

Tesis Doctoral

**Actividad y expresión de enzimas
convertidoras de angiotensinas en
neoplasias renales**

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina y Odontología**

**Fisiologia Saila
Medikuntza eta Odontologia Fakultatea**

Pedro Varela González

Leioa, 2015

(C)2015 Pedro Varela González

Tesis Doctoral

**Actividad y expresión de enzimas
convertidoras de angiotensinas en
neoplasias renales**



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Departamento de Fisiología Fisiologia Saila
Facultad de Medicina y Odontología Medikuntza eta Odontologia Fakultatea

Pedro Varela González

Leioa, 2015

Directores:

Dr. José Ignacio López Fernández de Villaverde

Dr. Gorka Larrinaga Enbeita

A mi hijo Jon y a todos los valientes de la Sexta Planta

Gracias,

A mis directores, a Gorka por creer en mí de principio a fin, por su dedicación y disponibilidad; a Iñaki por su contagiosa pasión y sus sabios consejos como clínico. Sin ellos esta tesis no habría sido posible.

Al Departamento de Fisiología de la UPV y a tod@s los que colaboraron en la obtención de los resultados de laboratorio de este trabajo. A Javier Gil, mi tutor durante la preparación de la Suficiencia Investigadora. A Adolfo, uno de mis directores en origen, te llevaré siempre en mi recuerdo con cariño. A mis compañeros de doctorado, en especial a Jaime y Ekaitz, por haberme hecho sentir acogido.

A los Departamentos de Anatomía Patológica de los Hospitales Universitarios de Basurto y Cruces por su colaboración en la obtención de muestras y análisis inmunohistoquímico. Al laboratorio del Instituto de Químicas del CSIC de Sevilla por su colaboración en los experimentos de PCR.

A Miren, por su ayuda con la ofimática, la revisión del texto, y por aguantarme en el día a día de éste, nuestro viaje juntos por la vida.

A mis padres, Pedro y Orlanda, por animarme a meterme en esta aventura doctoral. A mis hermanas, Orlanda y Amai, por su ejemplo y su cariño. A mi tío Juanjo, mi compañero, maestro y sobre todo, mi amigo. A mis abuelos, Juan Manuel y Orlanda, que han reforzado desde mi infancia la cultura del esfuerzo y el afán de superación personal y profesional. A mi familia vasca, Bego, Gorka, Susana, Aritz y Iera, que me hacen sentir como uno más, gracias por todo lo que me dais.

A mis compañeros y amigos, Txus, Marcos, Ico, Mer, Ainhoa, Mikel, Nano, Diego, Helena, Lidia, Raquel, Julián, Mari Sol, Lorena, Teresa, María Jesús, Mónica,... y un largo etcétera que no cabe en estas páginas.

Abreviaturas:

xg	Número de veces la aceleración de la gravedad
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina II
ACEi	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
Ag-NORs	<i>Silver stained nucleolar organizer region proteins</i>
Ang II	Angiotensina II
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
APA	Aminopeptidasa A
APB	Aminopeptidasa B
APN	Aminopeptidasa neutra
ARA II	Antagonista del receptor de la angiotensina II
ASP	Aspartil-aminopeptidasa
AT	Receptor de angiotensina
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
CA	<i>Cancer Antigen</i>
CA-9	Anhidrasa carbónica IX
CCRCC	Carcinoma renal de células claras
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	DNA complementario
ChRCC	Carcinoma renal cromóforo
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CXCR-4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
DAB	Diaminobencidina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxirribonucleotidos trifosfato
DPPIV	Dipeptidil-peptidasa IV
DTT	Ditiotreitol
EC	Enzyme Commission
E-cadherina	Cadherinas epiteliales
EDTA	Acido etileno diamino tetracético
EGTA	Acido tetraacético del glicol de etileno
EMA	Antígeno epitelial de membrana

EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ERM	Ezrin Radixin Moesin
ES	Error estándar
ET-1	Endotelina-1
GLUT 1	Transportador de glucosa I
h	Hora
H&E	Tinción hematoxilina y eosina
HIF-1α	<i>Hypoxia-inducible factor-1α</i>
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> (peroxidasa del rábano rusticado)
iECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
Ig	Inmunoglobulina
IGF-I	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
LOH	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
LHRH	Hormona liberadora de hormona luteinizante
min	Minutos
MMP	Metaloproteasa de la matriz
mRNA	RNA mensajero
NC-IUBMB	<i>Nomenclature Comittee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
NEP	Endopeptidasa neutra
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEP	Prolil-endopeptidasa
PRCC	Carcinoma papilar de células renales
PTEN	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
p/v	Peso/volumen
pVHL	Proteína VHL
RCC	Carcinoma de células renales
RNA	Acido ribonucleico
Rnasa	Ribonucleasa
RT	Retrotranscripción
RO	Oncocitoma renal
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SHP2	<i>Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase</i>

SRA	Sistema Renina Angiotensina
SRAi	Sistema Renina Angiotensina intrarenal
TAE	Tris-acetato-EDTA
TGF-α	Factor de crecimiento transformante alfa
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
U	Unidad de actividad enzimática
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer
UP	Unidad de actividad peptidásica
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGF-R	Receptores de factor de crecimiento endotelial vascular
VHL	Enfermedad de Von Hippel-Lindau
v/v	Volumen/volumen

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1. El cáncer renal	3
1.1. Características generales	3
1.2. Clasificación y tipos histológicos	4
1.2.1. Carcinoma renal de células claras	6
1.2.2. Carcinoma renal cromóforo	8
1.2.3. Oncocitoma renal	11
1.3. Sintomatología, diagnóstico y pronóstico de Carcinomas de Células Renales	12
1.4. Marcadores tumorales en neoplasias renales.....	15
2. Enzimas proteolíticas: descripción general de las peptidasas	17
2.1. Clasificación y nomenclatura	17
2.2. Peptidasas analizadas en este trabajo	19
2.2.1. Enzima convertidora de angiotensina (ACE)	19
2.2.2. Enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE2)	20
2.2.3. Aminopeptidasa A (APA).....	20
2.3. Funciones de las peptidasas	22
2.3.1. Las peptidasas como enzimas convertidoras de péptidos bioactivos.....	22
2.3.2. Acciones intracrininas de las peptidasas	23
2.3.3. Otras acciones de las peptidasas	24
2.4. Papel de las peptidasas en la biología tumoral.....	25
2.4.1. Péptidos y peptidasas en la biología tumoral	25
2.4.2. Modelo de regulación peptidásica.....	26
2.4.3. Otras acciones de las peptidasas en los procesos proliferativos.....	27
3. Sistema renina-angiotensina y su implicación en procesos tumorales	28
3.1. Sistema renina angiotensina (SRA): de su concepto clásico al descubrimiento de SRA locales	28
3.2. Sistema renina angiotensina y cáncer.....	31
3.2.1. Implicación del SRA en los hitos del cáncer: estudios en cultivos y modelos animales	32
3.2.2. Desregulación de SRA en líneas celulares y tejidos neoplásicos humanos.....	33

3.2.3. Estudios retrospectivos y ensayos clínicos	34
3.2.4. Sistema renina angiotensina intrarrenal (SRAi) y daño renal: ¿Implicación en el cáncer renal?	35
II. OBJETIVOS.....	39
III. MATERIALES Y METODOS.....	43
1. Reactivos y productos	45
2. Obtención del tejido biológico empleado.....	46
3. Análisis de la actividad convertidora de angiotensina	46
3.1. Fraccionamiento de la muestra	46
3.2. Determinación de la cantidad de proteína	48
3.3. Ensayos enzimáticos	48
3.3.1. Actividad de la Enzima Convertidora de Angiotensina	48
3.3.2. Actividad de la Enzima Convertidora de Angiotensina 2	49
3.3.3. Actividad de la Aminopeptidasa A	50
4. Análisis inmunohistoquímico e histológico	51
4.1. Preparación de las muestras: fijación, inclusión, microtomía, desparafinado e hidratación	51
4.2. Análisis inmunohistoquímico	52
4.2.1. Procesamiento de la muestra	52
4.2.2. Evaluación de la expresión tisular de las peptidasas empleadas como marcadores tumorales	54
4.3. Análisis histológico.....	54
4.3.1. Tinción con hematoxilina y eosina.....	54
4.3.2. Determinación del grado histopatológico.....	55
4.3.3. Clasificación del estadio neoplásico	56
5. Análisis de la expresión génica de los genes que codifican para peptidasas por qRT-PCR.....	57
5.1. Extracción de mRNA	57
5.2. Electroforesis en gel de agarosa	58
5.3. Tratamiento con DNasa I	58
5.4. Cuantificación de mRNA	59
5.5. Síntesis de cDNA	59
5.6. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.....	60

6. Tratamiento estadístico y ajuste de datos.....	62
IV. RESULTADOS.....	65
1. Datos relacionados con transformación neoplásica: Actividad enzimática, localización tisular y expresión génica en tejido neoplásico renal y tejido normal adyacente	68
1.1. Enzima convertidora de angiotensina (ACE)	68
1.1.1. Actividad enzimática	68
1.1.2. Localización tisular.....	69
1.1.3. Expresión génica	70
1.2. Enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2).....	71
1.2.1. Actividad enzimática	71
1.2.2. Localización tisular	71
1.2.3. Expresión génica	72
1.3. Aminopeptidasa A (APA).....	73
1.3.1. Actividad enzimática	73
1.3.2. Localización tisular.....	75
1.3.3. Expresión génica	77
2. Datos relacionados con la progresión, la agresividad y el pronóstico de los CCRCC.....	78
2.1. Estratificación de los datos de actividad en función del grado histológico y el estadio	78
2.1.1. Actividad de la ACE.....	78
2.1.2. Actividad de ACE2	79
2.1.3. Actividad de APA	80
2.2. Estratificación de los datos de expresión génica en función del grado histológico y el estadio	81
2.2.1. Expresión génica de la ACE.....	82
2.2.2. Expresión génica de la ACE2	82
2.2.3. Expresión génica de la APA	83
2.3. Relación entre la actividad y los niveles de mRNA y el diámetro tumoral (CCRCC).....	83
2.4. Relación entre la actividad enzimática y la supervivencia a los 5 años de los pacientes con CCRCC	86
V. DISCUSIÓN	91

1. Actividad enzimática, expresión tisular y génica de enzimas convertidoras de angiotensina en neoplasias renales y parénquima renal normal adyacente.....	93
2. Cambios relacionados con el origen histogenético: CCRCC, ChRCC y RO son diferentes.....	97
3. Cambios relacionados con la agresividad tumoral en el CCRCC	99
4. Alteraciones peptidásicas y regulación peptídica en la carcinogénesis renal: posible alteración del SRA intrarrenal.....	101
5. Otras posibles acciones de las peptidasas convertidoras de angiotensina en el carcinoma renal.....	106
VI. CONCLUSIONES	111
VII. BIBLIOGRAFIA	115
VIII. ANEXOS	141

I. Introducción

1. El cáncer renal

El carcinoma de células renales (RCC) sigue el modelo de carcinogénesis con sucesivos "pasos". A lo largo de estas sucesivas etapas, el RCC adquiere progresivamente "atributos" que le permiten resistir a señales inhibitorias de crecimiento exógenas, evadir la apoptosis, perder la capacidad del control del ciclo celular con lo que la célula prolifera sin límites, desarrollarse a pesar de un ambiente pobre en oxígeno, crear inmunotolerancia en el huésped en el que asienta, generar factores angiogénicos, invadir la membrana basal y por último, metastatizar a distancia.

