociación existente entre dos variables (confusión).

d. Análisis de Supervivencia

Para una mejor comprensión de la ocurrencia del evento, progresión de la enfermedad o muerte por cáncer, y el tiempo transcurrido hasta la ocurrencia de la misma se realizó un análisis de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier.

En las curvas de Kaplan-Meier se puede apreciar la pendiente de caída de la curva; lo que explica la velocidad a la que se produce el evento (progresión de la enfermedad y fallecimiento).

e. Precisión de mediciones

Además de las pruebas de significación estadística, siempre que fue posible se calculó el intervalo de confianza al 95% para conocer la precisión de las diferencias.

RESULTADOS

I. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA COHORTE

A continuación se describen las características de la población global (n =71) y de la población con progresión de la enfermedad (n = 12). Las características cuantitativas se resumen en la *Tabla 8* y las cualitativas se resumen en la *Tabla 9*.

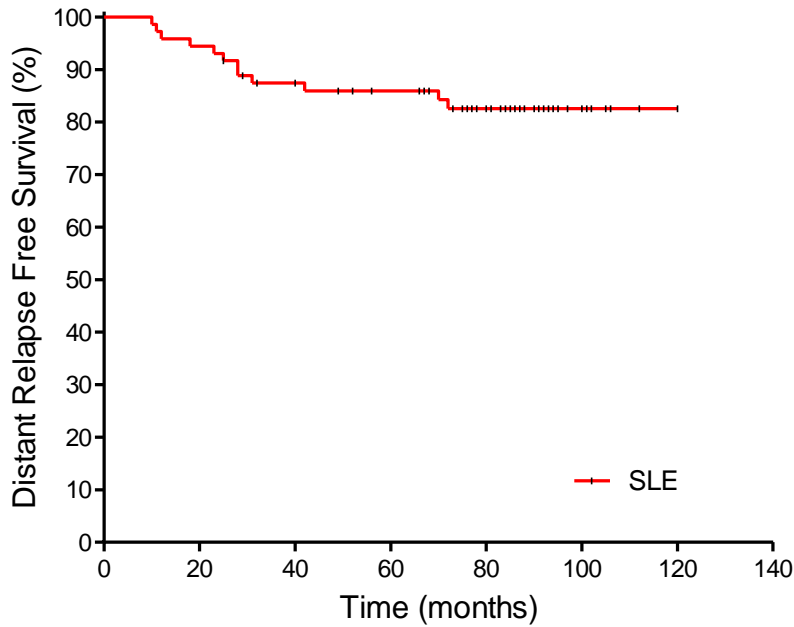
Tabla 8 . Características Cuantitativas de la serie

	Población general (n = 71)		Población con progresión de la enfermedad (n = 12)	
	Media (desviación típica)	Mediana (rango intercuartílico, p25-p75)	Media (desviación típica)	Mediana (rango intercuartílico, p25-p75)
Edad (años)	69,4 (12)	71,45 (58,2-79,7)	71 (11)	72,9 (61,5-78,7)
Tiempo de seguimiento (meses)	85 (25)	87,6 (78-101,5)	71 (11)	86,73 (35,3-94,6)
Supervivencia global (meses)	83,5 (26)	87 (76,4-98,3)	70,9 (38,2)	86,7 (34,8-93,4)
Supervivencia libre de enfermedad (meses)	77,8 (32)	84,3 (67-95,2)	31,3 (21,2)	27 (13,5-39,8)
Supervivencia cáncer específica (meses)	83,5 (23)	87 (76,4-98,3)	71,3 (38,4)	86,7 (35,3-94,6)

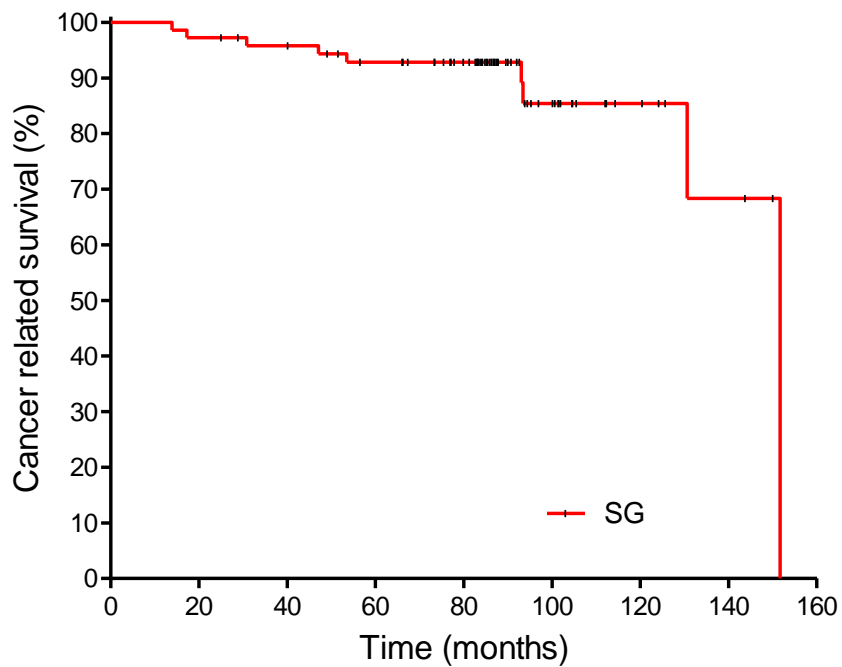
Tabla 9. Características Cualitativas de la serie

	Población general (n = 71) n (%)	Población con progresión de la enfermedad (n = 12) n (%)
Género (H:M)	38 (53,5%) : 33 (46,5%)	8 (66,7%) : 4 (33,3%)
Consumo de tabaco	23 (32,4%)	4 (33,3%)
IMC >25	56 (78,9%)	8 (66,6%)
Diálisis	7 (9,9%)	1 (8,3%)
HTA	37 (52,1%)	7 (58,3%)
ECOG		
• ECOG 0	58 (81,7%)	10(83,3%)
• ECOG >1	13 (18,3%)	2 (16,7%)
ASA		
• ASA I	3 (4,2%)	1 (8,3%)
• ASA II	33 (46,5%)	4 (33,3%)
• ASA III	31 (43,7%)	4 (33,3%)
• ASA IV	4 (1,4%)	3 (25%)
Síntomas	56 (78,9%)	8 (66,7%)
Progresión	12 (16,9%)	-----
Clasificación T		
• T1a	39 (54,9%)	2 (16,7%)
• T1b	22 (31%)	5 (41,7%)
• T2a	7 (9,9%)	3 (25%)
• T2b	3 (4,2%)	2 (16,7%)
Clasificación N		
• N0	39 (54,9%)	7 (58,3%)
• Nx	32 (45,1%)	5 (41,7%)
Estadio clínico		
• I	62 (87,3%)	8 (66,7%)
• II	9 (12,7%)	4 (33,3%)
Fuhrman		
• grado I	5 (7%)	1 (8,3%)
• grado II	53 (74,6%)	8 (66,7%)
• grado III	13 (18,3%)	3 (25%)
Abordaje		
• radical a.	23 (32,4%)	9 (75%)
• parcial a.	5 (7%)	-----
• radical lap	39 (54,9%)	3 (25%)
• parcial lap	4 (5,6%)	-----
Lateralidad		
• derecho	39 (54,9%)	7 (58,3%)
• izquierdo	32 (45,1%)	5 (41,7%)

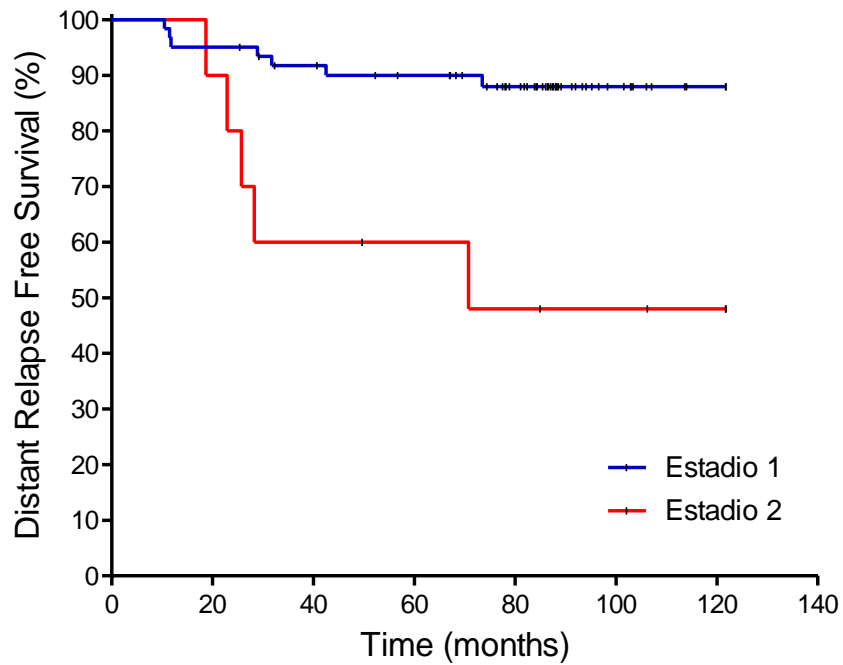
II. CURVAS DE SUPERVIVENCIA



Gráfica 2. Supervivencia Libre de Enfermedad. La SLE a 5 años y 10 años es de 89,5% y 82,5% respectivamente.



Gráfica 3. Supervivencia Cáncer Específica. La SCE es de 92,8% a 5 años y de 85,5% a 10 años.



Gráfica 4. Supervivencia Libre de Enfermedad por Estadio tumoral. En estadio I la SLE a 5 años es de 89,9% y a 10 años es de 87,9%. En estadio II la SLE a 5 y 10 años es de 60% y 48% respectivamente.

III. ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES PREDICTORAS Y VARIABLES RESULTADO (PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD Y MUERTE POR CÁNCER DE RIÑÓN) DE FORMA UNIVARIADA:

a. Asociación entre el estadio clínico, el grado nuclear de Fuhrman, nomograma UISS agrupado, nomograma de Kattan, nomograma de Karakiewicz y perfil de miRNA con progresión de la enfermedad.

Tabla 10. Tabla de contingencia: variables predictoras cualitativas y progresión de la enfermedad.

	Progresión		p
	Si n (%)	No n (%)	
Estadio clínico			
I	8 (12,9%)	54 (87,1%)	0,018
II	4 (44,4%)	5 (55,6%)	
Grado nuclear agrupado			
1-2	9 (15,5%)	49 (84,5%)	0,511
3-4	3 (23,1%)	10 (76,9%)	
Nomograma UISS agrupado			
Bajo riesgo	4 (9,8%)	37 (90,2%)	0,60
Riesgo intermedio	8 (26,7%)	22 (73,3%)	
Perfil miRNA			
Bajo riesgo	3 (6%)	47 (94%)	0,0001
Alto riesgo	9 (42,8)	12 (57,2%)	
Nomograma Kattan agrupado			
SLE < 90%	5 (29,4%)	12 (70,6%)	0,115
SLE >90%	7 (13%)	47 (87%)	
Nomograma Karakiewicz agrupado			
SCE < 90%	6 (50%)	6 (50%)	0,001
SCE > 90%	6 (10,2%)	53 (89,8%)	

Como se aprecia en la *Tabla 10* las variables estadio clínico, perfil de miRNA y nomograma de Karakiewicz se asocian de manera estadísticamente significativa con progresión de la enfermedad con $p = 0,018$, $p = 0,0001$ y $p = 0,001$ respectivamente.

b. Asociación entre tamaño tumoral con progresión de la enfermedad.

Tabla 11. T student: tamaño tumoral y progresión de la enfermedad

	Progresión		p	IC 95%	
	Si (n = 12) Media (desviación típica)	No (n = 59) Media (desviación típica)		Inferior	Superior
Tamaño tumoral	73,75 (25,6)	48,56 (25,25)	0,002	9,2	41,17

El tamaño tumoral también se asocia de manera estadísticamente significativa con progresión de la enfermedad, $p = 0,002$, IC 95% (9,2 - 41,17).

c. Asociación entre el estadio clínico, el grado nuclear de Fuhrman, nomograma UISS agrupado, nomograma de Kattan, nomograma de Karakiewicz y perfil de miRNA con muerte por cáncer.

Tabla 12. Tabla de contingencia: variables predictoras cualitativas y muerte por cáncer

	Muerte por cáncer		p
	Si n (%)	No n (%)	
Estadio clínico			
I	5 (8,1%)	57 (91,9%)	0,025
II	3 (33,3%)	6 (66,7%)	
Grado nuclear agrupado			
1-2	6 (10,3%)	52 (89,7%)	0,603
3-4	2 (15,4%)	11 (84,6%)	
Nomograma UISS agrupado			
Bajo riesgo	3 (7,3%)	38 (92,7%)	0,218
Riesgo intermedio	5 (16,7%)	25 (83,3%)	
Perfil miRNA			
Bajo riesgo	2 (4%)	48 (96%)	0,002
Alto riesgo	6 (28,6%)	15 (71,4%)	
Nomograma Kattan agrupado			
SLE < 90%	3 (17,6%)	14 (82,4%)	0,34
SLE > 90%	5 (9,3%)	49 (90,7%)	
Nomograma Karakiewicz agrupado			
SCE < 90%	3 (25%)	9 (75%)	0,099
SCE > 90%	5 (8,5%)	54 (91,5%)	

Las variables estadio clínico y perfil de miRNA se asocian de manera significativa con muerte por cáncer con $p = 0,025$ y $p = 0,002$ respectivamente.

d. Asociación entre tamaño tumoral con muerte por cáncer.