1.1. Características generales

Se estima que se diagnostican cada año en Europa aproximadamente 40.000 nuevos casos de RCCs, los cuales son responsables de unas 20.000 muertes al año (Schöffski y cols., 2006). Los RCCs, en términos generales, suponen alrededor del 2-3% del total de los tumores diagnosticados en el adulto (Siegel y cols., 2015) y corresponden al 80-85% de todos los tumores malignos primarios del riñón (Kumar y cols., 2008). Su incidencia se incrementa con cada década de la vida hasta los 60 años y es más común (3:2) en hombres que en mujeres (Dayal y Wilkinson, 1989), así como en personas procedentes de países escandinavos y Norteamérica (Sachdeva y cols., 2009). Un tercio de los pacientes se diagnostica ya en una etapa avanzada de la enfermedad, con la presencia de metástasis a distancia y el 40% de los pacientes muere por la enfermedad (Kumar y cols., 2008). El RCC se ha considerado clásicamente resistente al tratamiento con quimioterapia y radioterapia.

Los RCCs derivan histológicamente de las células del epitelio tubular renal por lo que fundamentalmente se localizan en la corteza de este órgano (Eble y cols., 2004).

Como factores de riesgo del RCC se han descrito entre otros, la obesidad (Maclure y Willet, 1990), el tabaquismo (La vecchia y cols., 1990) y la exposición a diversos químicos industriales (Sharpe y cols., 1989); además los individuos que padecen enfermedad poliquística adquirida como consecuencia de someterse a diálisis crónica poseen un riesgo 30 veces mayor de sufrir RCC (Matson y Cohen, 1990).

La mayor parte de las neoplasias renales son esporádicas aunque un pequeño porcentaje son hereditarias, como aquellos carcinomas renales de células

claras asociados con la enfermedad de von Hippel-Lindau¹ (VHL). En todas las formas de neoplasias renales heredadas los tumores suelen ser diagnosticados a una edad más temprana y tienen mayor probabilidad de ser bilaterales y multifocales (Bodmer y cols., 2002).

1.2. Clasificación y tipos histológicos

El RCC cuenta con varios subtipos histológicos, cada uno de los cuales deriva de las distintas zonas del túbulo renal. Los tumores epiteliales renales más comúnmente encontrados son: carcinoma renal de células claras (60-75%), carcinoma renal papilar (15%), carcinoma renal de células cromóforas (5%) y oncocitomas (5%) (Motzer y cols., 1996).

Inicialmente, los RCCs fueron clasificados en base a patrones de crecimiento y características morfológicas distinguibles (Störkel y cols., 1997; Linehan y cols., 2003). Sin embargo, los recientes avances en el conocimiento de su morfología y pronóstico, así como sus características genéticas y moleculares, han llevado a una nueva clasificación de estos tumores, como muestra la Tabla 1 (Eble y cols., 2004).

¹ La enfermedad de VHL es un síndrome autosómico dominante caracterizado por hemangiomas de retina, CCRCCs y quistes renales múltiples, hemangioblastomas espinales y cerebelosos, feocromocitomas, tumores pancreáticos endocrinos y cistoadenomas del epidídimo en el hombre o del ligamento ancho en las mujeres. La prevalencia de la enfermedad es de aproximadamente 1 de cada 10.000 individuos, un 20-30% de los pacientes fallecen a causa de un carcinoma renal, generalmente por debajo de los 50 años (Maher y cols., 1990).

TABLA 1: Clasificación de los tumores renales (OMS 2004)

Cáncer renal familiar

Tumores de células renales

Malignos

- Carcinoma renal de células claras
- Carcinoma renal de células claras multilocular
- Carcinoma renal papilar
- Carcinoma renal de células cromóforas
- Carcinoma de los conductos colectores de Bellini
- Carcinoma renal medular
- Carcinomas con translocación Xp11
- Carcinoma asociado al neuroblastoma
- Carcinoma tubular mucinoso y de células fusiformes
- Carcinoma de células renales inclasificable

Benigos

- Adenoma papilar
- Oncocitoma

Tumores metanéfricos

- Adenoma metanéfrico
- Adenofibroma metanéfrico
- Tumores estromales metanéfricos

Tumores mixtos mesenquimales y epiteliales

- Nefroma quístico
- Tumor mixto mesenquimal y estromal
- Sarcoma sinovial

Tumores nefroblásticos

- Restos nefrogénicos
- Nefroblastoma
- Nefroblastoma quístico parcialmente diferenciado

Tumores neuroendocrinos

- Carcinoide
- Carcinoma neuroendocrino
- Tumores del neuroectodermo primitivo
- Neuroblastoma
- Feocromocitoma

Otros tumores

- Tumores mesenquimales
- Tumores hematopoyéticos y linfoides
- Tumores de células germinales
- Tumores metastásicos

1.2.1. Carcinoma renal de células claras

El carcinoma renal de células claras (CCRCC) comprende aproximadamente el 60-75% de todos los RCCs (Reuter y Presti, 2000). Los CCRCC habitualmente son solitarios y grandes cuando son sintomáticos, presentándose como masas esféricas de 3-15 cm de diámetro (Eble y cols., 2004). Este tumor presenta una profusa vascularización y se cree que deriva de las células epiteliales renales de los túbulos contorneados proximales de las nefronas. A la sección, son amarillos, anaranjados, o gris-blancuecinos, con áreas prominentes de reblandecimiento quístico o de hemorragia, sean recientes o antiguas. Están caracterizados por células tumorales con citoplasma claro (debido a la carga de lípidos y glucógeno), y un patrón de crecimiento acinar. El aclaramiento del citoplasma se extiende desde el núcleo a la membrana citoplasmática, especialmente en los tumores de bajo grado. En los de alto grado el citoplasma puede ser claro sólo parcialmente o ser mayoritariamente granular, es decir eosinofílico. Es importante buscar áreas de transición a bajo grado para establecer correctamente el diagnóstico. Estos tumores pueden adoptar una apariencia papilar o pseudopapilar focalmente pero esto es debido a cambios degenerativos más que a una verdadera formación papilar. Los bordes del tumor están bien definidos. Cuando el tumor aumenta de tamaño, puede invadir las paredes del sistema colector, extendiéndose a través de los cálices y pelvis hasta el uréter. Con mayor frecuencia invade la vena renal y crece como una columna sólida dentro de este vaso, extendiéndose a veces tan lejos como la vena cava inferior o la aurícula derecha (Eble y Young, 2007). En ocasiones, hay invasión directa en la grasa perirrenal y en la glándula suprarrenal.

Muchos investigadores han intentado establecer escalas de gradación para el CCRCC. En 1981 Fuhrman y cols. publicaron una clasificación de cuatro grados que mostró una buena correlación con el resultado clínico (Fuhrman y cols., 1982). Por un lado el grado I tiene núcleos pequeños ($< 7 \mu\text{m}$) e hipercromáticos sin nucleolo, y en el otro extremo el grado IV tiene núcleos pleomórficos y marcadamente agrandados con nucleolos prominentes e irregulares. Esta clasificación se ha mostrado muy útil en la predicción del comportamiento clínico en los CCRCC (Cheville y cols., 2003), no siendo de aplicación en el resto de carcinomas renales. Los tumores con cambio sarcomatoide son considerados de alto grado. El CCRCC tiene peor pronóstico que otros tipos comunes de RCC (Eble y Young, 2007).

La presencia de células claras no asegura el diagnóstico de CCRCC ya que una gran variedad de tumores renales pueden presentarlas (López, 2013); es necesario encontrar otras características. El CCRCC se caracteriza por la pérdida de material genético del brazo corto del cromosoma 3 (3p) y mutaciones en el gen *VHL*

(Carroll y cols., 1987). En pacientes con VHL dichas pérdidas y mutaciones están descritas en prácticamente todos los casos. Es interesante que dichas mutaciones somáticas/hipermetilaciones en la misma región se pueden encontrar en el 75-80% de los tumores esporádicos, unilaterales y focales (Zbar, 1995). Un gen *VHL* normal produce la proteína VHL (pVHL), que es necesaria para activar y degradar el factor inducible por hipoxia (HIF) en estados normoxémicos. En las células que sufren hipoxia o pérdida de la pVHL, HIF escapa de la degradación y activa en cascada al factor de crecimiento endotelial (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), el transportador de glucosa I (GLUT1) y a la anhidrasa carbónica IX (CA9) entre otros (Linehan y cols., 2003; Pantuk y cols., 2003; Bui y cols., 2003). Estos productos están implicados en el crecimiento y proliferación de la propia célula tumoral así como en el proceso de angiogénesis necesario para mantener el aporte de oxígeno y nutrientes que asegure la viabilidad y desarrollo tumoral. Por lo tanto la expresión en cascada de estos productos podría ser usada a nivel inmunohistoquímico como marcadores del CCRCC o como objetivo para nuevas terapias. Algunos de ellos son expresados heterogéneamente en el núcleo (HIF), o en el citoplasma (CA9, GLUT1, VEGF) de las células tumorales.

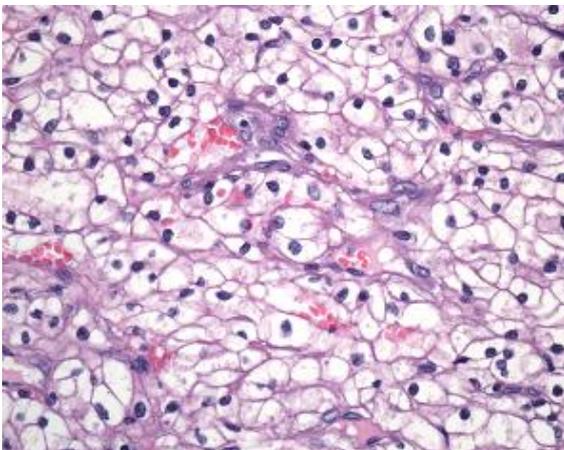


Figura 1: Microfotografía de un corte de CCRCC (H&E). 300X. (Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Cruces).

1.2.2 Carcinoma renal cromóforo

Bannash y cols. (1974) describieron el adenoma cromóforo como una rara forma de tumor renal que fue experimentalmente inducido mediante la inyección de nitrosomorfolina. Thoenes y cols. (1985) descubrió que este tipo de tumor estaba también presente dentro de los tumores renales humanos denominándolo carcinoma renal de células cromóforas (ChRCC). Algunos investigadores consideran que este tumor deriva de células intercalares del sistema de conductos colectores (Störkel y cols., 1989). Previamente al establecimiento de este concepto nosológico los ChRCCs estaban clasificados probablemente dentro de los CCRCCs convencionales y los oncocitomas; de hecho probablemente muchos de los casos descritos en el pasado como oncocitomas malignos actualmente se clasificarían como ChRCC.

Los ChRCCs suponen alrededor del 4-6% de todos los tumores renales (Thoenes y cols., 1988). La edad media de los pacientes al diagnóstico es de 53 años con un rango de edad de entre 30 y 83 años. Con frecuencia son diagnosticados en estadios tempranos (T1 o T2) (86%). No existe tendencia en cuanto a la predominancia por sexos (Crotty y cols., 1995). Macroscópicamente la superficie del corte es generalmente de color gris-beige. El tamaño medio es de 8,5 cm en un rango de 2,5-22 cm (Crotty y cols., 1995). La hemorragia o la necrosis pueden estar presentes y es común la fibrosis irregular. Los tumores están generalmente bien circunscritos y frecuentemente tiene una cápsula fibrosa, particularmente en los estadios precoces.

Histológicamente existen 2 variantes: convencional y eosinofílico. La variante convencional se caracteriza por un mosaico de células tumorales grandes y pequeñas dispuestas en grandes lóbulos separados por septos fibrovasculares con una arquitectura de patrón túbulo-cístico compacto, aunque también se ha observado patrón túbuloalveolar y/o quístico. El citoplasma es abundante y muestra un patrón reticular fino y traslúcido, encontrándose en él numerosas vesículas que le confieren una apariencia clara o reticular en las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina. La presencia de estas vesículas se demuestra mediante la microscopía electrónica. El borde citoplasmático es grueso, prominente y eosinofílico (Thoenes y cols., 1985, 1988). En la variante eosinofílica las células son más pequeñas y marcadamente eosinofílicas, (haciéndolo más fácilmente confundible con el oncocitoma), observándose frecuentemente un halo perinuclear.

En cuanto a los hallazgos histoquímicos e inmunohistoquímicos, generalmente las células tumorales del ChRCC muestran una reacción intensa y difusa a la tinción férrica coloidal de Hale debida a la acumulación de mucopolisacáridos en el citoplasma tiñéndolo de azul, aunque esta reacción no es

exclusiva del ChRCC, habiéndose observado diferentes intensidades y distribuciones de esta tinción en CCRCCs, carcinomas renales papilares (PRCC) y oncocitomas (DeLong y cols., 1996). Las células tumorales del ChRCC también se tiñen débilmente con el azul alcian. El contenido de glucógeno en el citoplasma tumoral es menor que en el CCRCC. La inmunohistoquímica demuestra positividad para las citoqueratinas 8, 18 y 19 y el antígeno epitelial de membrana (EMA) y negatividad para la vimentina (Thoenes y cols., 1985, 1988). Las tasas de positividad inmunohistoquímica para SHP2, vinculina, paxillina, osteopontina y CD9 son mayores para el ChRCC que en el CCRCC (Kuroda y cols., 2003). La cadherina-E es positiva (Taki y cols., 1999).

Ultraestructuralmente las células tumorales contienen numerosas microvesículas citoplasmáticas de 150 a 300 nm. Bonsib (1996) ha sugerido que el contenido de estas microvesículas son mucopolisacáridos ácidos. Las mitocondrias están presentes en la periferia del citoplasma tumoral y muestran predominantemente cristales túbulo-vesiculares y pudiendo presentar inclusiones electrodensas en su interior.

En el análisis cromosómico del ChRCC es característico un número bajo de cromosomas debido a la frecuencia de la pérdida combinada de los cromosomas 1, 2, 6, 10, 13, 17 y 21 (Kovacs y cols., 1988; Shuin y cols., 1996). La pérdida de los cromosomas 1 e Y es característica del ChRCC (Crotty y cols., 1992; Weiss y cols., 1995), lo que les hace presentar con mayor frecuencia un patrón nuclear hipodiploide e incluso un patrón aneuploide, mientras que la mayor parte de los CCRCC muestran un patrón nuclear diploide. Schwerdtle y cols. (1996), observó pérdida de heterocigosidad (LOH) de los cromosomas 1p, 2p, 6p, 10p, 13p, 17p, y 21p con una frecuencia del 73 al 91%.

Respecto al diagnóstico diferencial, la diferenciación histológica más importante es frente a los oncocitomas, pues comparten un origen similar y una morfología superponible (células intercalares del sistema de conductos colectores), además de compartir alteraciones en el ADN mitocondrial. Algunos autores han planteado ciertos problemas como la coexistencia de ambos tumores, denominada por algunos como "tumores híbridos" (Tickoo y cols., 1999), u oncocitomas atípicos (Pérez-Ordóñez y cols., 1997).

Los signos y síntomas clínicos más frecuentes son dolor o molestia en el flanco abdominal, hematuria macroscópica, masa palpable en el flanco y pérdida de peso. Son raros los pacientes con la tríada clásica de hematuria, molestia en el flanco y masa abdominal. Muchos de los tumores son detectados accidentalmente durante el estudio de otros problemas.

Respecto al pronóstico, la mayoría de los autores muestran que el ChRCC tiene mejor pronóstico que el CCRCC, mientras que otros sugieren que es prácticamente idéntico. La supervivencia a 5 años libre de enfermedad se mantiene por encima del 90% (Crotty y cols., 1995). Excepto para las series de Chevillie y cols. (2003), la mayoría de los estudios ha sugerido que presenta mejor pronóstico que el PRCC. Se han descrito algunos casos de ChRCC con transformación sarcomatoide, que en caso de ser significativa supone un peor pronóstico (Aizawa y cols., 1997). Los tumores grades (>de 8 cm. de diámetro) y aquellos en los que coexisten con PRCC causan metástasis con mayor frecuencia (Renshaw y cols., 1996).

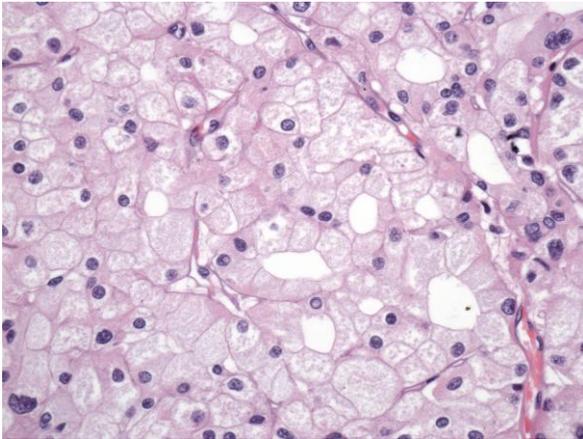


Figura 2: Microfotografía de carcinoma renal cromóforo. H&E. 400X. (Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Cruces).

1.2.3. Oncocitoma renal

Los oncocitomas renales (ROs) constituyen aproximadamente el 5-6% de las neoplasias renales. Originado probablemente en las células intercalares de la nefrona distal, se le relaciona histogenéticamente con el ChRCC. Aunque benignos, constituyen una categoría importante a considerar puesto que entran en el diagnóstico diferencial de otras neoplasias epiteliales renales malignas con citoplasma eosinofílico. Su proporción es 2:1 respecto a hombres y mujeres y se dan en adultos de entre 50 y 80 años de edad. La resección del tumor es curativa. El tumor no puede realmente ser distinguido radiológicamente de otros RCC, por ello la nefrectomía radical puede ser la decisión quirúrgica en muchos casos. Existe un gran número de pacientes que han tenido tumores multicéntricos o bilaterales (Mead y cols., 1990) y las tumorectomías conservadoras han tenido éxito cuando se realizan por estos motivos. Los ROs se caracterizan por células tumorales dispuestas en cordones, nidos o túbulos. El citoplasma es profundamente eosinofílico y el núcleo suele ser redondo o vesicular y contiene un nucleolo regular y prominente, con cromatina finamente granular (Tickoo y cols., 1998). Las características nucleares son bastante uniformes pero de manera ocasional pueden verse grupos de células con marcado hipercromatismo y pleomorfismo. Estas características están acompañadas frecuentemente por un incremento en el citoplasma y nunca están asociadas a actividad mitótica, de hecho muy raramente se encuentra actividad mitótica en un oncocitoma. No se suele observar necrosis tumoral. Una cicatriz estrellada y central se considera característica de este tipo de tumor, aunque esta característica se puede encontrar en otros tumores renales de bajo grado, por lo que se considera como un signo de lento crecimiento más que como una característica de un tipo específico de tumor. Microscópicamente esta cicatriz está compuesta de tejido conectivo hialino denso que contiene ocasionalmente células tumorales intercaladas. Las células tumorales pueden infiltrar el tejido blando perirrenal.

La práctica totalidad de los oncocitomas presentan un comportamiento benigno, únicamente unos cuantos casos han presentado metástasis y no se conocen muertes directamente atribuidas a este tumor. La microscopía electrónica muestra un citoplasma cargado de mitocondrias (Tickoo y cols., 2000), este hecho es el causante de la eosinofilia citoplasmática y el marrón caoba intenso macroscópico.

Genéticamente los oncocitomas muestran comúnmente pérdida de los cromosomas 1 e Y y unos cuantos casos muestran una translocación que afecta al cromosoma 11. Algunos investigadores han sugerido que mutaciones en el ADN

mitocondrial podrían conducir a una proliferación mitocondrial incrementada, y posiblemente a la proliferación de células neoplásicas.