La variable tamaño tumoral muestra asociación estadísticamente significativa con muerte por cáncer, $p = 0,012$, IC 95% (5,64 - 44,35).

Tabla 13. T student: tamaño tumoral y muerte por cáncer

	Muerte por cáncer		p	IC 95%	
	Si (n = 8) Media (desviación típica)	No (n = 63) Media (desviación típica)		Inferior	Superior
Tamaño tumoral	75 (28,9)	50 (25,4)	0,012	5,64	44,35

IV. MODELOS PREDICTIVOS

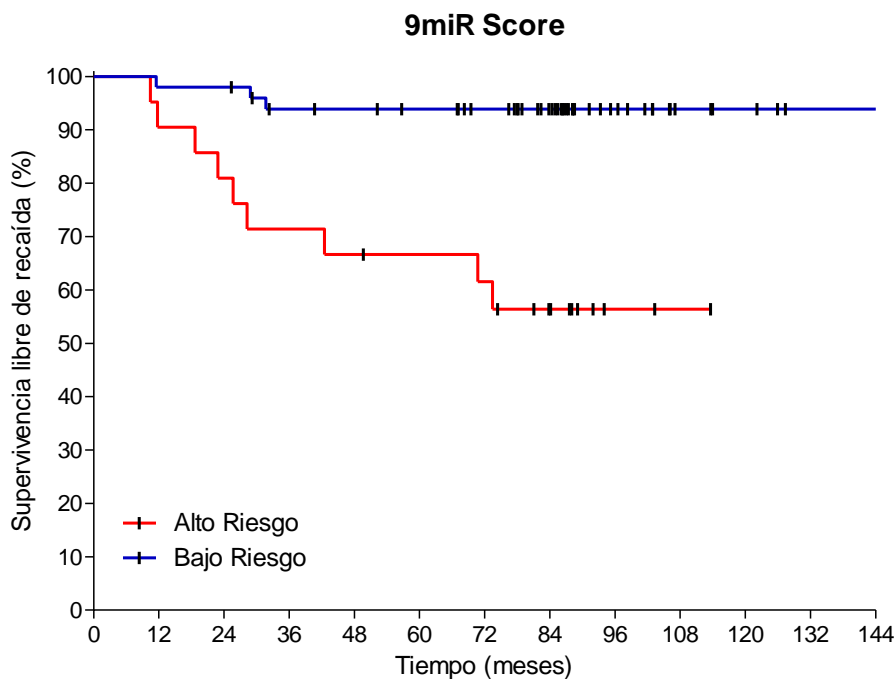
Los modelos predictivos se construyeron empleando el programa BRBArray Tools. Se generó un modelo de predicción de progresión en pacientes con cáncer renal de células claras en estadios 1-2 al diagnóstico (*RCC-9miR score*). Este modelo está compuesto por la expresión de nueve miRNAs (*Tabla 14*). El score del predictor se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$\sum_i w_i x_i - 2.896583$ donde w_i y x_i son el peso y el valor de expresión del microRNA i .

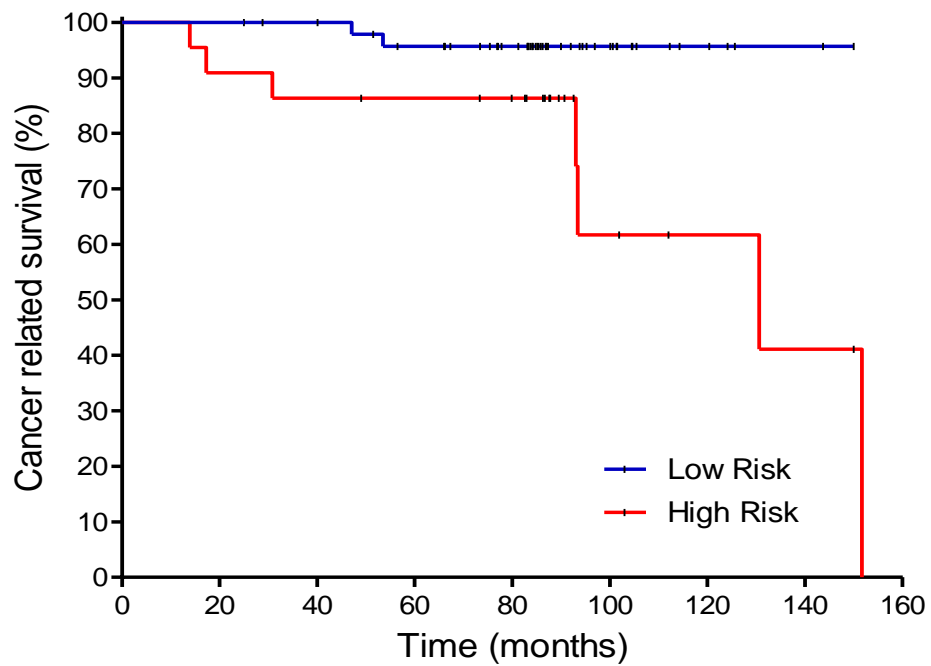
Tabla 14. Predictor 9-miRNAs

miRNA	p value	pesos
hsa-miR-223	0.0013077	0.098392
hsa-miR-103	0.0026888	0.045806
hsa-miR-107	0.0076298	0.045869
hsa-miR-425	0.0083611	0.163188
hsa-miR-340*	0.0107984	0.495063
hsa-miR-130b	0.0108035	0.374902
hsa-miR-652	0.0152381	0.311327
hsa-miR-214	0.0163251	-0.064772
hsa-miR-204	0.0173669	-0.220399

Pacientes con una puntuación mayor a 0.954 se consideran de alto riesgo. El modelo predictivo cataloga de alto riesgo el 30% de los pacientes. La SLE a distancia a los 5 años fue del 93.9% para pacientes de bajo riesgo y del 61.54% para pacientes con alto riesgo (HR=12.1, p=0.0001) IC (3.012-37.92). Estas diferencias en el long-rank test se validaron con 10.000 permutaciones (p<0.0013). La SCE a los cinco años fue 95.7% y 86.4% en los grupos de bajo y alto riesgo respectivamente (HR=7.7, p=0.0084) IC (1,687-35.14).



Gráfica 5. Supervivencia Libre de Enfermedad por grupos de riesgo. La SLE a distancia a los 5 años fue del 93.9% para pacientes de bajo riesgo y del 61.54% para pacientes con alto riesgo (HR=12.1, p=0.0001) IC (3.012-37.92).



Gráfica 6. Supervivencia Cáncer Específica por grupos de riesgo. La SCE a los cinco años fue 95.7% y 86.4% en los grupos de bajo y alto riesgo respectivamente ($HR=7.7$, $p=0.0084$) IC (1,687-35.14).

V. ANÁLISIS UNI Y MULTIVARIANTE:

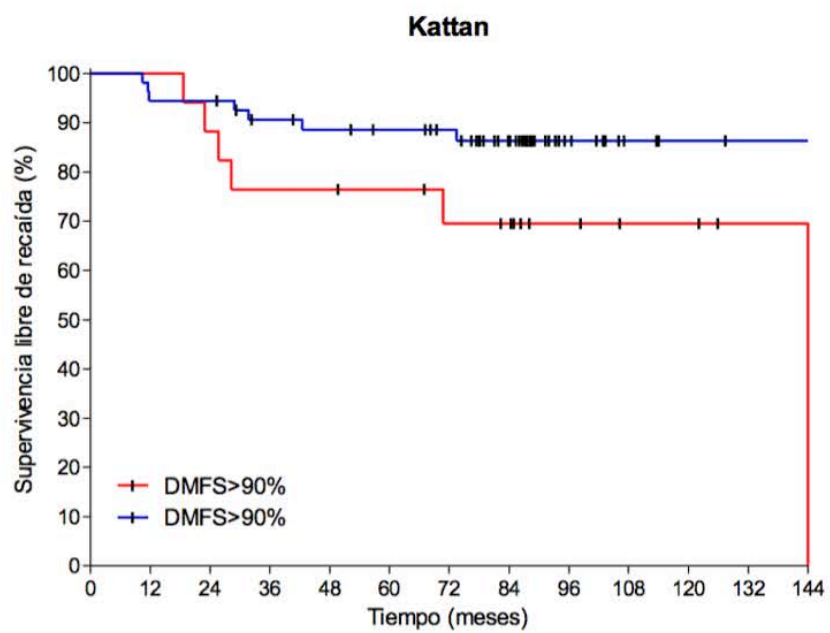
Se ha comprobado el valor pronóstico de algunas variables (grado Fuhrman, tamaño tumoral, ECOG), de tres nomogramas (Kattan, Karakiewicz y UCLA) y del *Predictor 9-miRNA*.

a. Análisis Univariante para SLE (Regresión de Cox)

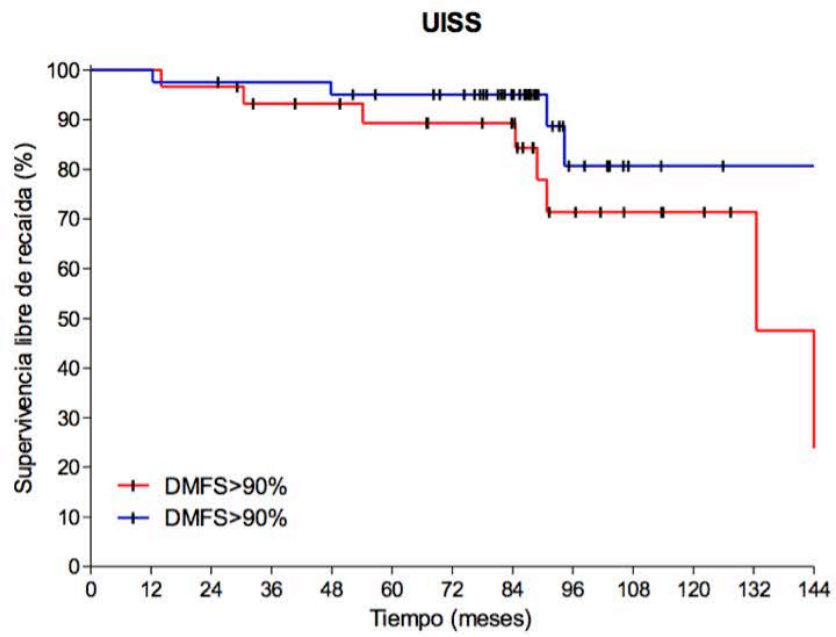
Tabla 15. Análisis Univariante SLE

	Sig.	Exp(B)	95,0% IC	
			Inferior	Superior
UISS_UCLA	0.057	3.213	0.965	10.696
Karakiewicz	0.001	7.309	2.335	22.876
Kattan_MSICC	0.119	2.433	0.768	7.643
<i>Predictor 9-miRNA</i>	0.001	8.362	2.261	30.918
Estadio clínico	0.004	5.39	1.700	17.092
Grado Fuhrman	0.711			
Nombre de variable G(1)	0.800	0.764	0.096	6.110
Nombre de variable G(2)	0.788	1.364	0.142	13.142
Tamaño tumoral	0.013	1.022	1.005	1.039
ECOG	0.975	0.976	0.214	4.459

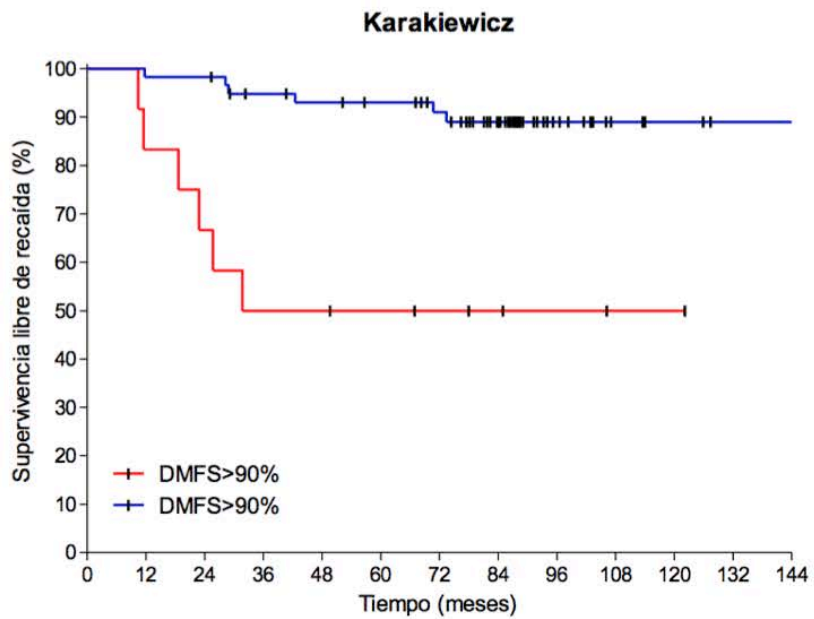
Como se aprecia en la *Tabla 15* las variables: estadio clínico, tamaño tumoral, nomograma de Karakiewicz y nuestro predictor 9-miRNA se comportan como predictores de SLE.



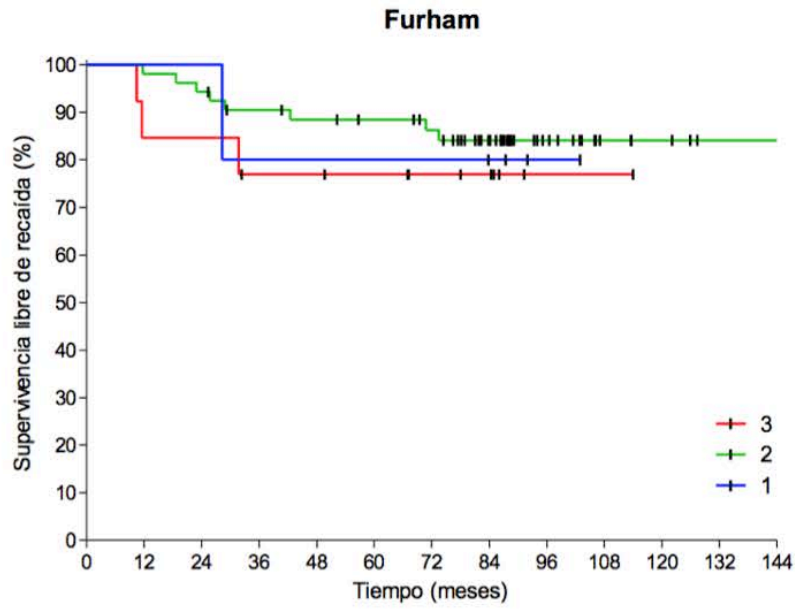
Gráfica 7. Comportamiento del nomograma de Kattan y SLE



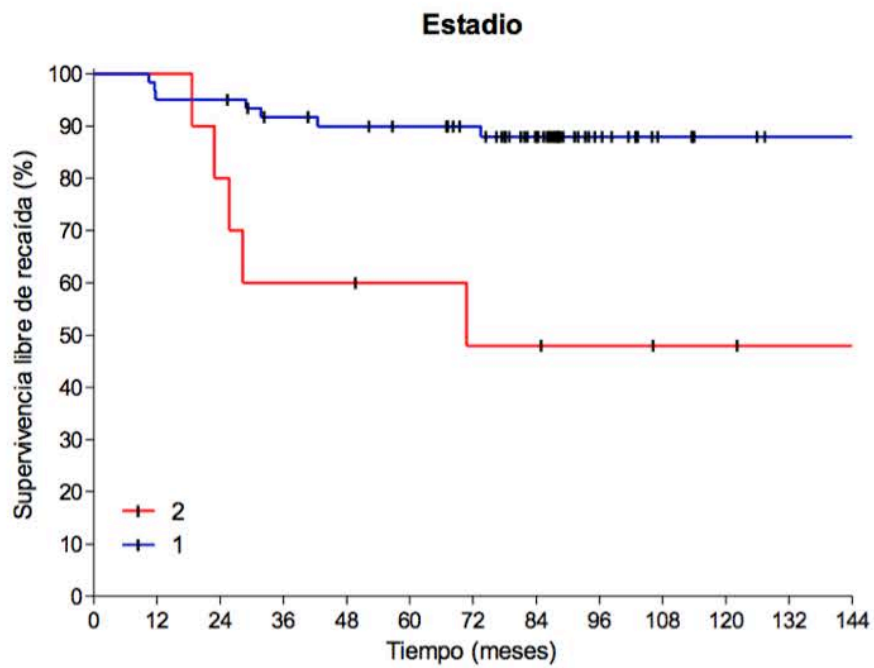
Gráfica 8. Comportamiento del nomograma de UCLA y SLE



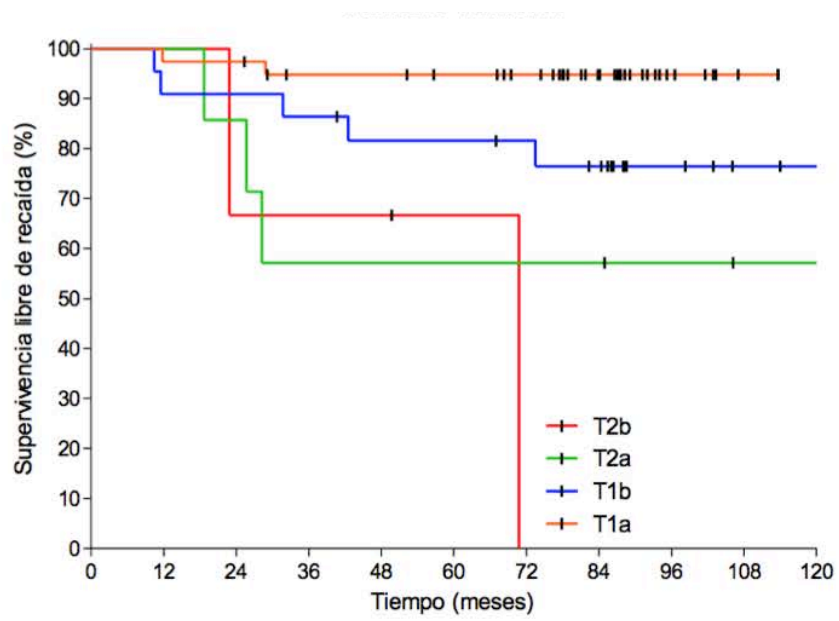
Gráfica 9. Comportamiento del nomograma de Karakiewicz y SLE



Gráfica 10. Grado de Fuhrman y SLE



Gráfica 11. Estadio clínico y SLE



Gráfica 12. Tamaño tumoral clasificado según pT y SLE

b. Análisis Multivariante para SLE (Regresión de Cox multivariable)

La *Tabla 16* muestra como el *Predictor 9-miRNA* es un buen predictor de progresión de la enfermedad al igual que el nomograma de Karakiewicz y el UISS. Las variables clínicas no han demostrado ser estadísticamente significativas.

Tabla 16. Análisis Multivariante SLE

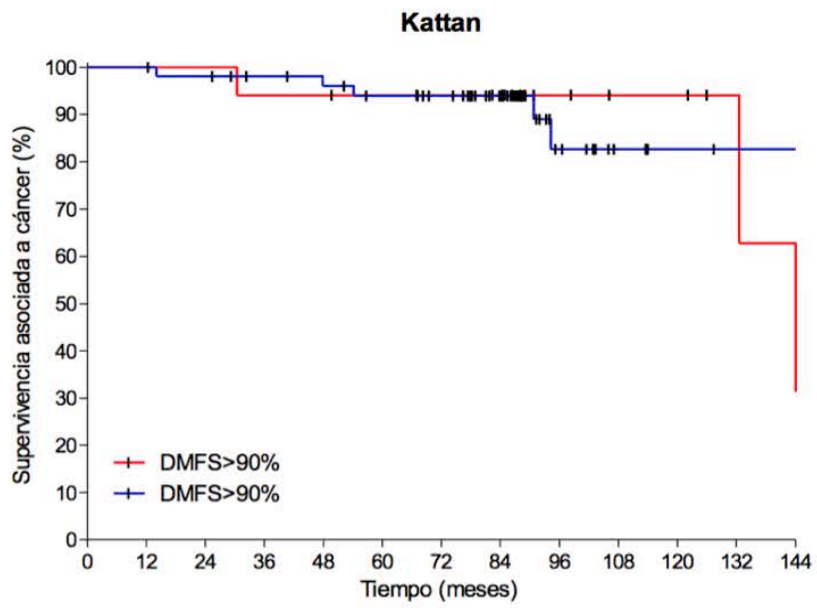
Nomogramas vs predictor				
	Sig.	Exp(B)	95% IC	
			Inferior	Superior
Kattan_MSICC	0.187	2.192	0.683	7.029
<i>Predictor 9-miRNA</i>	0.002	8.089	2.180	30.17
UISS_UCLA	0.011	4.992	1.446	17.230
<i>Predictor 9-miRNA</i>	>0.001	11.368	2.993	43.181
Karakiewicz	>0.001	8.817	2.614	29.743
<i>Predictor 9-miRNA</i>	0.001	9.496	2.494	36.154
Variables clínicas vs predictor				
	Sig.	Exp(B)	95,0% IC	
			Inferior	Superior
Tamaño tumoral	0.850	.998	0.975	1.021
<i>Predictor 9-miRNA</i>	0.003	8.893	2.109	37.496
G	0.531			
G(1)	0.956	0.943	0.114	7.825
G(2)	0.459	0.2.612	0.205	33.216
Estadio clínico	0.176	3.238	0.591	17.742

c. Análisis Univariante para Supervivencia Cáncer Específica (Regresión de Cox)

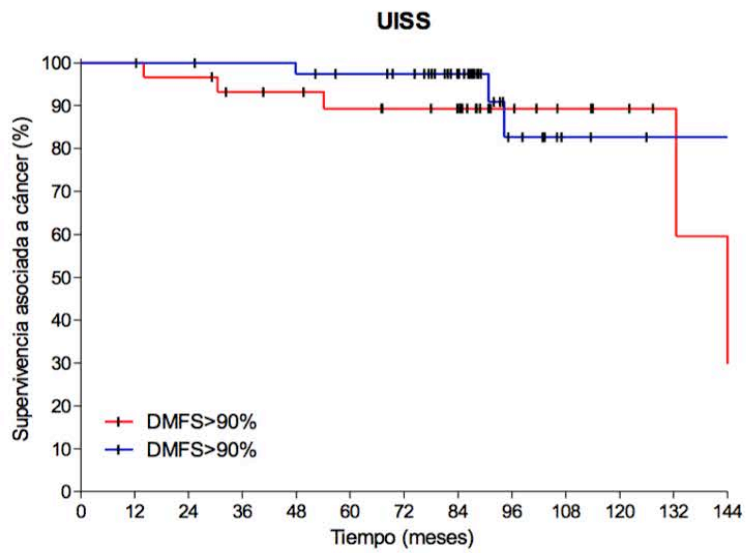
Como muestra la *Tabla 17* únicamente el *Predictor 9-miRNA* parece comportarse como factor predictor y es estadísticamente significativo ($p = 0.023$, HR 6.55; IC 95% (1.29 - 33.165)) en el análisis univariante para SCE.

Tabla 17. Análisis Univariante para SCE

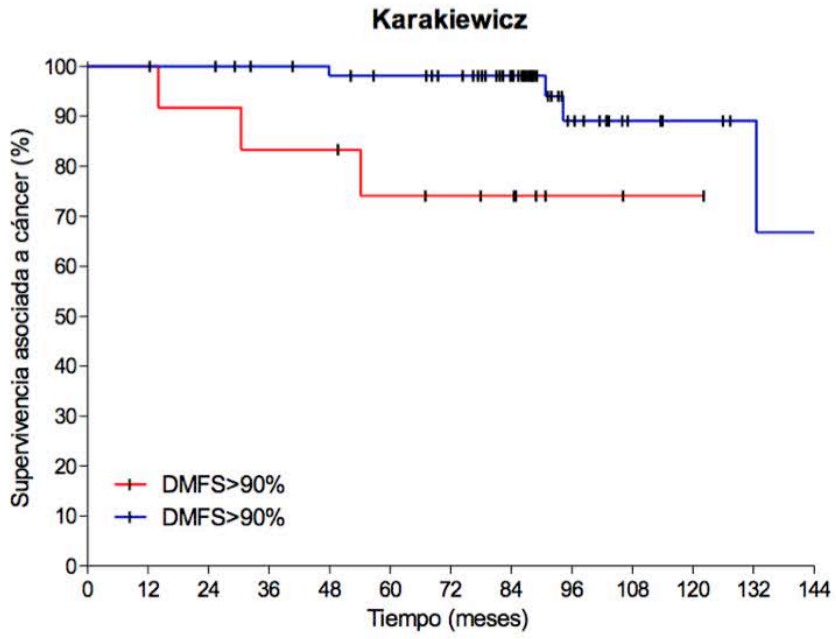
	Sig.	Exp(B)	95% IC	
			Inferior	Superior
UISS_UCLA	0.594	1.517	0.328	7.019
Karakiewicz	0.24	6.455	1.280	32.544
Kattan_MSICC	0.737	0.739	0.126	4.320
<i>Predictor 9-miRNA</i>	0.023	6.554	1.295	33.165
Estadio clínico	0.828	1.228	0.193	7.816
Grado Fuhrman	0.377			
Nombre de variable G(1)	0.884	1.189	0.117	12.032
Nombre de variable G(2)	0.317	4.111	0.258	65.490
Tamaño tumoral	0.059	1.026	0.999	1.053
ECOG	0.913	0.887	0.103	7.660