Recientemente se ha descrito un grupo de pacientes con múltiples lesiones oncóticas ("oncocitosis"), algunos de ellos con características híbridas como morfología a medio camino entre el oncocitoma y el ChRCC, sugiriendo que estos tumores podrían estar genéticamente relacionados. Así, los ChRCCs podrían representar una progresión genética/morfológica de los oncocitomas. Es probable que muchos sino todos esos pacientes pertenezcan a familias con el síndrome de Birt-Hogg-Dubé².

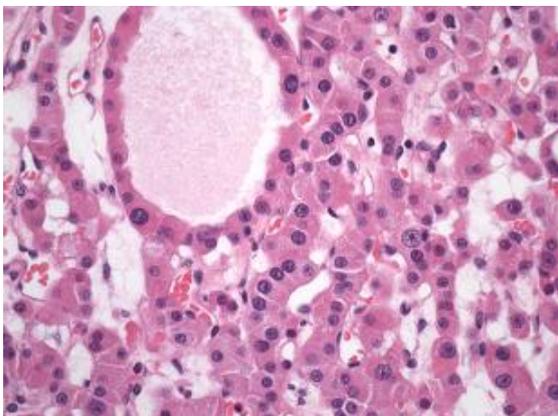


Figura 3: Microfotografía de un oncocitoma renal. H&E. 400X. (Departamento de Anatomía Patológica. Hospital universitario de Cruces).

1.3. Sintomatología, diagnóstico y pronóstico de los RCCs

Los carcinomas renales tienen un comportamiento y una evolución clínica impredecibles. En el 25-30% de los casos, el tumor no presenta manifestación clínica, y se halla casualmente en el transcurso de estudios radiológicos por otras causas (Bulnes y cols., 2008). En muchos individuos, puede suceder que el tumor primario permanezca silente y asintomático y su existencia se descubra tras la metástasis, localizada preferentemente en pulmones y huesos (Kumar y cols., 2008).

En el 10% de los casos, la tríada de hematuria indolora, dolor sordo en el costado y masa abdominal palpable son signos característicos de esta enfermedad, y son un reflejo del avance de la misma. De estas características la más frecuente

² El síndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHD) está relacionado con tumores renales multifocales y bilaterales. Este síndrome autosómico dominante se caracteriza por lesiones cutáneas (fibrofoliculomas, tricodiscomas y acrocordones), neumotórax espontáneos, bronquiectasias y broncoespasmo, neoplasias de colon y lipomas, que suceden junto con los tumores renales (Khoo y cols., 2002; Pavlovich y cols., 2002).

es la hematuria, que ocurre en más del 50% de los casos. Cuando se produce esta hematuria macroscópica tiende a ser intermitente y pasajera, generalmente superpuesta a una hematuria microscópica continuada (Bulnes y cols., 2008). El dolor en el costado aparece en el 40% de los enfermos. En el 25% de los RCCs, el tejido tumoral crece, y cuando se ha hecho lo suficientemente grande, produce una masa palpable en el costado, con lo que el tumor puede manifestarse simplemente en virtud de su tamaño.

Entre otros signos y síntomas, cabe destacar la secreción de sustancias relacionadas con el sistema hormonal, que pueden generar síndromes paraneoplásicos como hipercalcemia, hipertensión, síndrome de Cushing, feminización o masculinización. Estos síntomas o anormalidades bioquímicas suelen remitir tras el tratamiento exitoso del tumor primario o foco metastático (Sachdeva y cols., 2009).

En cuanto al diagnóstico anatomopatológico, los patólogos se suelen encontrar con un escenario en ocasiones confuso, debido a la existencia de casos en los que es muy difícil, si no imposible, realizar un diagnóstico diferencial (López y cols., 2008). Otro aspecto histológico que condiciona esta confusión es la poca atención que ha recibido hasta la fecha el fenómeno de heterogeneidad intratumoral que es consustancial al cáncer y que en el RCC está poco estudiado. Estudios muy recientes indican que el CCRCC es un tumor con una alta variabilidad intratumoral no siempre detectada por los patólogos en sus estudios protocolizados morfológicos (López y cols. 2012, López y cols, 2013, López y cols 2013).

Dentro de los RCC, hay dos factores determinantes a la hora de predecir el pronóstico de la enfermedad. Por una parte, el hecho de que en ocasiones la enfermedad curse de forma asintomática puede dificultar el diagnóstico temprano de la misma. Por otra parte, tal y como se ha descrito previamente, la malignidad de los tres tipos tumorales más frecuentes se mueve en un intervalo muy amplio de posibilidades.

Avances significativos en el diagnóstico, estadificación y tratamiento de los pacientes con RCCs en los últimos 20 años han producido mejoras en la supervivencia de grupos seleccionados de pacientes y un cambio global en la historia natural de la enfermedad. A pesar de los avances en terapias biológicas e inmunes, las tasas de respuesta para los RCCs metastásicos se mantienen en torno al 15% a 30 % aproximadamente. Los progresos significativos ocurridos en los últimos años en las ciencias básicas han conducido a un mayor conocimiento de la genética molecular del RCC, manteniendo la esperanza de incrementar la sofisticación en los métodos de diagnóstico temprano, manejo clínico y estrategias

de tratamiento. Mejorar las herramientas para predecir la supervivencia de los pacientes permitiría mejorar la selección de éstos para terapias sistémicas.

El sistema de estadificación TNM es el más extendido actualmente para el RCC. Sin embargo nuevas modalidades han emergido en un intento de mejorar el pronóstico combinando otras variables patológicas y clínicas (Tabla 2). La estadificación y gradación tumorales y el estado de salud del paciente representan los factores predictivos clínicos más útiles para el pronóstico del paciente con RCC. Los factores predictivos son esenciales para la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo de utilidad clínica para establecer expectativas de pronóstico, para implantar modalidades selectivas de tratamiento y para determinar los criterios de inclusión en los ensayos clínicos. La reciente identificación y potencial incorporación de marcadores moleculares tumorales se espera que revolucionen la estadificación del RCC (Tabla 2).

TABLA 2: Factores anatómicos, histológicos, clínicos y moleculares que han demostrado ser indicadores pronóstico (Lam y cols., 2005)

Anatómicos	Histológicos	Clínicos	Moleculares
Tamaño tumoral	Grado tumoral	Estado de salud general	Inducibles por hipoxia
Extensión tumoral	Subtipo histológico	Síntomas localizados	CA IX CA XII CXCR4 VEGF
Afectación adrenal	Características sarcomatoides	Caquexia	IGF-1
Afectación venosa	Necrosis histológica	Recuento plaquetario	Proliferación KI-67
Afectación nodular linfática	Invasión del sistema colector		Regulación del ciclo celular P53 Bcl-2 PTEN
Metástasis a distancia			Ciclina A p27
			Adhesión celular EpCAM EMA E-Cadherina α -Catenina Cadherina-6
			Miscelánea Gelsolina Vimentina CA 125 CD 44 Receptores androgénicos Caveolina-1 VEGFR

1.4. Marcadores tumorales en neoplasias renales

Los marcadores tumorales son sustancias relacionadas con la ausencia o presencia de un tumor. Estas sustancias se encuentran tanto a nivel celular como en los líquidos biológicos, generalmente en el plasma o en el suero. Su naturaleza molecular es muy heterogénea, pero los más comunes tienen función hormonal o enzimática, y en ocasiones presentan características antigénicas.

La clasificación de los marcadores tumorales es compleja y existen diferentes criterios para llevarla a cabo, si bien dentro de este grupo de moléculas aparecen descritas un gran número de enzimas, entre las que cabe destacar aquellas que tienen la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos, las *peptidasas*.

En relación con las neoplasias renales, son distintas las moléculas empleadas como marcadores de diagnóstico y pronóstico e incluso propuestas como dianas terapéuticas (Tabla 3). Por ejemplo, las citoqueratinas, la anhidrasa carbónica, claudinas 7 y 8, la parvalbúmina, etc. (Truong y Shen, 2011). En cuanto a las *peptidasas*, algunas son actualmente empleadas como marcadores celulares y tumorales del riñón, tanto a nivel de investigación básica como en la práctica clínica. Entre otras, la endopeptidasa neutra (NEP/CD10 o neprilisina) es un marcador diagnóstico de neoplasias renales de nefrona proximal (Pan y cols., 2004).

Las enzimas que se seleccionaron para el presente trabajo de tesis doctoral - la enzima convertidora de angiotensina (ACE), la enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE2) y la aminopeptidasa A (APA)- son proteínas altamente expresadas en el riñón, en algunos casos con funciones reconocidas (Kobori y cols., 2007), y que podrían ser marcadores potenciales de neoplasias renales (Deshayes y Nahmias, 2005). Como forman parte de la amplia familia de las *peptidasas*, en el próximo punto se realizará una descripción general de las peptidasas, se resumirán las características de estas 3 enzimas, y se explicará el papel que las peptidasas desempeñan en condiciones normales y en la biología del cáncer.

TABLA 3: Marcadores moleculares potenciales en el carcinoma de células renales (Lam y cols., 2005)

Inducibles por hipoxia	Proliferación	Regulación del ciclo celular	Adhesión celular	Miscelánea
CAIX	Ki-67	p53	EpCAM	Gelsolina
CAXII	PCNA	bcl-2	EMA	Vimentina
CXCR-4	Ag-NORs	PTEN	E-cadherina	CA-125
HIF-1 α		Ciclina A	α - catenina	CD44
VEGF		Akt	Cadherina-6	Receptores androgénicos
IGF-I		S6 kinasa		Caveolina
		p27		VEGF-R
				Subunidades ATPasa Na ⁺ /K ⁺
				Poliploidía en ADN

2. Enzimas proteolíticas: descripción general de las peptidasas

Las peptidasas son una pieza clave en los diversos sistemas peptídicos que hoy conocemos, ya que su función es la de convertir (activando o inactivando) los péptidos bioactivos que, como iremos detallando a lo largo de esta introducción, son fundamentales para la comunicación celular que permitirá el correcto funcionamiento de nuestro organismo.

2.1. Clasificación y nomenclatura

Las peptidasas constituyen un grupo muy heterogéneo de enzimas, que pueden encontrarse tanto unidas a membrana como en las fracciones solubles y que pueden presentar tamaños entre 25 y 300 kDa (Taylor, 1993). Por todo ello, no es de extrañar que su clasificación y nomenclatura sea una tarea compleja, que haya ido variando según se ha profundizado en su conocimiento.

En cuanto a la terminología, hay que tener en cuenta que esta ha sido confusa, ya que en ocasiones se han empleado nombres diferentes para referirse a la misma enzima.

Históricamente, los términos proteasa, proteinasa y peptidasa han tenido significados ligeramente diferentes. En la actualidad, a pesar de que algunos autores recomiendan el empleo del término "enzima proteolítico" como el más adecuado y fácilmente entendible, desde el NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) se recomienda el empleo del término "peptidasa" para referirse a todas aquellas enzimas que rompen enlaces peptídicos. Los miembros de este grupo de proteínas se clasifican en exopeptidasas y endopeptidasas, en función de la situación del enlace que hidrolizan.

Así, las exopeptidasas rompen el enlace peptídico del último, o de los últimos 2 ó 3 aminoácidos de la cadena. Si su actuación tiene lugar en el extremo amino terminal se denominan *aminopeptidasas*, *dipeptidil-peptidasas* o *tripeptidil-peptidasas*, respectivamente. Si la hidrólisis sucede en el extremo carboxilo terminal, las enzimas serían *carboxipeptidasas*, o *peptidil-dipeptidasas*. El término *dipeptidasa* hace referencia a exopeptidasas específicas para hidrolizar el enlace peptídico de los dipéptidos. Por último, las *omega-peptidasas* son enzimas que eliminan residuos terminales que son sustituidos, ciclados o unidos por enlaces isopeptídicos (uniones peptídicas formadas por grupos diferentes al α -amino y α -carboxilo).

Las endopeptidasas catalizan la ruptura de enlaces peptídicos dentro de la cadena, y se clasifican en base a su mecanismo catalítico. Es decir, según la

naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis. Así, dentro de este grupo se describen las *aspartil-endopeptidasas*, las *cisteinil-endopeptidasas*, las *metaloendopeptidasas*, las *seril-endopeptidasas*, las *treonil-endopeptidasas*, y en un último grupo se englobarían aquellas que aún no han sido clasificadas ("*unclassified-endopeptidasas*").

Una posible clasificación de estas enzimas proteolíticas es la propuesta por Marks y cols. (1974, 1968a, 1968b), basada en la afinidad por diferentes sustratos cromogénicos. Según esta clasificación, las aminopeptidasas se agruparían en ácidas, básicas y neutras, dependiendo de que actuaran sobre sustratos ácidos, básicos o neutros, respectivamente. Por otro lado, también se ha nombrado a las peptidasas dependiendo del péptido sobre el que actúan. Así, podrían describirse peptidasas degradadoras de encefalinas, de TRH (hormona liberadora de tirotrina), o de angiotensinas, entre otras.

En los años 90, se establecieron las bases de un sistema de clasificación según las secuencias y estructuras de las peptidasas, empleando la riqueza de nuevos datos disponibles. De esta clasificación surgió la base de datos *MEROPS*, que desde 1996 constituye en Internet una fuente referencial con datos de todas las peptidasas. Esta base de datos establece una clasificación jerárquica construida sobre los conceptos de *Tipo Catalítico*, *Clan*, *Familia* y *Peptidasa* (Barret y cols., 2004).

En un primer paso, las peptidasas se agrupan según el *Tipo Catalítico*, es decir la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis anteriormente mencionados, de los cuales tomarían la letra mayúscula inicial (A, C, M, S, T, U) de la clasificación. A continuación las peptidasas se agrupan en clanes o familias, atendiendo a grupos de peptidasas homólogas.

Cada *Clan* agrupa una o varias *Familias*, con un origen común. El nombre del *Clan* viene determinado por una segunda letra mayúscula, que no se reutiliza en caso de desaparecer el *Clan* en posteriores reorganizaciones de la clasificación. No todas las *Familias* pueden clasificarse en *Clanes*.

Las *Familias* se agrupan por homología con el miembro más representativo del grupo, en base a la unidad peptidásica. La *Familia* aporta un número secuencial a la nomenclatura. Este número tampoco se reutiliza. Por último, cada peptidasa tiene un identificador único, con 2 partes separadas por un punto (·). Aunque existen diversas clasificaciones, las aportadas por la *Enzyme Commission* (EC), son las aceptadas actualmente. En esta clasificación las peptidasas se encontrarían dentro del grupo E.C. 3.4, que hace referencia a las hidrolasas que actúan sobre enlaces peptídicos. La subclasificación posterior estaría de acuerdo con la

nomenclatura anteriormente mencionada, propuesta por Rawlings y Barrett en 1995 y 1999.

2.2. Peptidasas analizadas en este trabajo (Tabla 4)

2.2.1. Enzima convertidora de angiotensina (ACE)

La ACE (*angiotensin-converting enzyme*) forma parte de una gran familia de *metalopeptidasas* que contienen zinc en su grupo prostético (Corvol y cols., 2004). Existen dos isoformas de esta enzima, la *ACE somática* de 170 kD y la *ACE germinal* (testicular), ambas codificadas por el gen *ACE* situado en el brazo largo del cromosoma 17. Este es un gen que contiene un polimorfismo inserción/delección cuyas variantes pueden afectar a la actividad de la proteína codificada y que han sido relacionadas con el riesgo a padecer diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer (Ruiter y cols., 2011). El pH óptimo de la ACE es de 8, se activa por cloro y es inhibida por priles (captopril, enalapril, lisinopril, etc.), sustancias muy utilizadas en la farmacoterapia cardiovascular (Corvol y cols., 2004).

La ACE, también conocida como *peptidil-dipeptidasa A*, hidroliza péptidos en su extremo carboxilo terminal desde donde libera dipéptidos. El sustrato natural mejor conocido de la ACE es la *angiotensina I* (10 aminoácidos), que la enzima convierte en *angiotensina II* (8 aminoácidos), péptido bioactivo con importantes acciones sobre el sistema vascular y el balance hidroelectrolítico. Otro de los sustratos naturales de la ACE, la *bradiquinina*, con propiedades sobre el músculo liso vascular y bronquiolar, es hidrolizada e inactivada por esta peptidasa. También se ha descrito que la ACE es capaz de actuar como endoenzima sobre la sustancia P, hormona luteotropa (LHRH), colecistoquinina-8, encefalinas, etc. (Corvol y cols., 2004).

La forma somática de ACE, a la que nos referiremos a lo largo de esta tesis, se encuentra en el endotelio vascular y el epitelio de diferentes órganos y también en el sistema nervioso, a nivel neuronal (Bader y Ganten, 2008). En el riñón humano, la ACE se expresa, y de forma abundante, en el túbulo proximal (Metzger y cols., 1999), donde podría ejercer importantes acciones a nivel local (Kobori y cols., 2007). Por su localización subcelular, unida a la membrana citoplásmica y con su extremo c-terminal a nivel intracelular, forma parte de las *glucoproteínas de membrana tipo I* (Guy y cols., 2005). Sin embargo, se sabe que es liberada a la sangre (y otros fluidos corporales) por la acción de secretasas, donde es analizada para el diagnóstico de enfermedades como la sarcoidosis (Corvol y cols., 2004).

2.2.2. Enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE2)

Esta zinc metalopeptidasa fue descubierta a comienzos de la década pasada por dos grupos diferentes (Donogue y cols., 2000; Tipnis y cols., 2000). Su gen (ACE2) se sitúa en el brazo corto del cromosoma X, que codifica una enzima de 90 kD, por lo tanto más pequeña que su homóloga ACE. El pH óptimo de la ACE2 es de 6.5, se activa por cloro y es inhibida por quelantes tipo EDTA y por fármacos como el DX600 (de uso para investigación). Los inhibidores de la ACE, como el captopril y homólogos, no inhiben la ACE2 (Danilczyk y cols., 2004).

La ACE2 hidroliza péptidos por su extremo amino. El sustrato natural sobre el que mayor afinidad posee es la angiotensina II, que convierte en angiotensina 1-7, péptido vasoactivo con propiedades opuestas a la angiotensina II (Kobori y cols., 2007). También tiene afinidad, pero menos, sobre la angiotensina I, y otros neuropéptidos como la [Des-Arg]⁹-bradiquinina, neurotensina y dinorfina (Danilczyk y cols., 2004; Lambert y cols., 2008).

Respecto a su localización tisular en humanos, esta peptidasa ha sido descrita también en el endotelio, músculo liso y epitelio de tejidos como el corazón, mucosa nasal y oral, aparato digestivo y pulmón (Hamming y cols., 2004). En el riñón humano, la ACE2 está presente con diferente intensidad a nivel tubular proximal (densidad alta) y distal, en el glomérulo y en los vasos (Lely y cols., 2004). A nivel subcelular, la ACE2 aparece unida a la membrana citoplásmica (*glucoproteína de membrana tipo I*) (Guy y cols., 2005).

2.2.3. Aminopeptidasa A (APA)

Identificada por primera vez en el riñón de roedores (Glenner y cols., 1962), esta zinc metalopeptidasa es una enzima homodimérica con un peso molecular de 140-160 kD (Vezeux y cols., 1996; Wang y Cooper, 2004), cuyo gen (*ENPEP*) se encuentra en el brazo largo del cromosoma 4 en humanos. Se activa por el calcio y se inhibe por quelantes como EDTA y EGTA. Su pH óptimo es de 7.2.

La APA se caracteriza por catalizar la hidrólisis de péptidos que contienen residuos glutamilo y aspartilo en sus extremos amino, razón por la que se la conoce como aminopeptidasa A (ácida), o como glutamilo aminopeptidasa al tener mayor afinidad por derivados glutamilo en ensayos enzimáticos (Glenner y cols., 1962; Wang y Cooper, 2004). El sustrato natural mejor conocido de la APA es la angiotensina II, que la convierte en angiotensina III, por lo que es conocida también como *angiotensinasa* (Wolf y cols., 1997).

La APA está ampliamente distribuida en nuestros tejidos, habiendo sido descrita en células sanguíneas, timo, pulmón, intestino, páncreas, hígado, placenta, etc. (Li, 1993). El riñón humano es un órgano muy rico en esta enzima, donde también se la conoce como *antígeno de diferenciación gp160* (Nanus y cols., 1993; Bander y cols., 1985). La APA participa en el desarrollo de este órgano (Dijkman y cols., 2006), y en el riñón maduro se expresa en el glomérulo y en el epitelio tubular (Nanus y cols., 1993; Bander y cols., 1985). A nivel celular, siempre se ha descrito como *glucoproteína de membrana tipo II*, es decir, asociada a la superficie celular y con el extremo amino situado dentro de la célula (Nanus y cols., 1993). Sin embargo, varios autores han demostrado actividad de APA en la fracción soluble en diferentes tejidos (Martínez y cols., 1999; Ramírez-Expósito y cols., 2000; Ramírez y cols., 2008).