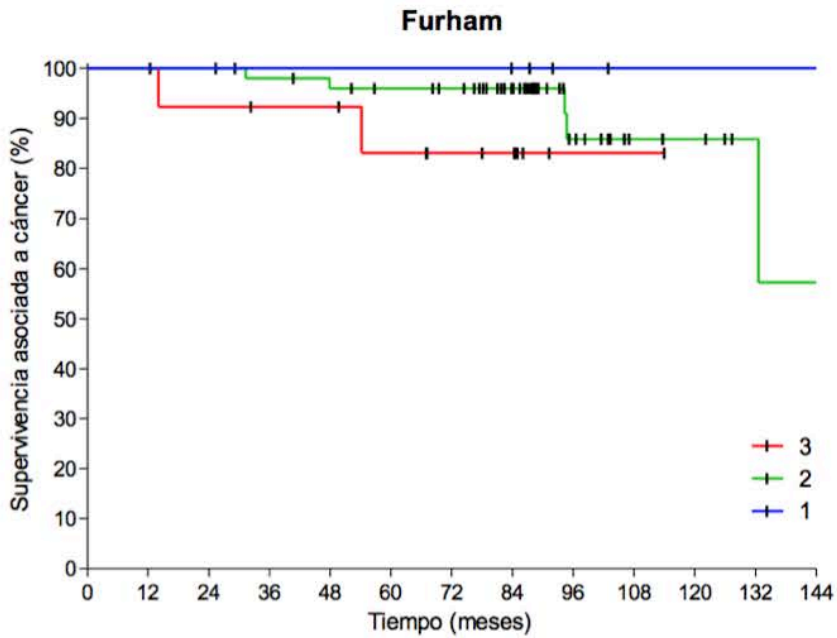
Gráfica 13. Nomograma de Kattan y SCE



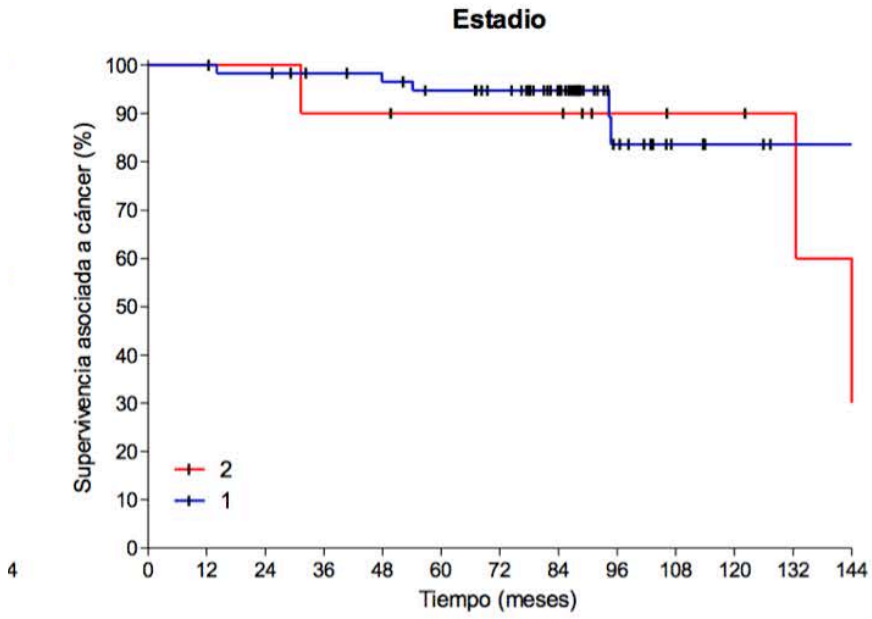
Gráfica 14. Nomograma de UCLA y SCE



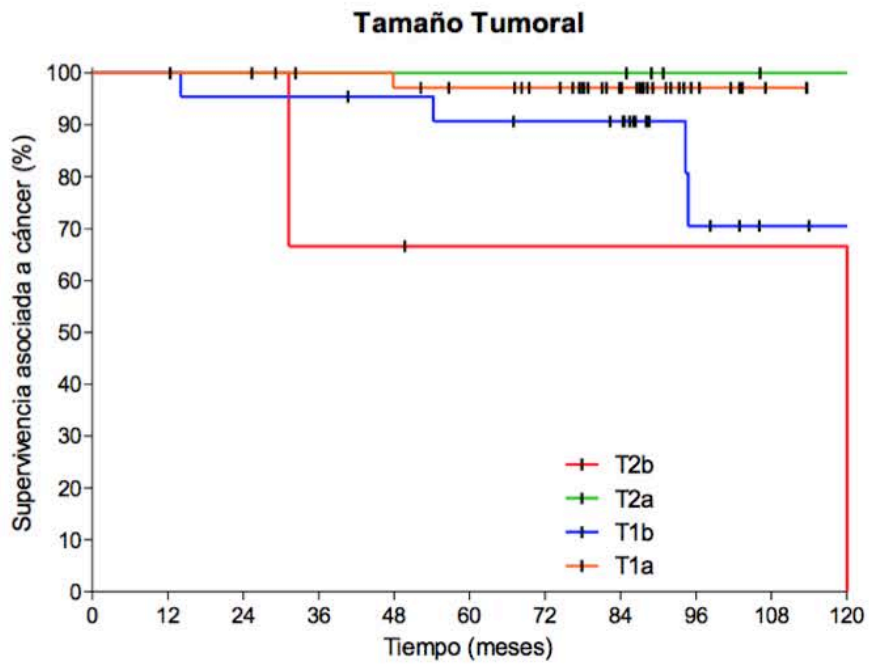
Gráfica 15. Nomograma de Karakiewicz y SCE



Gráfica 16. Grado de Fuhrman y SCE.



Gráfica 17. Estadio Clínico y SCE.



Gráfica 18. Tamaño tumoral según pT y SCE.

d. Análisis Multivariante para Supervivencia Cáncer Específica (Regresión de Cox multivariado)

Como se aprecia en la *Tabla 18* el *Predictor 9-miRNA* se comporta como factor pronóstico independiente a la hora de predecir SCE frente a otros modelos predictivos, a excepción del nomograma de Karakiewicz, y frente a variables clínicas.

Tabla 18. Análisis Multivariante SCE

Nomogramas vs predictor				
	Sig.	Exp(B)	95% IC	
			Inferior	Superior
Kattan_MSKCC	0.473	0.486	0.068	3.489
<i>Predictor 9-miRNA</i>	0.018	7.157	1.396	36.692
UISS_UCLA	0.532	1.658	.339	8.108
<i>Predictor 9-miRNA</i>	0.022	6.741	1.320	34.416
Karakiewicz	0.019	8.3323	1.418	48.836
<i>Predictor 9-miRNA</i>	0.018	7.658	1.420	41.283
Variables clínicas vs predictor				
	Sig.	Exp(B)	95% IC	
			Inferior	Superior
Tamaño tumoral	0.143	1.039	0.987	1.094
<i>Predictor 9-miRNA</i>	0.008	15.204	2.030	113.851
G	0.385			
G(1)	0.495	3.563	0.094	132.925
G(2)	0.226	17.227	0.171	1735.364
Estadio clínico	0.145	0.048	0.001	2.840

DISCUSIÓN

I. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CÁNCER DE RIÑÓN

Nuestra población de estudio es una muestra muy seleccionada de 71 pacientes con CR tipo Células Claras en estadios I y II.

a. Subtipo histológico

Las guías europeas de Urología (12) mencionan el subtipo histológico, de acuerdo con la clasificación de la WHO 2004, dentro de los factores pronósticos en el CR y le otorgan un perfil de peor pronóstico a la variedad *células claras* frente al subtipo *papilar* y el *cromóforo* (90–95). Según otros estudios, parece que la información pronóstica del subtipo histológico pierde fuerza cuando se estratifica por estadio clínico (96) y en el análisis multivariante no puede ser considerado factor pronóstico independiente al compararlo con variables como el grado de Fuhrman, el estadio TNM y el ECOG PS (97). Sin embargo, debido a la predominancia de la variedad células claras frente a otras histologías menos frecuentes se hace complejo evaluar las diferencias debidas al subtipo celular al estratificar las series por estadio tumoral o grado nuclear.

En nuestro estudio partimos de una población muy homogénea, con una única histología (variante *células claras*) y por lo tanto evitamos la confusión que generaría trabajar con más de una variante histológica.

b. Grado Nuclear de Fuhrman

El grado de Fuhrman es el sistema de clasificación (11) más ampliamente aceptado en el CRCC y es considerado un factor pronóstico independiente a pesar de la variabilidad inter e intra observador que pueda existir (58). Muchos modelos pronósticos lo incluyen en sus variables (Karakiewicz (76), IUSS (17), Mayo Clinic (20)). Algunos autores

sugieren la utilidad de reducir dicha clasificación a dos (17) o tres (98) grados en lugar de los cuatro existentes con la finalidad de simplificar la clasificación, aumentar la concordancia inter observador pero sin disminuir la habilidad pronóstica de la clasificación clásica (99–102).

En nuestra serie tenemos una mayoría de grados II (74,6% dentro de la población general a estudio y 66,7% dentro del grupo de progresión), seguido de grado III y grado I. No hay ningún caso recogido de grado IV.

En nuestra serie no encontramos asociación estadísticamente significativa entre el grado nuclear y la progresión de la enfermedad y muerte por cáncer ($p = 0,511$ y $p = 0,6$ respectivamente). En el análisis uni y multivariante tampoco se comporta como factor pronóstico independiente frente a otras variables (*Tablas 15-18*).

c. Tamaño tumoral

El tamaño tumoral está en íntima relación con la clasificación TNM, recomendada por Asociación Europea de Urología con un grado de recomendación B para su empleo en la práctica clínica (12). El TNM aporta información pronóstica pero no constituye por si mismo un factor pronóstico independiente en el CR. Al igual que ocurre con el grado nuclear, la clasificación TNM está incluida como variable dentro de los modelos predictivos de Karakiewicz (76) y el de la UCLA (17).

En nuestra serie, el tamaño medio del tumor es de 45,6 mm ($\pm 25,79$). La mayoría de los casos son T1a (54,9%), seguido de T1b (31%), T2a (9,9%) y T2b (4,2%).

Al analizar la relación existente entre tamaño tumoral y progresión de la enfermedad encontramos una asociación estadísticamente significativa, $p = 0,002$, IC 95% (9,2 - 41,17). Y lo mismo ocurre al relacionarlo con muerte por cáncer, $p = 0,012$, IC 95%

(5,64 - 44,35). En el análisis univariante el tamaño tumoral mantiene su significación estadística para progresión de la enfermedad, $p = 0,013$ HR 1,02, IC 95% (1,005 - 1,039) (Tabla 15). Sin embargo, en el análisis multivariante pierde toda su potencia pronóstica frente a otras variables como el *predictor 9-miRNAs* y el nomograma de Karakiewicz. Por tanto, en nuestra serie el tamaño tumoral no se comporta como un factor pronóstico independiente para predecir progresión de la enfermedad ni SCE.

d. Estadio Clínico

En nuestra serie el estadio clínico se comporta de manera similar al tamaño tumoral. Tenemos un 87,3% de casos en estadio I y un 12,7% en estadio II. El estadio clínico muestra asociación estadísticamente significativa con la progresión de la enfermedad y la muerte por cáncer, $p = 0,018$ y $p = 0,025$ respectivamente. Únicamente en el análisis univariante el estadio clínico parece tener interés pronóstico en progresión de enfermedad, $p = 0,004$ HR 5,39, IC 95% (1,7 - 17,092). Esto no se confirma al hacer el análisis frente a otros factores pronósticos y tampoco en el contexto de muerte por cáncer.

e. Factores Clínicos

Las guías europeas aceptan factores clínicos (12) como el estado funcional, la existencia de síntomas localizados en el momento del diagnóstico, la caquexia, la anemia y el recuento plaquetario como factores pronósticos. La caquexia definida como hipoalbuminemia, pérdida de peso y anorexia predice un mal pronóstico y escasa supervivencia a igualdad de estadio TNM, grado de Fuhrman y ECOG, según Kim et al (62,63). Actualmente el sistema más empleado para medir el estado funcional es el de *Eastern Cooperative Oncology Group performance status* (ECOG PS). El ECOG-PS define el estado funcional como la habilidad para desarrollar actividades de la vida

diaria, como cuidado de la casa y autocuidado. Se ha demostrado la habilidad que tiene el ECOG-PS para predecir supervivencia en pacientes con CR localizado y metastásico (63). En el caso del CR metastásico se ha demostrado que aquellos pacientes con un buen ECOG-PS son buenos respondedores a la inmunoterapia (17). El ECOG-PS está incluido como variable dentro del nomograma de la UCLA (17) y la existencia de síntomas lo está en el de Karakiewicz (76).

En nuestra serie hemos incluido la variable ECOG-PS para probar su utilidad como factor predictor en nuestra población. En el análisis univariante no demuestra utilidad pronóstica en progresión de la enfermedad y tampoco en muerte por cáncer ($p = 0.975$, HR 0.976, IC 95% (0.214 - 4.459) y $p = 0.913$, HR 0.887, IC 95% (0.103 - 7.660) respectivamente).

f. Nomogramas

Según las guías europeas (12) el empleo de nomogramas en la enfermedad localizada no se recomienda de manera rutinaria (grado de recomendación C), sin embargo pueden ayudar en la selección de pacientes para ensayos clínicos.