Tabla 4: Clasificación jerárquica de las peptidasas objeto de estudio. Tomado de *IUBMB Biochemical Nomenclature home page* (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Los nombres que aparecen en cada lista corresponden a diferentes denominaciones con las que se pueden encontrar citadas dichas enzimas en la bibliografía.

Tipo	Clan	Familia	Nº EC	Enzima
M	MA	M1	3.4.1 1.7	Aminopeptidasa A (APA) , glutamil-aminopeptidasa, angiotensinasa, aspartato aminopeptidasa, glucoproteína (gp)160, antígeno BP-1 de linfocitos B (ratón), angiotensinasa A2.
		M2	3.4.1 5.1	Enzima convertidora de angiotensina (ACE) , dipeptidil-carboxipeptidasa I, peptidil-peptidasa A, peptidil-dipeptidasa, quininasa II, peptidil-peptidasa I, peptidil peptidasa endotelial, peptidil-dipeptidasa-4, peptidil-dipéptido hidrolasa, CD143.
		M2	3.4.1 7.23	Enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE2) , hACE2, Tmem27.

2.3. Funciones de las peptidasas

2.3.1. Las peptidasas como enzimas convertidoras de péptidos bioactivos

La comunicación entre células es una condición indispensable para el funcionamiento coordinado de cualquier organismo. Esta comunicación se realiza principalmente mediante tres sistemas: el sistema hormonal, el sistema nervioso y los mediadores celulares. Los péptidos bioactivos son moléculas mensajeras empleadas por estos tres sistemas. Este tipo de moléculas se caracterizan por su ubicuidad, habiendo sido descritas en tejidos de todos los reinos de seres vivos, y por sus secuencias cortas de aminoácidos que pueden encontrarse libres o encriptadas en proteínas. Estos últimos requerirían la hidrólisis enzimática para su liberación (Sumitomo y cols., 2005; Ansorge y Reinhold, 2006; Daffre y cols., 2008). La acción conjunta de estos péptidos bioactivos con las enzimas y receptores involucrados forman los diferentes sistemas peptídicos, de vital importancia en la comunicación celular (Turner, 1986; 1987).

El control peptídico es un fenómeno altamente complejo, y a la vez flexible y aplicable al control de muy diversas funciones fisiológicas y en tipos celulares muy distintos. La función biológica más conocida de las peptidasas es la conversión de péptidos bioactivos. Gracias a su actividad hidrolítica las peptidasas pueden modular las funciones de los mensajeros peptídicos, produciendo tanto formas activas, como inactivas (Antczak y cols., 2001).

La mayor parte de estudios realizados sobre peptidasas y modulación de péptidos bioactivos se han realizado en el campo de la neurociencia. Sin embargo, el mayor hito de interés clínico tuvo lugar con el descubrimiento del efecto hipotensor de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACEi o iECA), que interferían en el sistema renina angiotensina inhibiendo la producción de angiotensina II (Ondetti y cols., 1977).

Son muchos los péptidos que aún siendo denominados neuropéptidos ejercen su acción también en órganos y tejidos distintos al sistema nervioso central. Por ejemplo, además de las angiotensinas, están la sustancia P, la bradiquinina, los péptidos opioides, etc. (Hallberg y cols., 2004). Probablemente esta sea una de las razones por las que las peptidasas se encuentren ampliamente distribuidas en nuestros tejidos (Taylor, 1993).

En cuanto a su localización celular y función, clásicamente se ha descrito que las responsables de la conversión de péptidos bioactivos son las peptidasas de superficie celular o ectopeptidasas (Turner, 1986; 1987). Estas, tienen el centro

catalítico dirigido hacia el exterior de la célula, regulando así las funciones de estos mensajeros peptídicos (Turner, 1986; 1987; Taylor, 1993).

2.3.2. Acciones intracrininas de las peptidasas

Las enzimas proteolíticas no sólo se localizan en la superficie celular sino que también se encuentran en forma soluble en el citosol, en el espacio extracelular, en la sangre y en otros fluidos corporales (Mantle, 1992; O'Cuinn, 1998; Gil y cols., 2001; Irazusta y cols., 2004; Valdivia y cols., 2004; Larrinaga y cols., 2005). Actualmente, existen varias hipótesis que explican la función que las peptidasas pueden ejercer desde sus diferentes localizaciones (Figura 4).

Por un lado, se ha descrito que tanto las formas unidas a la membrana como las formas solubles intracelulares pueden ser secretadas al exterior, donde también actuarían sobre péptidos (Balogh y cols., 1998; Shrimpton y cols., 2002). Por otro lado, hasta hace poco se pensaba que la función de las peptidasas en el interior de las células se limitaba a la última etapa del catabolismo proteico (Mantle, 1992; O'Cuinn, 1998). Así, y dado que la acción de los péptidos bioactivos ocurre en la superficie celular, las peptidasas citosólicas no tomarían parte en su regulación metabólica, salvo que se secretaran al exterior.

Sin embargo, en la última década, se ha descrito que además de la función endocrina, paracrina y autocrina, estos mensajeros peptídicos podrían tener funciones dentro de la propia célula. Según algunos autores, muchos péptidos podrían actuar en el interior de la misma célula donde son sintetizados. Estos péptidos, mediante su unión a receptores intracelulares, regularían por acción *intracrina* funciones como el crecimiento celular (Re, 2002; 2003; Re y Cook, 2006). En este sentido, algunos autores sugieren que las angiotensinas podrían regular intracrinamente el crecimiento de diferentes tejidos (Kumar y cols., 2007). Siendo esto así, las peptidasas intracelulares podrían ejercer una regulación intracrina de estos péptidos y del crecimiento celular (Ferro y cols., 2004).

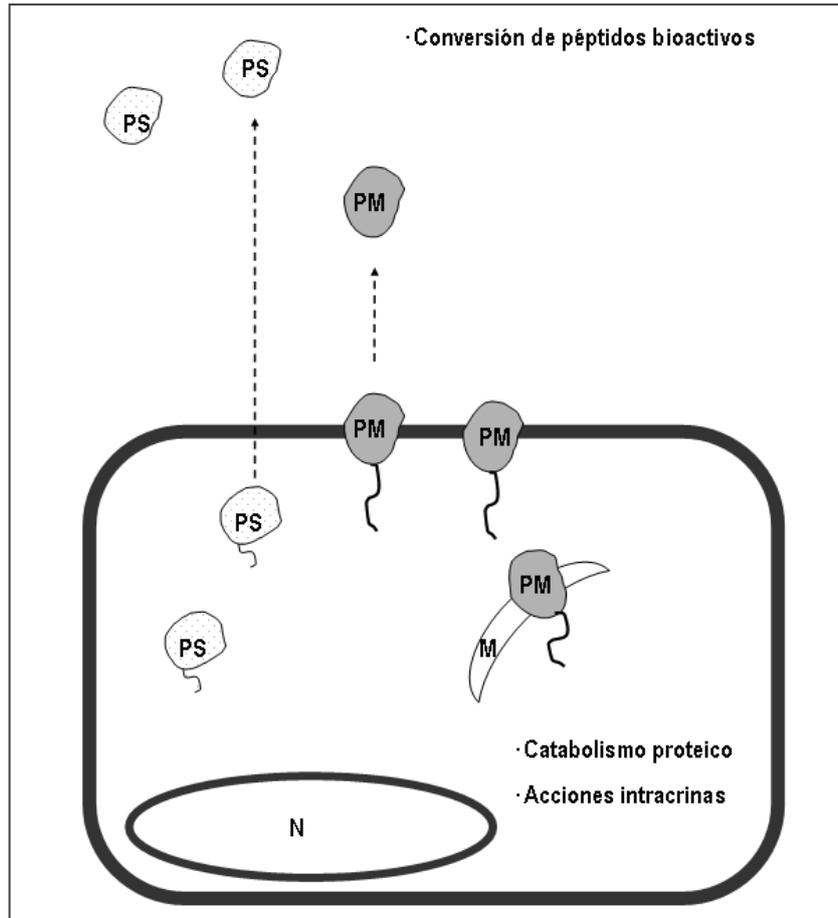


Figura 4: Representación gráfica de las diferentes localizaciones de las peptidasas y sus funciones en estos lugares. PM: peptidasa anclada a la membrana; PS: peptidasa soluble, tanto citosólica como secretada al espacio extracelular; N: núcleo y M: membrana citoplasmática.

2.3.3. Otras acciones de las peptidasas

Más allá de su acción sobre péptidos bioactivos y gracias a su actividad catalítica, la acción de las peptidasas también forma parte de los procesos que conllevan a la degradación de la matriz extracelular. Así, se ha comprobado que tienen importancia en el desarrollo de nuevos tejidos, en la inflamación y, como veremos posteriormente, en procesos neoplásicos (Carl-McGrath y cols., 2006).

Dentro de las acciones independientes de su actividad catalítica, se ha descrito que algunas peptidasas tienen función receptora. La estructura de diferentes peptidasas de superficie celular contiene dominios intracitoplasmáticos de pocos aminoácidos (Riemann y cols., 1999; Sumitomo y cols., 2005). De esta forma, peptidasas como la ACE, ACE2, la endopeptidasa neutra (NEP/CD10) o la aminopeptidasa N (APN/CD13) podrían dar lugar a señales intracelulares mediante la interacción con diferentes moléculas, condicionando funciones como el

crecimiento y la migración celular (Antczak y cols., 2001; Nanus, 2003; Sumitomo y cols., 2005; Fleming, 2006; Lambert y cols., 2010).

Las peptidasas también pueden ejercer su función como moléculas de adhesión, proceso vital en el reconocimiento celular y necesario en fenómenos como la migración celular (Riemann y cols., 1999; Antczak y cols., 2001; Carl-McGrath y cols., 2006; Pro y Dang, 2004).

2.4. Papel de las peptidasas en la biología tumoral

2.4.1. Péptidos y peptidasas en la biología tumoral

La acumulación de mutaciones en la célula da lugar a diferentes alteraciones moleculares, y como consecuencia pueden generar la aparición de un tumor, su desarrollo y diseminación. Estas alteraciones moleculares permiten a las células neoplásicas adquirir ciertas capacidades que garantizan su autonomía, lo que se conoce como los "hitos" del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000). Por un lado, son capaces de producir sus propias señales de crecimiento y de responder de un modo especial a las señales enviadas por las células del entorno. Por otro lado, son capaces de huir de la muerte celular programada (apoptosis) y adquirir un potencial de multiplicación ilimitado. A esto se le suma la capacidad de crear vasos nuevos (angiogénesis) y de invadir tejidos a nivel local o a distancia. Por ello, de cualquier tejido pueden surgir células tumorales con capacidad para crecer y sobrevivir de forma autónoma (Hanahan y Weinberg, 2000; Carl-McGrath y cols., 2006).

En este proceso son fundamentales distintas moléculas, tales como citoquinas, hormonas y factores de crecimiento. Muchas de estas moléculas son péptidos que por su acción autocrina, paracrina e intracrina se han visto relacionados con las distintas etapas del desarrollo tumoral. Las células tumorales son capaces de producir nuevos factores peptídicos o aumentar su concentración para garantizar su crecimiento (Heasley, 2001; Re y Cook, 2006). Además, también son capaces de aumentar la sensibilidad hacia estos factores o de provocar resistencias hacia péptidos inhibidores del crecimiento. Estas acciones pretenden generar bucles que favorezcan la proliferación celular (Hanahan y Weinberg, 2000). Entre los péptidos relacionados con el desarrollo de neoplasias podemos encontrar angiotensinas, cininas, opioides, endotelina-1, bombesinas, etc. algunas de las cuales son sustratos naturales de las enzimas seleccionadas para este trabajo. Por lo tanto sería de esperar que las peptidasas, incluidas las de esta tesis, desempeñaran un papel relevante en la regulación de péptidos bioactivos dentro del

microambiente tumoral (Deshayes y Nahmias, 2005; Ino y cols., 2004; Sumitomo y cols., 2005; Cassoni y Bussolati, 2006; Tallant y cols., 2006).

2.4.2. Modelo de regulación peptidásica

Para entender el posible papel de las peptidasas y péptidos bioactivos dentro de esta patología, algunos autores han propuesto el que viene siendo denominado "modelo de regulación peptidásica" (Antczak y cols., 2001; Nanus, 2003; Carl-McGrath, 2006). Según este modelo, la función de las enzimas está aumentada o disminuida dependiendo del tipo tumoral del que se trate. Ambas situaciones pueden desencadenar fenómenos neoplásicos. Así, cuando se produce la pérdida de la expresión o de la función de una peptidasa concreta, pueden aparecer procesos tumorales si el sustrato que hidroliza estimula el crecimiento celular, promueve la supervivencia celular o/y estimula la angiogénesis. También podría desarrollarse un tumor si el sustrato es el precursor de un péptido inhibidor de estos procesos. En el caso contrario, cuando una célula tumoral aumenta la expresión, o simplemente expresa una peptidasa, puede dar lugar a procesos tumorales si su sustrato es un péptido inhibidor del crecimiento celular o si es el precursor de un péptido que favorece el desarrollo tumoral (Antczak y cols., 2001; Nanus, 2003; Carl-McGrath, 2006).

A pesar de que los factores que deben tenerse en cuenta para entender el papel de las peptidasas en la carcinogénesis son numerosos, este modelo de regulación puede ser útil para relacionar a los péptidos y a las peptidasas con los procesos neoplásicos. Por ejemplo, se ha descrito que la angiotensina II estimula el desarrollo de células tumorales, la migración celular y la angiogénesis en el adenocarcinoma de páncreas, entre otros (Arafat y cols., 2007; Zhou y cols., 2009). Según algunos autores esta acción está mediada por el aumento de expresión de la ACE en esta neoplasia, que produciría un aumento de los niveles de ang II en el microambiente tumoral (Arafat y cols., 2007). A su vez, esta acumulación de ang II también estaría mediada por los marcados descensos en la expresión de ACE2, enzima que convierte la ang II en angiotensina 1-7 (Zhou y cols., 2009).

Sin embargo, es importante tener presente que cada tumor puede expresar las mismas peptidasas de un modo diferente. Así, en estudios realizados en tumores ginecológicos, se ha descrito que la expresión de APA aumenta en el cáncer de cérvix uterino, no varía en el carcinoma de ovario y endometrio, mientras que en el coriocarcinoma su expresión se regula a la baja (Ino y cols., 2004). Por otro lado, la mayor parte de las peptidasas tienen afinidad por más de un sustrato natural, como hemos visto anteriormente en la descripción de la ACE, ACE2 y APA. Además, los

péptidos producidos y segregados en el microambiente de cada tumor no tienen por qué ser los mismos, ni aparecer en las mismas concentraciones, ni siquiera tener el mismo efecto ya que los receptores, su densidad y su función también es variable. Por todo ello, en relación a la regulación peptídica, se dice que cada neoplasia (o cada grupo de neoplasias) tiene sus características específicas (Nanus, 2003).

2.4.3. Otras acciones de las peptidasas en los procesos proliferativos

Junto con la regulación peptídica, las peptidasas ejercen otras acciones dependientes de su actividad catalítica que son necesarias para el crecimiento tumoral.

Una vez originado el tumor, este necesita degradar la membrana basal y la matriz extracelular para poder crecer, infiltrar tejidos y diseminarse a distancia. Para que esto se lleve a cabo, es necesaria la coordinación entre distintas enzimas proteolíticas dentro de las cuales se encuentran las peptidasas (Carl-McGrath y cols., 2006). Por ejemplo, ha sido descrito que el melanoma, tumor con mal pronóstico por su facilidad para migrar e invadir tejidos, expresa *de novo* la Aminopeptidasa N/CD13, enzima que tiene afinidad por la angiotensina III. Esta enzima, coordinada con metaloproteasas de la matriz (MMP), colabora en la hidrólisis del colágeno (Petrovic y cols., 2004). Además, la degradación de la matriz es fundamental para facilitar la migración de células endoteliales y para generar nuevos vasos, en el proceso de neoangiogénesis tumoral (Hanahan y Weinberg, 2000), en el cual también se ha descrito un papel importante de esta enzima (Pasqualini y cols., 2000; Petrovic y cols., 2004). Por todo ello, y al igual que ocurre con otras peptidasas, se ha descrito una correlación positiva de la APN/CD13 con el mal pronóstico de algunos tumores, es decir, con su capacidad para crecer, invadir tejidos y migrar (Petrovic y cols., 2004; Carl-McGrath y cols., 2006).

Empleando la próstata como modelo, Sumitomo y cols. (2005) observaron que la endopeptidasa neutra (NEP/CD10), enzima con acción sobre endotelina-1 (ET-1), bombesina y angiotensinas, inhibía el crecimiento y la migración de células tumorales en cultivos, gracias a la interacción de su dominio intracitoplásmico con diferentes moléculas (por ejemplo, la proteína PTEN supresora de tumores). Según estos autores, al perderse la expresión de NEP en los tumores prostáticos, no sólo se altera la regulación peptídica sino que se pierde también el control que esta enzima ejerce como receptor en el crecimiento y la migración celular (Sumitomo y cols., 2005).

Como se ha explicado anteriormente, la ACE y ACE2 también poseen dominios intracitoplásmicos que activan señales intracelulares, aunque no existen por el momento trabajos que relacionen esta característica con el crecimiento tumoral (Fleming, 2006; Lambert y cols., 2010).

Por otra parte, las células tumorales, en su migración tanto a nivel local como a distancia, reconocen y se unen a algunas proteínas de la matriz extracelular y de las células endoteliales, entre otras. En este sentido, ha sido descrito que algunas peptidasas ejercen esta función de moléculas de adhesión. Por ejemplo, la dipeptidil-peptidasa IV (DPPIV/CD26) se expresa en algunas células tumorales y puede unirse al colágeno de la matriz extracelular. También puede suceder que algunas proteínas de la superficie de las células tumorales sean reconocidas por DPPIV y otras peptidasas expresadas en el endotelio vascular de algunos tejidos a los que las células tumorales se unen, dando lugar a la metástasis (Riemann y cols., 1999; Carl-McGrath y cols., 2006; Pro y Dang, 2004).

Por tanto, las peptidasas ejercen diferentes acciones en distintas etapas del cáncer. Y es por ello que son moléculas de gran interés para la comprensión de esta enfermedad, así como para el diseño de nuevas herramientas de diagnóstico y tratamiento.

Las enzimas que se analizaron en este trabajo (ACE, ACE2 y APA) son claves en el sistema renina angiotensina (SRA) (Danilczyk y cols., 2004). Por esta razón, en el siguiente punto se realizará una breve descripción del SRA y se revisarán algunos trabajos que demuestran la implicación de este sistema peptídico en enfermedades neoplásicas.

3. Sistema renina-angiotensina y su implicación en procesos tumorales

3.1. Sistema renina angiotensina (SRA): de su concepto clásico al descubrimiento de SRA locales

En su concepto clásico, el SRA es un sistema hormonal circulante regulador del tono vascular y del balance hidroelectrolítico. Como se ve en la Figura 5, el *angiotensinógeno*, producido en el hígado, es transformado por la *renina* del aparato yuxtglomerular del riñón en *angiotensina I*. Esta es a su vez convertida en *angiotensina II* (ang II) por la *enzima convertidora de angiotensina* (ACE) presente en el endotelio vascular pulmonar (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

La ang II se une a *receptores AT1* y *AT2*, que pertenecen a la amplia familia de receptores asociados a proteínas G y que se encuentran distribuidos en distintos

tejidos. Esta unión produce una potente contracción de la musculatura lisa vascular y, de forma directa e indirecta, reabsorción de sodio y agua en el riñón. El conocimiento de este sistema endocrino ha sido de vital importancia para el desarrollo de fármacos claves en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades cardiovasculares y renales. Entre estos se encuentran los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACEi) o los antagonistas de los receptores de ang II (ARA-II) (Danilczyk y cols., 2004, Lambert y cols., 2008).