El modelo pronóstico ideal debería incorporar todas aquellas características conocidas que de manera independiente puede predecir el desenlace de la enfermedad en cuestión. Numerosas variables clínicas y patológicas son importantes a la hora de predecir la evolución del CR, entre ellas el estadio clínico es uno de los más importantes (44,103). Los modelos actuales incluyen variables como: estadio tumoral, grado nuclear, ECOG-PS, necrosis, síntomas. Sin embargo no incluyen otras variables como podría ser los miRNAs. El modelo predictivo ideal debería combinar estadio, grado, subtipo histológico y todas aquellas otras variables que se relacionen con pronóstico en un análisis multivariante (20). Nosotros hemos sido capaces de aislar a partir de muestras

en parafina un conjunto de 9 miRNAs que, tanto en el análisis univariante como en el multivariante, es capaz de predecir progresión de la enfermedad o muerte por cáncer en una población muy homogénea como es CR células claras en estadio I y II.

II. CÁNCER DE RIÑÓN Y MICRORNAS

Parece evidente que en el escenario actual del CR los parámetros morfológicos y clínicos no son suficientes para individualizar las decisiones diagnósticas y terapéuticas. En este contexto se hace necesario identificar un perfil molecular para cada tipo de CR que ayude y oriente en las decisiones diagnósticas, pronósticas y de tratamiento en cada caso concreto.

El CR constituye un grupo heterogéneo de neoplasias de histologías variadas y con unas características bioquímicas y moleculares diferentes que condicionan su pronóstico y tratamiento. El análisis de los miRNAs puede ayudar a profundizar en el conocimiento del comportamiento del CR y esto a su vez tener un impacto real en la práctica clínica, por ejemplo en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a dianas terapéuticas concretas y personalizando así el tratamiento de cada tumor.

La primera conexión entre CR y un miRNA fue en relación con la expresión de *miR-34a*. Este miRNA está infra expresado en la mayoría de los cánceres (bajo regulación de p53), sin embargo en el CR está sobre expresado (104). La disminución de miR-34a enlentece la proliferación celular. Este hallazgo es contradictorio con el efecto que ocasiona en otras neoplasias y sugiere la existencia de un efecto celular específico (105,106).

Algunos autores han descrito asociaciones de varios miRNAs que pueden distinguir tejido renal normal de CR. Tal el es caso de Juan et al (105) que a partir de 28 muestras

de CRCC aislaron 35 miRNAs que permiten discriminar tejido normal de CR. De esos 35 miRNA, 26 tenían una expresión reducida y 9 la tenían aumentada. Se identificaron al menos tres miRNAs (*miR-155*, *miR-21* y *miR-210* inducido por hipoxia) sobre expresados en CR y que comúnmente se hallan también sobre expresados en otros tipos de cáncer. Los miRNA con expresión reducida coincidían con deleciones cromosómicas en el CRCC. Cinco miRNA (*miR-136*, *miR-154*, *miR-337*, *miR-377* y *miR-411*) están localizados en *14q32*. Deleciones en este cromosoma también han sido descritas en el cáncer de vejiga y cáncer de ovario, lo que sugiere una vía común de supresión tumoral en al menos tres neoplasias genitourinarias.

Otros autores han comparado la expresión de distintos perfiles de miRNA entre tejido renal normal, el CRCC y el CR cromóforo. Nakada C et al (107) encontró que tanto *miR-141* como *miR-200c* estaban sobre expresados en tejido tumoral diferenciándolo claramente de tejido renal no tumoral.

Cabe esperar que los subtipos histológicos de CR tengan una biología específica y una marca genética que lo distinga entre ellos en base a que su comportamiento y agresividad difiere mucho de unos a otros. Petillo D. et al (108), a partir de 20 muestras (cuatro muestras para cada subtipo celular) estudió los niveles de expresión de miRNAs en cuatro subtipos de CR: células claras, cromóforo, papilar y oncocitomas; y halló una marca única de miRNA para cada subtipo. En concreto encontró que la sobre expresión de *miR-424* y *miR-203* en el CRCC lo diferencia del subtipo papilar. Además, el *miR-203* está infra expresado de en el oncocitoma en comparación con el tejido renal normal y sobre expresado en el subtipo CR cromóforo. Petillo et al determinó que un perfil de 5 miRNAs además de *miR-203* (*S-hsa-miR-200b*, *S-hsa-miR-197*, *miR-320* y *miR-186*) discriminaba entre oncocitoma y CR cromóforo con un error < 5%. Así mismo, fue capaz de aislar un único miRNA (*S-hsa-miR-32*) que diferenciara dentro del CRCC un

grupo de buen pronóstico frente a uno de mal pronóstico, definiendo cada grupo según la SCE fuera mayor o menor a 5 años tras la nefrectomía.

Youssef Y. et realizó el mismo estudio analizando las muestras de 94 pacientes. Su sistema tiene una sensibilidad del 97% para diferenciar tejido normal del tumoral (109).

Fridman et al, fue capaz de distinguir los subtipos celulares a partir de un perfil de miRNAs obtenido de muestras conservadas en parafina y lo validó en una población independiente realizando un diagnóstico correcto en el 93% de los casos (110). En su caso, tanto *miR-221* como *miR-222* están sobre expresados en el oncocitoma y en el subtipo cromóforo, interviniendo en la eritropoyesis e interaccionando con el receptor KIT.

Numerosos miRNAs han sido relacionados con mal pronóstico en el CRCC. Zhao X et al. ha demostrado recientemente que el *miR-497* está infra expresado en muestras de CRCC confiriéndole un mal pronóstico. Estos autores ya sugieren la utilidad que podría tener el empleo de *miR-497* como biomarcador y potencial diana terapéutica (111). Otros trabajos centran su atención en el *miR-506*, disminuido en el CRCC y relacionado con mal pronóstico y estadios avanzados. Mediante la manipulación de su diana genética, FLOT1, se podría inhibir la proliferación celular y las metástasis (112). Li W et al. investigaron la relación existente entre *Nin one binding protein* (NOB1), identificada previamente como potencial oncogen en el glioma (113), y el *miR-646* con el CRCC. Demostraron que el *miR-646* está infra expresado en el CRCC y esto favorece la capacidad para metastatizar a través de la vía MAPK/NOB1 (114).

La biología molecular del CR está caracterizado por la angiogénesis y la hipoxia. Numerosos miRNAs han sido relacionados con estos procesos. Tal es el caso del *miR-*

210 sobre expresado en situaciones de hipoxia o el *miR-29b* también sobre expresado y promotor de angiogénesis (115).

Otros miRNAs sobre expresados en CR e inductores de la angiogénesis son *miR-142-43p* y *miR-424-5p* (116).

Se sabe que el *miR-21* está sobre expresado en CR en comparación con tejido renal normal y que existe una asociación entre su sobre expresión y tumores de más alto grado y estadios más avanzados en CR (117). El *miR-21* funciona como oncomir y está involucrado en procesos de proliferación, invasión y apoptosis. El *miR-21* se asocia también con otros procesos tumorales tales como pulmón, mama y próstata (118). Estudios de Bera A. et al han demostrado que la sobre expresión de *miR-21* estimula la proliferación del CR mediante la inhibición de la fosforilación de PTEN/Akt/IKK β y NF κ B-ciclina D1 dependiente (119).

Múltiples estudios sugieren que la metformina, un antidiabético oral de la familia de las biguanidas, posee propiedades anticancerígenas, reduciendo el riesgo de cáncer y mejorando el pronóstico (120–123). Sin embargo el mecanismo por el cuál la metformina se relaciona con varios cánceres, incluido el CR, se desconoce aún. En esta línea argumental, Yang FQ et al sugiere que las propiedades anticancerígenas de la metformina están en relación con la sobre expresión de *miR-26a* que inhibe la proliferación celular al inhibir Bcl-2, ciclina D1 y estimulando la expresión de PTEN (124).

El *miR-23b* está localizado en el cromosoma 9 y tiene distintas funciones órgano específicas en el desarrollo del cáncer. Liu W. et al relacionaron la sobre expresión de *miR-23b* está relacionada con la enzima prolin-oxidasa, un mediador de apoptosis y del factor inductor de hipoxia (HIF) en el CR (125). Zaman MS et al, demuestran que el

miR-23b-3p es un miRNA oncogénico e inhibe el gen supresor de tumores PTEN en el CR (126).

El grupo de Majid S. descubrieron que la expresión de *miR-205* está significativamente disminuida en líneas celulares de CR y tumores cuando se compara con líneas celulares no cancerígenas y esta infra expresión se correlaciona de manera inversa con la expresión de SFKs. La familia Src de protein-kinasas (SFK) juega un papel fundamental en la regulación de procesos celulares, incluyendo crecimiento celular, diferenciación, migración y supervivencia (127).

Shi L. et al recientemente han demostrado una nueva vía de regulación de la proliferación celular en el CR mediante la expresión de TGF- β /RBL2 inducida por la inhibición de *miR-93* (128).

Es bien conocido que un mismo miRNA puede regular multitud de procesos diferentes. En esta línea Boguslawska J et al proponen un nuevo mecanismo de biofeedback entre los miRNAs implicados en CR (*miR-224* y *miR-452*) y los niveles de triyodotironina (T3) (129).

Hirata H et al. demostró que el *miR-1260b* está sobre expresado en el CR en comparación con tejido normal y que esto se relacionaba con pobre supervivencia. El *miR-1260b* promueve la proliferación celular en el CR y la invasión celular (130).

Tabla 19. MicroRNAs y Cáncer de Riñón

miRNA	Expresión	Diana	Función	Referencia
<i>miR-34a</i>	alta	p53	Proliferación celular	68
<i>miR-141/200</i>	baja	EMT		71
<i>miR-506</i>	baja	FLOT1	Proliferación celular	76
<i>miR-646</i>	baja	MAPK/NOB1	Proliferación celular	78
<i>miR-29b</i>	alta	TIS1 1B	Angiogénesis	79
<i>miR-142-43p</i>	alta	-	Angiogénesis	80
<i>miR-424-5p</i>				
<i>miR-21</i>	alta	PTEN/Akt/IKK β NFKB-ciclina D1	Proliferación celular	81-83
<i>miR-26a</i>	alta	Bcl-2, ciclina D1, PTEN	Proliferación celular	88
<i>miR-23b</i>	alta	Proline oxidasa	Apoptosis, hipoxia	89
<i>miR-23b-3p</i>	alta	PTEN	Proliferación celular	90
<i>miR-205</i>	baja	SFKs	Regulación celular	91
<i>miR-93</i>	baja	TGF- β /RBL2	Proliferación celular	92
<i>miR-224</i>	alta	GABRE	Proliferación celular	93
<i>miR-452</i>				
<i>miR-1260b</i>	alta	sFRP1, Dkk2, Smad4	Proliferación celular	94

III. PREDICTOR 9-miRNAs

La investigación en el campo de la búsqueda de marcadores moleculares requiere el análisis de grandes números de muestras que confieran a los estudios el suficiente poder estadístico. Parte del interés de nuestro proyecto reside en el esfuerzo empleado en desarrollar técnicas de biología molecular que permitan abordar análisis de alto rendimiento sobre muestras fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE). En este sentido, nuestro trabajo es técnicamente similar al publicado por Fridman et al. y Weng et al (110,131). La posibilidad de acceder al análisis molecular de los tumores empleando los bloques FFPE, generados durante el análisis patológico rutinario, abre unas enormes posibilidades para la búsqueda de nuevos marcadores moleculares.

Un marcador tumoral potencialmente puede ser empleado para screening, diagnóstico, estimar pronóstico, predecir respuesta a un tratamiento o monitorizar recurrencia y progresión.

En 2008 fueron publicados los requisitos que debe cumplir un marcador tumoral para ser útil en la práctica clínica: 1) que sus resultados sean apropiados para la aplicación requerida; 2) que sus resultados sirvan para separar pacientes en dos o más categorías clínicamente relevantes y diferentes y 3) que la diferencia entre un resultado positivo y negativo del marcador sea confiable (132).

Nuestro predictor cumple los requisitos anteriormente mencionados, sin embargo precisaría una validación externa con una muestra de pacientes mayor.

En nuestro predictor está formado por un grupo de 9 miRNAs involucrados en multitud de enfermedades tumorales y no tumorales (*Tabla 20*). Sin embargo, no tenemos conocimiento de que previamente hayan sido relacionados con CR a excepción de dos de ellos: *hsa-miR-425* y *hsa-miR-204*.

Tabla 20. miRNAs y enfermedades relacionadas

miRNA	Cáncer	Otras enfermedades
hsa-miR-103	adenocarcinoma, pulmón, carcinoma hepatocelular, páncreas, estómago, colon y recto, ovario y endometrio, linfoma B, leucemia, melanoma, mesotelioma, mama	Alzheimer, Diabetes Mellitus II, HTA, distrofias musculares, dolor, pre-eclampsia, esquizofrenia.
hsa-miR-107	Astrocitoma, mama, hepatocelular, colon y recto, estómago, gastrointestinal, cabeza y cuello, LLC, linfoma B, pulmón, melanoma, páncreas, próstata, vejiga.	Alzheimer, Crohn, DM II, fallo cardiaco, insuficiencia renal, distrofias musculares, obesidad, adenomas pituitarios
hsa-miR-223	Adenocarcinoma, mama, carcinoma hepatocelular, pulmón no microcítico, carcinoma escamoso, leucemia linfoblástica aguda, linfoma B, leucemia mieloide aguda, colon y recto, cabeza y cuello, estómago,	Artritis reumatoide, FA, DM II, endometriosis, VIH, LES, fallo cardiaco
hsa-miR-425	Carcinoma hepatocelular, carcinoma renal , esófago, glioblastoma, páncreas, mama	
hsa-miR-340*	mama, colon y recto, neuroblastoma, estómago	Enfermedad coronaria, fallo cardiaco
hsa-miR-130b	carcinoma hepatocelular, cabeza y cuello, leucemia mieloide, próstata, estómago.	LES, tuberculosis, fallo cardiaco, mieloma múltiple, pre-eclampsia, mieloma múltiple
hsa-miR-652	colon y recto, osteosarcoma	Autismo, cirrosis
hsa-miR-214	suprarrenal, mama, pulmón no microcítico, colangiocarcinoma, esófago, mesotelioma, páncreas, ovario y cérvix, próstata, melanoma, hepatoblastoma, linfoma B.	Fibrosis hepática, distrofias musculares, enfermedad de Huntington.
hsa-miR-204	mama, carcinoma renal , cabeza y cuello, endometrio, melanoma, páncreas, próstata, neuroblastoma, estómago.	fallo cardiaco, HTA, fracaso renal, degeneración retiniana.

○ **hsa-miR-425**

El *hsa-miR-425* se ha relacionado con el CR por dos vías distintas. En primer lugar el grupo de Wojcicka A et al (133) relaciona el *hsa-miR-425* con el receptor beta de la hormona tiroidea (THRB). En el CRCC el THRB está infra expresado. El *hsa-miR-425* está sobre expresado en muestras de tejido de CRCC en comparación con muestras de controles. La sobre expresión de *hsa-miR-425* se correlaciona de manera inversa con la cantidad de transcripto THRB en las muestras de tejido. Por tanto, la sobre expresión de *hsa-miR-425* condiciona una inhibición en la expresión de THRB en el CRCC.

Por otro lado, Hao JF et al (134) identificó como potencial biomarcador en el CRCC un grupo de cinco miRNAs: *hsa-miR-425*, *hsa-miR-136*, *hsa-miR-335*, *hsa-miR-340* y *hsa-miR-320d*; involucrados en procesos celulares como en el metabolismo de la arginina y la prolina, la fosforilación oxidativa y el eje sodio-aldosterona. Este grupo de biomarcadores podrían ayudar a discriminar entre sujetos sanos y sujetos con CRCC.

○ **hsa-miR-204**

El *hsa-miR-204* se ha relacionado con el CR de manera más amplia. Hall DP et al relacionan este miRNA con la regulación de la autofagia, proceso que estimula el crecimiento tumoral mediante la producción de nutrientes a partir de la degradación de estructuras intracelulares, en el CRCC mediante la represión directa del "*Transient Receptor Potential Melastatin 3*" (TRPM3) e indirectamente a través de la "*caveolina 1*" (CAV1) (135). En la misma línea de la autofagia pero mediante la inhibición de LC3B se han desarrollado los trabajos de Mikhaylova O et al (136).

Koller K et al. relacionan los nefroblastomas con una baja expresión de *hsa-miR-204* con una alta expresión de su transcripto, el oncogen MEIS1 (137).

Imam JS et al. le atribuyen un uso en la práctica clínica al relacionar la microdelección del *hsa-miR-204* con la disregulación de los oncogenes implicados en estímulos de crecimiento y metástasis en CR. Mediante la manipulación de los niveles de *hsa-miR-204* se podría suprimir el desarrollo de metástasis (138).

Master A et al. relaciona la sobre expresión de *hsa-miR-204* con una baja expresión del receptor Beta-1 de la hormona tiroidea en tejido tumoral de CRCC con procesos de carcinogénesis y proliferación celular (139).

IV. COMPARACIÓN ENTRE PREDICTOR 9-miRNAs Y OTROS MODELOS PREDICTIVOS

La mayoría de los modelos pronósticos incluyen variables clínicas y patológicas pero sin embargo difieren en el número y tipo de covariables, en las propiedades del modelo (nomograma o categorías pronósticas) y en el objetivo a determinar (supervivencia global, SCE o SLE) (140).

Además, la selección de pacientes a veces no está bien definida, el tamaño muestral puede no estar bien justificado y la precisión de las estimaciones no bien valorada. Por este motivo, la generalización de estos modelos en otras cohortes de pacientes con características diferentes puede ser cuestionable (140).

Otro aspecto crítico a tener en cuenta en relación a la construcción de un modelo pronóstico es la necesidad de su adaptación a las variaciones y actualizaciones que sufren a lo largo del tiempo las clasificaciones de las variables patológicas incluidas en dichos modelos (73). Este aspecto es particularmente relevante en la clasificación patológica del tumor primario. La mayoría de los modelos pronósticos se basan en la clasificación TNM de 1997, que es general es similar a versiones posteriores sin embargo está en constante cambio y reclasificación sobre todo en lo referente a enfermedad localmente avanzada (T3-4) (51,141,142).

Ocurre algo similar con la relevancia pronóstica que tienen algunos aspectos patológicos en determinados subtipos histológicos. El grado nuclear de Fuhrman puede sufrir variaciones intra e inter observador (58,98). Además tanto el grado nuclear como la presencia de necrosis tienen diferente significado pronóstico de acuerdo con la

histología tumoral (91,143,144). En este sentido nomogramas como el UISS, Karakiewicz o el SSIGN podrían ser inadecuados. El nomograma de Kattan no incluye ni la necrosis ni el grado nuclear entre sus variables.

En general, después de dos décadas de investigación básica, parece que los modelos pronósticos que emplean variables postoperatorias de tipo clínico y patológico discriminan mejor que los modelos basados en variables preoperatorias a la hora de predecir supervivencia (140).

Para algunos autores la SCE después de nefrectomía representa el objetivo más sólido y válido a determinar por un modelo pronóstico (145). En pacientes con CR no metastásico los modelos que mejor se adaptan a ese objetivo parecen ser UISS y Karakiewicz (76,145,146). Además, el modelo de Karakiewicz es el que tiene una aplicación más amplia ya que muestra una alta precisión pronóstica en cualquier subtipo histológico de CR (76).

En nuestra serie, el nomograma Karakiewicz parece ser un predictor independiente de SCE, ligeramente inferior a los resultados obtenidos por nuestro *Predictor 9-miRNAs* (Tabla 18). Por el contrario, en nuestra serie el nomograma de UISS no tiene relevancia estadística en lo referente a predecir SCE o SLE.

El modelo de Kattan es uno de los que mejor funcionan a la hora de predecir SLE, pero su comportamiento es a penas ligeramente mejor que el UISS. Su aplicación puede verse limitada a pacientes con CR papilar o cromóforo (73). Llama la atención que en nuestro estudio, pese a ser una población homogénea con un único subtipo histológico, el nomograma de Kattan no tiene relevancia desde el punto de vista estadístico a la hora de predecir SLE.

Cabría imaginar que en el futuro la creación de nuevos modelos pronósticos y la mejora de los actuales, debería integrar factores pronósticos habituales (grado nuclear, pT, histología, tamaño tumoral y PS) con nuevas dianas moleculares (147–149). El modelo propuesto por Kim et al (147) combina marcadores moleculares como la anhidrasa carbónica 9, p53, vimentina y gelsolina, con variables clínicas y anatomopatológicas (ECOG-PS y pT). Atribuye a este modelo más completo unas propiedades pronósticas a las de UISS. Sin embargo, este tipo de modelos se ven limitados en su aplicación y difusión por la disponibilidad para analizar variables moleculares.

Los miRNAs aislados para el estudio se han obtenido a partir de los bloques FFPE, generados durante el análisis patológico rutinario. La posibilidad de acceder al análisis molecular de los tumores a partir de las muestras empleadas de rutina por el patólogo abre unas enormes posibilidades para la búsqueda de nuevos marcadores moleculares.

Nuestro *Predictor 9-miRNAs* parece demostrar un comportamiento sólido y actuar como predictor tanto a la hora de determinar SLE como SCE. En el análisis univariante y en el multivariante se comporta como factor independiente y estadísticamente significativo frente a otras variables (*Tablas 15-18*).

CONCLUSIONES

- Hemos determinado un perfil de 9-miRNAs (*hsa-miR-103*, *hsa-miR-107*, *hsa-miR-204*, *hsa-miR-214*, *hsa-miR-223*, *hsa-miR-425*, *hsa-miR-340*, *hsa-miR-130b* y *hsa-miR-625*) capaz de identificar una subpoblación de pacientes con CRCC estadio I y II con alto riesgo de progresión.
- El *Predictor 9-miRNAs* previamente descrito cataloga como alto riesgo al 30% de los pacientes del estudio. La supervivencia libre de enfermedad a distancia y la supervivencia cáncer específica a los 5 años en este grupo fue del 61.54% y 86.4%, respectivamente.
- En nuestro estudio no identificamos ninguna variable clínica ni anatomopatológica como factor pronóstico de progresión de la enfermedad y muerte por cáncer.
- El *Predictor 9-miRNAs* se comporta de manera independiente y sólida frente a variables clínicas y anatomopatológicas, como tamaño tumoral, grado nuclear de Fuhrman y estadio clínico.
- Al comparar el *Predictor 9-miRNAs* con otros predictores, únicamente el Nomograma de Karakiewicz mantiene cierta relevancia pronóstica a la hora de predecir supervivencia cáncer específica.
- Por lo tanto, nuestro *Predictor 9-miRNAs* es capaz de predecir tanto SLE como SCE en una población de pacientes con CR en estadio I y II.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del Cáncer en España 2014 [Internet]. Available from: www.seom.org
2. Wein AJ, Kavoussi LR, Campbell MF, editors. Campbell-Walsh urology /: editor-in-chief, Alan J. Wein; [editors, Louis R. Kavoussi ... et al.]. 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2012. 4 p.
3. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin R, de Kernion JB, Belldegrun A. Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors. *J Urol*. 2000 Feb;163(2):426–30.
4. Leslie JA, Prihoda T, Thompson IM. Serendipitous renal cell carcinoma in the post-CT era: continued evidence in improved outcomes. *Urol Oncol*. 2003 Feb;21(1):39–44.
5. Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urol Oncol*. 2002 Aug;7(4):135–40.
6. Parsons JK, Schoenberg MS, Carter HB. Incidental renal tumors: casting doubt on the efficacy of early intervention. *Urology*. 2001 Jun;57(6):1013–5.
7. Kessler O, Mukamel E, Hadar H, Gillon G, Konechezky M, Servadio C. Effect of improved diagnosis of renal cell carcinoma on the course of the disease. *J Surg Oncol*. 1994 Nov;57(3):201–4.
8. Konnak JW, Grossman HB. Renal cell carcinoma as an incidental finding. *J Urol*. 1985 Dec;134(6):1094–6.
9. Thompson IM, Peek M. Improvement in survival of patients with renal cell carcinoma--the role of the serendipitously detected tumor. *J Urol*. 1988

Sep;140(3):487–90.

10. Algaba F. Patología del cáncer urogenital. Barcelona, España: Pulso Ediciones; 1990.
11. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1982 Oct;6(7):655–63.
12. Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders PFA, Patard JJ, et al. Carcinoma. UPDATE [Internet]. 2007 [cited 2015 May 24]; Available from: http://www.medizin-tuebingen.com/uktmedia/Einrichtungen/Zentren/Tumorzentrum/PDF_Archiv/TLL/TLL_Nierenzellca.pdf
13. Lane BR, Kattan MW. Prognostic models and algorithms in renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am*. 2008 Nov;35(4):613–25; vii.
14. Pettus JA, Jang TL, Thompson RH, Yossepowitch O, Kagiwada M, Russo P. Effect of baseline glomerular filtration rate on survival in patients undergoing partial or radical nephrectomy for renal cortical tumors. *Mayo Clin Proc*. 2008 Oct;83(10):1101–6.
15. Berger A, Brandina R, Atalla MA, Herati AS, Kamoi K, Aron M, et al. Laparoscopic radical nephrectomy for renal cell carcinoma: oncological outcomes at 10 years or more. *J Urol*. 2009 Nov;182(5):2172–6.
16. Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Rising incidence of small renal masses: a need to reassess treatment effect. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Sep 20;98(18):1331–4.

17. Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Said JW, Shvarts O, Quintana D, et al. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Mar 15;19(6):1649–57.
18. Sorbellini M, Kattan MW, Snyder ME, Reuter V, Motzer R, Goetzl M, et al. A postoperative prognostic nomogram predicting recurrence for patients with conventional clear cell renal cell carcinoma. *J Urol*. 2005 Jan;173(1):48–51.
19. Isbarn H, Karakiewicz PI. Predicting cancer-control outcomes in patients with renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol*. 2009 May;19(3):247–57.
20. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *J Urol*. 2002 Dec;168(6):2395–400.
21. Parker AS, Leibovich BC, Lohse CM, Sheinin Y, Kuntz SM, Eckel-Passow JE, et al. Development and evaluation of BioScore: a biomarker panel to enhance prognostic algorithms for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2009 May 15;115(10):2092–103.
22. Kontak JA, Campbell SC. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am*. 2003 Aug;30(3):467–80.
23. Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM, Thompson RH, Cheville JC, Zavada J, et al. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Oct 20;25(30):4757–64.
24. Bedke J, Buse S, Pritsch M, Macher-Goeppinger S, Schirmacher P, Haferkamp

A, et al. Perinephric and renal sinus fat infiltration in pT3a renal cell carcinoma: possible prognostic differences. *BJU Int.* 2009 May;103(10):1349–54.

25. Martínez-Salamanca JI, Huang WC, Millán I, Bertini R, Bianco FJ, Carballido JA, et al. Prognostic impact of the 2009 UICC/AJCC TNM staging system for renal cell carcinoma with venous extension. *Eur Urol.* 2011 Jan;59(1):120–7.

26. Margulis V, Sánchez-Ortiz RF, Tamboli P, Cohen DD, Swanson DA, Wood CG. Renal cell carcinoma clinically involving adjacent organs: experience with aggressive surgical management. *Cancer.* 2007 May 15;109(10):2025–30.

27. Bonsib SM, Gibson D, Mhoon M, Greene GF. Renal sinus involvement in renal cell carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2000 Mar;24(3):451–8.

28. Uzzo RG, Cherullo EE, Myles J, Novick AC. Renal cell carcinoma invading the urinary collecting system: implications for staging. *J Urol.* 2002 Jun;167(6):2392–6.

29. Klatter T, Chung J, Leppert JT, Lam JS, Pantuck AJ, Figlin RA, et al. Prognostic relevance of capsular involvement and collecting system invasion in stage I and II renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2007 Apr;99(4):821–4.

30. Sagalowsky AI, Kadesky KT, Ewalt DM, Kennedy TJ. Factors influencing adrenal metastasis in renal cell carcinoma. *J Urol.* 1994 May;151(5):1181–4.

31. Sandock DS, Seftel AD, Resnick MI. Adrenal metastases from renal cell carcinoma: role of ipsilateral adrenalectomy and definition of stage. *Urology.* 1997 Jan;49(1):28–31.

32. Paul R, Mordhorst J, Leyh H, Hartung R. Incidence and outcome of patients with adrenal metastases of renal cell cancer. *Urology.* 2001 May;57(5):878–82.

33. Siemer S, Lehmann J, Loch A, Becker F, Stein U, Schneider G, et al. Current TNM classification of renal cell carcinoma evaluated: revising stage T3a. *J Urol*. 2005 Jan;173(1):33–7.
34. Thompson RH, Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM, Frank I, Kwon ED, et al. Should direct ipsilateral adrenal invasion from renal cell carcinoma be classified as pT3a? *J Urol*. 2005 Mar;173(3):918–21.
35. Guinan P, Sobin LH, Algaba F, Badellino F, Kameyama S, MacLennan G, et al. TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*. 1997 Sep 1;80(5):992–3.
36. Angermeier KW, Novick AC, Strem SB, Montie JE. Nephron-sparing surgery for renal cell carcinoma with venous involvement. *J Urol*. 1990 Dec;144(6):1352–5.
37. Quek ML, Stein JP, Skinner DG. Surgical approaches to venous tumor thrombus. *Semin Urol Oncol*. 2001 May;19(2):88–97.
38. Haferkamp A, Bastian PJ, Jakobi H, Pritsch M, Pfitzenmaier J, Albers P, et al. Renal cell carcinoma with tumor thrombus extension into the vena cava: prospective long-term followup. *J Urol*. 2007 May;177(5):1703–8.
39. Klatte T, Pantuck AJ, Riggs SB, Kleid MD, Shuch B, Zomorodian N, et al. Prognostic factors for renal cell carcinoma with tumor thrombus extension. *J Urol*. 2007 Oct;178(4 Pt 1):1189–95; discussion 1195.
40. Wotkowicz C, Wszolek MF, Libertino JA. Resection of renal tumors invading the vena cava. *Urol Clin North Am*. 2008 Nov;35(4):657–71; viii.

41. Subramanian VS, Stephenson AJ, Goldfarb DA, Fergany AF, Novick AC, Krishnamurthi V. Utility of preoperative renal artery embolization for management of renal tumors with inferior vena caval thrombi. *Urology*. 2009 Jul;74(1):154–9.
42. Montie JE, Pontes JE, Novick AC, Vanderburg Mendendorp S, Strem SB, Montague DK, et al. Resection of inferior vena cava tumor thrombi from renal cell carcinoma. *Am Surg*. 1991 Jan;57(1):56–61.
43. Glazer AA, Novick AC. Long-term followup after surgical treatment for renal cell carcinoma extending into the right atrium. *J Urol*. 1996 Feb;155(2):448–50.
44. Gettman MT, Blute ML, Spotts B, Bryant SC, Zincke H. Pathologic staging of renal cell carcinoma: significance of tumor classification with the 1997 TNM staging system. *Cancer*. 2001 Jan 15;91(2):354–61.
45. Naitoh J, Kaplan A, Dorey F, Figlin R, Belldegrun A. Metastatic renal cell carcinoma with concurrent inferior vena caval invasion: long-term survival after combination therapy with radical nephrectomy, vena caval thrombectomy and postoperative immunotherapy. *J Urol*. 1999 Jul;162(1):46–50.
46. Bissada NK, Yakout HH, Babanouri A, Elsalamony T, Fahmy W, Gunham M, et al. Long-term experience with management of renal cell carcinoma involving the inferior vena cava. *Urology*. 2003 Jan;61(1):89–92.
47. Moinzadeh A, Libertino JA. Prognostic significance of tumor thrombus level in patients with renal cell carcinoma and venous tumor thrombus extension. Is all T3b the same? *J Urol*. 2004 Feb;171(2 Pt 1):598–601.
48. Hatcher PA, Anderson EE, Paulson DF, Carson CC, Robertson JE. Surgical management and prognosis of renal cell carcinoma invading the vena cava. *J Urol*. 1991

Jan;145(1):20–3; discussion 23–4.

49. Zini L, Destrieux-Garnier L, Leroy X, Villers A, Haulon S, Lemaitre L, et al. Renal vein ostium wall invasion of renal cell carcinoma with an inferior vena cava tumor thrombus: prediction by renal and vena caval vein diameters and prognostic significance. *J Urol*. 2008 Feb;179(2):450–4; discussion 454.

50. Thrasher JB, Paulson DF. Prognostic factors in renal cancer. *Urol Clin North Am*. 1993 May;20(2):247–62.

51. Thompson RH, Cheville JC, Lohse CM, Webster WS, Zincke H, Kwon ED, et al. Reclassification of patients with pT3 and pT4 renal cell carcinoma improves prognostic accuracy. *Cancer*. 2005 Jul 1;104(1):53–60.

52. Phillips CK, Taneja SS. The role of lymphadenectomy in the surgical management of renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2004 Jun;22(3):214–23; discussion 223–4.

53. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999 Aug;17(8):2530–40.

54. Motzer RJ, Russo P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J Urol*. 2000 Feb;163(2):408–17.

55. Negrier S, Mejean A, Oudard S, Escudier B. [Metastatic kidney cancer: new therapeutic approaches]. *Prog En Urol J Assoc Fr Urol Société Fr Urol*. 2002 Sep;12(4):703–8.

56. Rini BI. Metastatic renal cell carcinoma: many treatment options, one patient. *J*

Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2009 Jul 1;27(19):3225–34.

57. Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Boumerhi G, Malhi S, Wood L, Elson P, et al. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2005 Feb 1;23(4):832–41.

58. Lang H, Lindner V, de Fromont M, Molinié V, Letourneux H, Meyer N, et al. Multicenter determination of optimal interobserver agreement using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma: Assessment of 241 patients with > 15-year follow-up. Cancer. 2005 Feb 1;103(3):625–9.

59. Gelb AB. Renal cell carcinoma: current prognostic factors. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer. 1997 Sep 1;80(5):981–6.

60. Schips L, Lipsky K, Zigeuner R, Salfellner M, Winkler S, Langner C, et al. Impact of tumor-associated symptoms on the prognosis of patients with renal cell carcinoma: a single-center experience of 683 patients. Urology. 2003 Dec;62(6):1024–8.

61. Srigley JR, Hutter RV, Gelb AB, Henson DE, Kenney G, King BF, et al. Current prognostic factors--renal cell carcinoma: Workgroup No. 4. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer. 1997 Sep 1;80(5):994–6.

62. Kim HL, Han K-R, Zisman A, Figlin RA, Belldegrun AS. Cachexia-Like Symptoms Predict a Worse Prognosis in Localized T1 Renal Cell Carcinoma. J Urol. 2004 May;171(5):1810–3.

63. Kim HL, Belldgrun AS, Freitas DG, Bui MHT, Han K-R, Dorey FJ, et al. Paraneoplastic Signs and Symptoms of Renal Cell Carcinoma: Implications for Prognosis. *J Urol*. 2003 Nov;170(5):1742–6.
64. Bensalah K, Leray E, Fergelot P, Rioux-Leclercq N, Tostain J, Guillé F, et al. Prognostic value of thrombocytosis in renal cell carcinoma. *J Urol*. 2006 Mar;175(3 Pt 1):859–63.
65. Symbas NP, Townsend MF, El-Galley R, Keane TE, Graham SD, Petros JA. Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2000 Aug;86(3):203–7.
66. O’Keefe SC, Marshall FF, Issa MM, Harmon MP, Petros JA. Thrombocytosis is associated with a significant increase in the cancer specific death rate after radical nephrectomy. *J Urol*. 2002 Oct;168(4 Pt 1):1378–80.
67. Vaglio A, Buzio L, Cravedi P, Pavone L, Garini G, Buzio C. Prognostic significance of albuminuria in patients with renal cell cancer. *J Urol*. 2003 Oct;170(4 Pt 1):1135–7.
68. Magera JS, Leibovich BC, Lohse CM, Sengupta S, Cheville JC, Kwon ED, et al. Association of abnormal preoperative laboratory values with survival after radical nephrectomy for clinically confined clear cell renal cell carcinoma. *Urology*. 2008 Feb;71(2):278–82.
69. Jacobsen J, Rasmuson T, Grankvist K, Ljungberg B. Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol*. 2000 Jan;163(1):343–7.
70. Bui MHT, Seligson D, Han K, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, et al. Carbonic

anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2003 Feb;9(2):802–11.

71. Atkins M, Regan M, McDermott D, Mier J, Stanbridge E, Youmans A, et al. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005 May 15;11(10):3714–21.

72. Klatte T, Seligson DB, LaRochelle J, Shuch B, Said JW, Riggs SB, et al. Molecular signatures of localized clear cell renal cell carcinoma to predict disease-free survival after nephrectomy. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2009 Mar;18(3):894–900.

73. Galfano A, Novara G, Iafrate M, Cavalleri S, Martignoni G, Gardiman M, et al. Mathematical Models for Prognostic Prediction in Patients with Renal Cell Carcinoma. *Urol Int.* 2008;80(2):113–23.

74. Han K-R, Bleumer I, Pantuck AJ, Kim HL, Dorey FJ, Janzen NK, et al. Validation of an integrated staging system toward improved prognostication of patients with localized renal cell carcinoma in an international population. *J Urol.* 2003 Dec;170(6 Pt 1):2221–4.

75. Patard J-J, Kim HL, Lam JS, Dorey FJ, Pantuck AJ, Zisman A, et al. Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: an international multicenter study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2004 Aug 15;22(16):3316–22.

76. Karakiewicz PI, Briganti A, Chun FK-H, Trinh Q-D, Perrotte P, Ficarra V, et al. Multi-institutional validation of a new renal cancer-specific survival nomogram. *J Clin*

Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2007 Apr 10;25(11):1316–22.

77. Kattan MW, Reuter V, Motzer RJ, Katz J, Russo P. A postoperative prognostic nomogram for renal cell carcinoma. *J Urol*. 2001 Jul;166(1):63–7.

78. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):853–8.

79. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):858–62.

80. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):862–4.

81. Pabón-Martínez Y.V. MicroRNAs: un visión molecular. *Salud UIS*. 2011;43(3):289–97.

82. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA N Y N*. 2003 Mar;9(3):277–9.

83. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):259–69.

84. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834–8.

85. Li C, Feng Y, Coukos G, Zhang L. Therapeutic microRNA strategies in human cancer. *AAPS J*. 2009 Dec;11(4):747–57.

86. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostat Oxf Engl*. 2007 Jan;8(1):118–

27.

87. Shu Y, Klein JP, Zhang M-J. Asymptotic theory for the Cox semi-Markov illness-death model. *Lifetime Data Anal.* 2007 Mar;13(1):91–117.

88. Sánchez-Navarro I, Gámez-Pozo A, Pinto A, Hardisson D, Madero R, López R, et al. An 8-gene qRT-PCR-based gene expression score that has prognostic value in early breast cancer. *BMC Cancer.* 2010;10:336.

89. Bair E, Tibshirani R. Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data. *PLoS Biol.* 2004 Apr;2(4):E108.

90. Ljungberg B, Alamdari FI, Stenling R, Roos G. Prognostic significance of the Heidelberg classification of renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 1999 Dec;36(6):565–9.

91. Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhorst J, Sauter G, Mihatsch MJ. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. *Cancer.* 2000 Aug 1;89(3):604–14.

92. Amin MB, Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, de-Peralta Venturina M, et al. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol.* 2002 Mar;26(3):281–91.

93. Amin MB, Corless CL, Renshaw AA, Tickoo SK, Kubus J, Schultz DS. Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases. *Am J Surg Pathol.* 1997 Jun;21(6):621–35.

94. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of

outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2003 May;27(5):612–24.

95. Lau WK, Cheville JC, Blute ML, Weaver AL, Zincke H. Prognostic features of pathologic stage T1 renal cell carcinoma after radical nephrectomy. *Urology*. 2002 Apr;59(4):532–7.

96. Capitanio U, Cloutier V, Zini L, Isbarn H, Jeldres C, Shariat SF, et al. A critical assessment of the prognostic value of clear cell, papillary and chromophobe histological subtypes in renal cell carcinoma: a population-based study. *BJU Int*. 2009 Jun;103(11):1496–500.

97. Patard J-J. Prognostic Value of Histologic Subtypes in Renal Cell Carcinoma: A Multicenter Experience. *J Clin Oncol*. 2004 Sep 27;23(12):2763–71.

98. Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, Brunelli M, Novara G, Zanolla L, et al. Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system: a multivariate analysis of 388 patients with conventional renal cell carcinoma. *Cancer*. 2005 Jan 1;103(1):68–75.

99. Rioux-Leclercq N, Karakiewicz PI, Trinh Q-D, Ficarra V, Cindolo L, de la Taille A, et al. Prognostic ability of simplified nuclear grading of renal cell carcinoma. *Cancer*. 2007 Mar 1;109(5):868–74.

100. Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. *Am J Surg Pathol*. 2013 Oct;37(10):1490–504.

101. Delahunt B, Srigley JR, Montironi R, Egevad L. Advances in renal neoplasia:

recommendations from the 2012 International Society of Urological Pathology Consensus Conference. *Urology*. 2014 May;83(5):969–74.

102. Sun M, Lughezzani G, Jeldres C, Isbarn H, Shariat SF, Arjane P, et al. A Proposal for Reclassification of the Fuhrman Grading System in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. 2009 Nov;56(5):775–81.

103. Javidan J, Stricker HJ, Tamboli P, Amin MB, Peabody JO, Deshpande A, et al. Prognostic significance of the 1997 TNM classification of renal cell carcinoma. *J Urol*. 1999 Oct;162(4):1277–81.

104. Dutta KK, Zhong Y, Liu Y-T, Yamada T, Akatsuka S, Hu Q, et al. Association of microRNA-34a overexpression with proliferation is cell type-dependent. *Cancer Sci*. 2007 Dec;98(12):1845–52.

105. Juan D, Alexe G, Antes T, Liu H, Madabhushi A, Delisi C, et al. Identification of a MicroRNA Panel for Clear-cell Kidney Cancer. *Urology*. 2010 Apr;75(4):835–41.

106. Huang Y, Dai Y, Yang J, Chen T, Yin Y, Tang M, et al. Microarray analysis of microRNA expression in renal clear cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. 2009 Oct;35(10):1119–23.

107. Nakada C, Matsuura K, Tsukamoto Y, Tanigawa M, Yoshimoto T, Narimatsu T, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c. *J Pathol*. 2008 Dec;216(4):418–27.

108. Petillo D, Kort EJ, Anema J, Furge KA, Yang XJ, Teh BT. MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes. *Int J Oncol*. 2009 Jul;35(1):109–14.

109. Youssef YM, White NMA, Grigull J, Krizova A, Samy C, Mejia-Guerrero S, et

al. Accurate Molecular Classification of Kidney Cancer Subtypes Using MicroRNA Signature. *Eur Urol*. 2011 May;59(5):721–30.

110. Fridman E, Dotan Z, Barshack I, David MB, Dov A, Tabak S, et al. Accurate Molecular Classification of Renal Tumors Using MicroRNA Expression. *J Mol Diagn*. 2010 Sep;12(5):687–96.

111. Zhao X, Zhao Z, Xu W, Hou J, Du X. Down-regulation of miR-497 is associated with poor prognosis in renal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):758–64.

112. Yang F, Zhang H, Chen S-J, Yan Y, Zheng J. MiR-506 is down-regulated in clear cell renal cell carcinoma and inhibits cell growth and metastasis via targeting FLOT1. *PloS One*. 2015;10(3):e0120258.

113. Wang H, Li P, Zhao B. Knockdown of NOB1 expression by RNAi inhibits cellular proliferation and migration in human gliomas. *Gene*. 2013 Oct 10;528(2):146–53.

114. Li W, Liu M, Feng Y, Xu Y-F, Huang Y-F, Che J-P, et al. Downregulated miR-646 in clear cell renal carcinoma correlated with tumour metastasis by targeting the nine one binding protein (NOB1). *Br J Cancer*. 2014 Sep 9;111(6):1188–200.

115. Sinha S, Dutta S, Datta K, Ghosh AK, Mukhopadhyay D. Von Hippel-Lindau gene product modulates TIS11B expression in renal cell carcinoma: impact on vascular endothelial growth factor expression in hypoxia. *J Biol Chem*. 2009 Nov 20;284(47):32610–8.

116. Gowrishankar B, Ibragimova I, Zhou Y, Slifker MJ, Devarajan K, Al-Saleem T, et al. MicroRNA expression signatures of stage, grade, and progression in clear cell RCC. *Cancer Biol Ther*. 2014 Mar;15(3):329–41.

117. Faragalla H, Youssef YM, Scorilas A, Khalil B, White NMA, Mejia-Guerrero S, et al. The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma. *J Mol Diagn JMD*. 2012 Jul;14(4):385–92.
118. Spizzo R, Nicoloso MS, Croce CM, Calin GA. SnapShot: MicroRNAs in Cancer. *Cell*. 2009 May 1;137(3):586–586.e1.
119. Bera A, Ghosh-Choudhury N, Dey N, Das F, Kasinath BS, Abboud HE, et al. NFκB-mediated cyclin D1 expression by microRNA-21 influences renal cancer cell proliferation. *Cell Signal*. 2013 Dec;25(12):2575–86.
120. Zhang Z-J, Zheng Z-J, Shi R, Su Q, Jiang Q, Kip KE. Metformin for liver cancer prevention in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jul;97(7):2347–53.
121. Yin M, Zhou J, Gorak EJ, Quddus F. Metformin is associated with survival benefit in cancer patients with concurrent type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *The Oncologist*. 2013;18(12):1248–55.
122. Donadon V, Balbi M, Mas MD, Casarin P, Zanette G. Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients with chronic liver disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2010 May;30(5):750–8.
123. Garrett CR, Hassabo HM, Bhadkamkar NA, Wen S, Baladandayuthapani V, Kee BK, et al. Survival advantage observed with the use of metformin in patients with type II diabetes and colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012 Apr 10;106(8):1374–8.
124. Yang F-Q, Wang J-J, Yan J-S, Huang J-H, Li W, Che J-P, et al. Metformin inhibits cell growth by upregulating microRNA-26a in renal cancer cells. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(10):3289–96.

125. Liu W, Zahirnyk O, Wang H, Shiao Y-H, Nickerson ML, Khalil S, et al. miR-23b targets proline oxidase, a novel tumor suppressor protein in renal cancer. *Oncogene*. 2010 Sep 2;29(35):4914–24.
126. Zaman MS, Thamminana S, Shahryari V, Chiyomaru T, Deng G, Saini S, et al. Inhibition of PTEN gene expression by oncogenic miR-23b-3p in renal cancer. *PLoS One*. 2012;7(11):e50203.
127. Majid S, Saini S, Dar AA, Hirata H, Shahryari V, Tanaka Y, et al. MicroRNA-205 inhibits Src-mediated oncogenic pathways in renal cancer. *Cancer Res*. 2011 Apr 1;71(7):2611–21.
128. Shi J, Zhuang Y, Liu XK, Zhang YX, Zhang Y. TGF-beta induced RBL2 expression in renal cancer cells by down-regulating miR-93. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. 2014 Nov;16(11):986–92.
129. Boguslawska J, Piekuelko-Witkowska A, Wojcicka A, Kedzierska H, Poplawski P, Nauman A. Regulatory feedback loop between T3 and microRNAs in renal cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Mar 25;384(1-2):61–70.
130. Hirata H, Ueno K, Nakajima K, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Ishii N, et al. Genistein downregulates onco-miR-1260b and inhibits Wnt-signalling in renal cancer cells. *Br J Cancer*. 2013 May 28;108(10):2070–8.
131. Weng L, Wu X, Gao H, Mu B, Li X, Wang J-H, et al. MicroRNA profiling of clear cell renal cell carcinoma by whole-genome small RNA deep sequencing of paired frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Pathol*. 2010 Sep;222(1):41–51.
132. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman U-H, Lilja H, Br unner N, Chan DW, et al.

National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem*. 2008 Dec;54(12):e11–79.

133. Wojcicka A, Piekielko-Witkowska A, Kedzierska H, Rybicka B, Poplawski P, Boguslawska J, et al. Epigenetic regulation of thyroid hormone receptor beta in renal cancer. *PloS One*. 2014;9(5):e97624.

134. Hao J-F, Ren K-M, Bai J-X, Wang S-N, Shao B, Cao N, et al. Identification of potential biomarkers for clear cell renal cell carcinoma based on microRNA-mRNA pathway relationships. *J Cancer Res Ther*. 2014 Nov;10 Suppl:C167–77.

135. Hall DP, Cost NG, Hegde S, Kellner E, Mikhaylova O, Stratton Y, et al. TRPM3 and miR-204 establish a regulatory circuit that controls oncogenic autophagy in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2014 Nov 10;26(5):738–53.

136. Mikhaylova O, Stratton Y, Hall D, Kellner E, Ehmer B, Drew AF, et al. VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2012 Apr 17;21(4):532–46.

137. Koller K, Pichler M, Koch K, Zandl M, Stiegelbauer V, Leuschner I, et al. Nephroblastomas show low expression of microR-204 and high expression of its target, the oncogenic transcription factor MEIS1. *Pediatr Dev Pathol Off J Soc Pediatr Pathol Paediatr Pathol Soc*. 2014 Jun;17(3):169–75.

138. Imam JS, Plyler JR, Bansal H, Prajapati S, Bansal S, Rebeles J, et al. Genomic loss of tumor suppressor miRNA-204 promotes cancer cell migration and invasion by activating AKT/mTOR/Rac1 signaling and actin reorganization. *PloS One*. 2012;7(12):e52397.

139. Master A, Wójcicka A, Piekiełko-Witkowska A, Bogusławska J, Popławski P, Tański Z, et al. Untranslated regions of thyroid hormone receptor beta 1 mRNA are impaired in human clear cell renal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Nov;1802(11):995–1005.
140. Cindolo L, Patard J-J, Chiodini P, Schips L, Ficarra V, Tostain J, et al. Comparison of predictive accuracy of four prognostic models for nonmetastatic renal cell carcinoma after nephrectomy: A Multicenter European Study. *Cancer*. 2005 Oct 1;104(7):1362–71.
141. Ficarra V, Novara G, Iafrate M, Cappellaro L, Bratti E, Zattoni F, et al. Proposal for reclassification of the TNM staging system in patients with locally advanced (pT3-4) renal cell carcinoma according to the cancer-related outcome. *Eur Urol*. 2007 Mar;51(3):722–9; discussion 729–31.
142. Ficarra V, Guillè F, Schips L, de la Taille A, Prayer Galetti T, Tostain J, et al. Proposal for revision of the TNM classification system for renal cell carcinoma. *Cancer*. 2005 Nov 15;104(10):2116–23.
143. Sika-Paotonu D, Bethwaite PB, McCredie MRE, William Jordan T, Delahunt B. Nucleolar grade but not Fuhrman grade is applicable to papillary renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2006 Sep;30(9):1091–6.
144. Sengupta S, Lohse CM, Leibovich BC, Frank I, Thompson RH, Webster WS, et al. Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer*. 2005 Aug 1;104(3):511–20.
145. Meskawi M, Sun M, Trinh Q-D, Bianchi M, Hansen J, Tian Z, et al. A Review of Integrated Staging Systems for Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. 2012

Aug;62(2):303–14.

146. Zisman A, Pantuck AJ, Wieder J, Chao DH, Dorey F, Said JW, et al. Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2002 Dec 1;20(23):4559–66.

147. Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MHT, Yu H, et al. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Aug 15;10(16):5464–71.

148. Vasselli JR, Shih JH, Iyengar SR, Maranchie J, Riss J, Worrell R, et al. Predicting survival in patients with metastatic kidney cancer by gene-expression profiling in the primary tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 10;100(12):6958–63.

149. Takahashi M, Sugimura J, Yang X, Vogelzang N, Teh BS, Furge K, et al. Gene expression profiling of renal cell carcinoma and its implications in diagnosis, prognosis, and therapeutics. *Adv Cancer Res*. 2003;89:157–81.