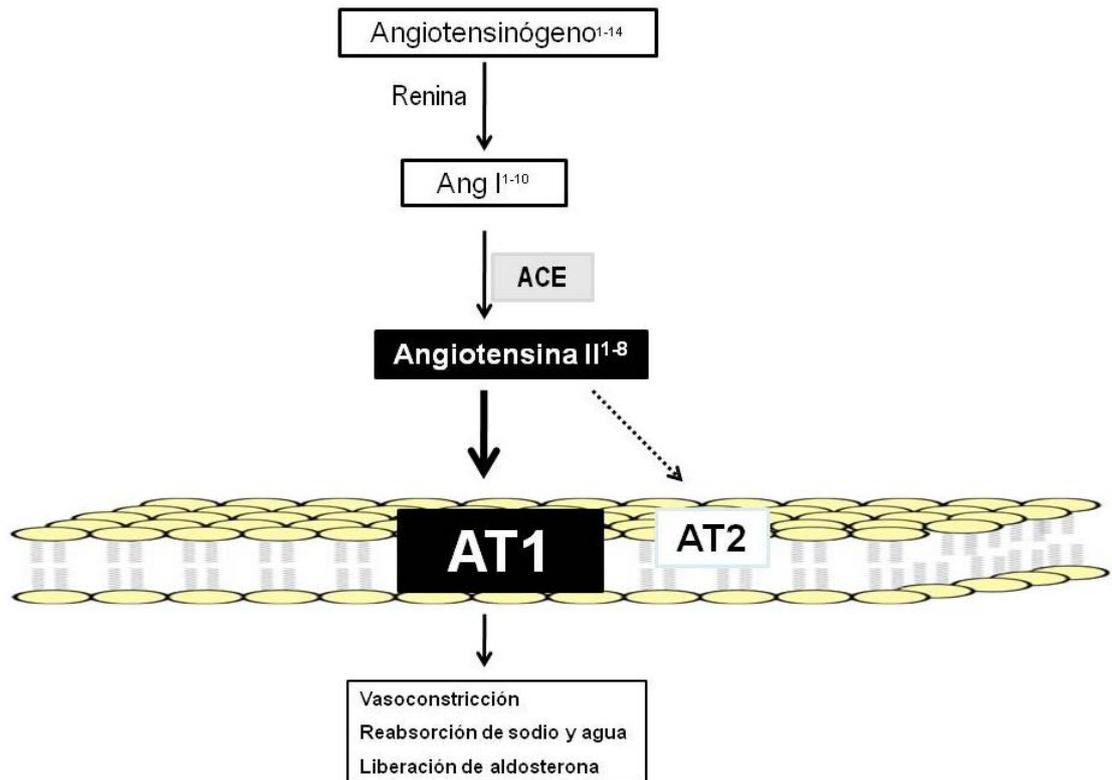


Figura 5. Sistema renina angiotensina (SRA)

Sin embargo, hoy en día se sabe que ni este esquema es tan sencillo ni las acciones del SRA se limitan a su función endocrina. Con el tiempo se ha ido descubriendo el papel de otros péptidos bioactivos, enzimas convertoras y receptores, lo que demuestra la complejidad de este sistema y el potencial de los fármacos que actúan o podrían actuar sobre él (Danilczyk y cols., 2004).

Aunque el péptido que clásicamente ha sido reconocido como efector del sistema es la angiotensina II, puede verse que el sistema está compuesto por varios péptidos con actividad biológica (*angiotensinas III, IV, 1-7 y 1-9*) que se producen por la acción de diversas peptidasas: *ACE, ACE2, APA, NEP/CD10, APN/CD13, Prolil endopeptidasa (PEP)*, etc. Más aún, se trata de un sistema en el que además de los

clásicos receptores AT-1 y AT-2, existen otros tipos de receptores que median la acción de otras angiotensinas: *receptor Mas*, *receptor renina/prorenina* y *receptor AT4* o *IRAP* (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008) (Figura 6).

Por otro lado, en la última década se ha ido demostrando que múltiples órganos y tejidos poseen la maquinaria molecular necesaria para la síntesis de los diferentes componentes del SRA. Se piensa que estos SRA "locales" son regulados de forma independiente al circulatorio, aunque pueden interactuar con él (Paul y cols., 2006; Kobori y cols., 2007). De este modo, además de sus funciones clásicas, las angiotensinas producidas a nivel local conducen a cambios a medio-largo plazo en los tejidos, regulando el crecimiento y diferenciación celular, y participando en procesos proliferativos en situaciones de desequilibrio del sistema. Cabe destacar que el riñón es uno de los órganos donde mejor se ha identificado este SRA local (Kobori et al., 2007; Rosivall, 2009). Según diversos autores, en este *SRA intrarrenal*, las angiotensinas podrían estar regulando distintos procesos tanto por vía autocrina y paracrina como por mecanismos intracrininos, ya que se ha demostrado la existencia de receptores de angiotensina en el núcleo de células tubulares renales (Gwathmey y cols., 2010; Zhuo y Li, 2011).

En este "nuevo" contexto, se ha propuesto la existencia de dos ejes complementarios en el SRA, cuyo desequilibrio podría inducir o afectar al desarrollo de distintas enfermedades crónicas (Santos y cols., 2008). Un primer eje, el mejor conocido y constituido por la *ACE-ang II-receptor AT1*, que además de la vasoconstricción y aumento de la volemia típicos, induciría, a nivel local, proliferación celular, hipertrofia, inflamación, estrés oxidativo, fibrosis, etc. Y un segundo eje, constituido por la *ACE2*, que a partir de la ang II produce angiotensina 1-7, péptido que actúa sobre el receptor Mas. Este *eje ACE2/Ang 1-7/Mas* contrarresta los efectos del anterior gracias a su acción vasodilatadora, antihipertrófica, antiangiogénica y antiproliferativa. Este descubrimiento ha convertido los ratios ACE/ACE2 y ang II/ang 1-7 en "switchs" moleculares a tener en cuenta en el desarrollo y evolución de distintas enfermedades cardiovasculares y renales, campo en el que han sido investigados en mayor profundidad (Wysocki y cols., 2006; 2008; Kobori y cols., 2007; Wakahara y cols., 2007; Santos y cols., 2008) (Figura 7).

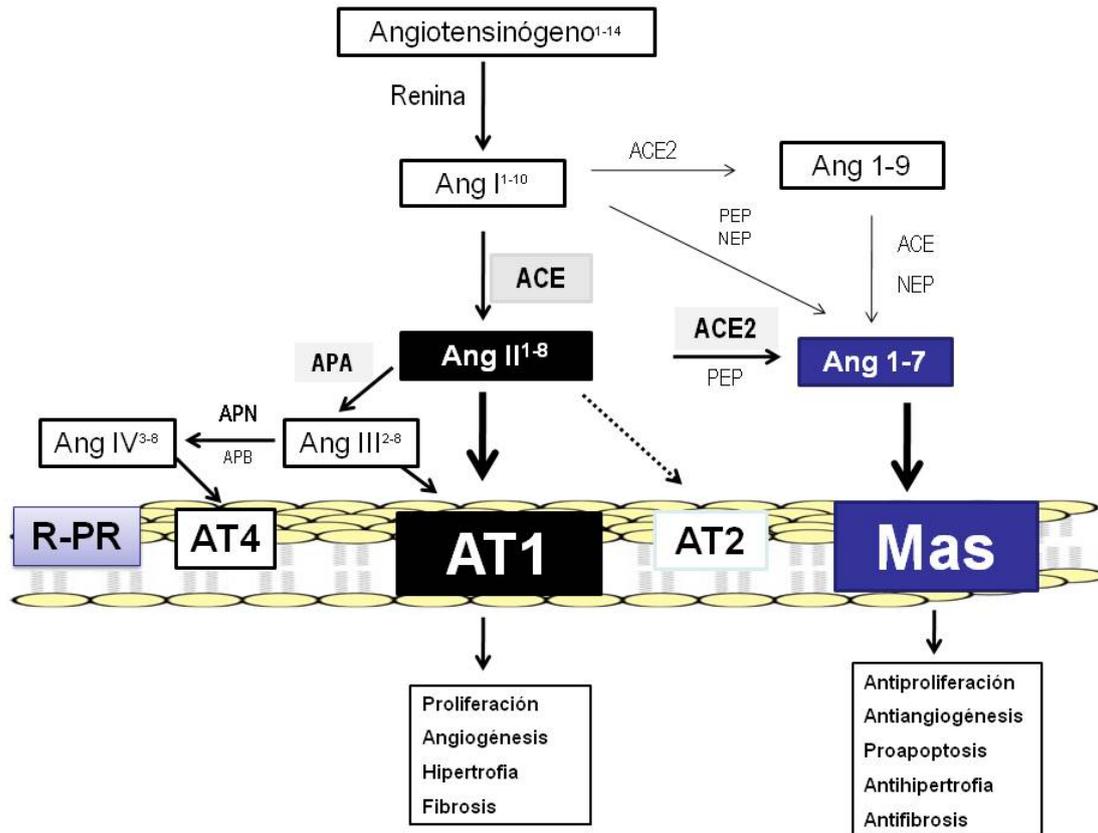


Figura 6. SRA: Eje ACE-ang II-receptor AT1 y eje ACE2/Ang 1-7/Mas

3.2. Sistema renina angiotensina y cáncer

El descubrimiento de los SRA locales ha dado lugar a importantes avances en el conocimiento de la implicación de este sistema peptídico en los procesos neoplásicos. Por un lado, se ha demostrado que las angiotensinas tienen un papel relevante en la angiogénesis, crecimiento e invasividad tumoral. Además, numerosos ensayos demuestran alteraciones en la expresión de diferentes componentes del SRA en distintos tumores. Por otro lado, ensayos realizados en cultivos celulares y en modelos animales sugieren un papel protector de los inhibidores de la ACE (ACEi) y los antagonistas de los receptores de angiotensina (ARA-II) frente al cáncer. Papel que confirman varios estudios retrospectivos realizados en pacientes con terapia antihipertensiva y ensayos clínicos en pacientes oncológicos (Deshayes y Nahmias, 2005; Ager y cols., 2008; George y cols., 2010).

3.2.1. Implicación del SRA en los hitos del cáncer: estudios en cultivos y modelos animales

Actualmente existen datos numerosos que sugieren la implicación del SRA en todos los procesos o "hitos" que definen el cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000). Aunque todos estos procesos son interdependientes y cooperativos, y aunque en cada tipo de tumor pueda tener su propio perfil, es muy probable que el mecanismo más importante por el que el SRA los regule sea mediante la modulación de la angiogénesis (Ager y cols., 2008; George y cols., 2010).

Décadas de experimentación sobre angiotensina II han tenido como objetivo los efectos que esta molécula ejerce a nivel macrovascular, es decir, en la circulación general. Sin embargo, la ang II es un péptido que actúa a nivel microvascular, ya que regula localmente la angiogénesis tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Heffelfinger, 2007). Numerosos ensayos realizados en cultivos y en modelos animales indican que la angiotensina II producida en el microambiente del tumor, bien por las células tumorales o bien por otras células del estroma (fibroblastos, macrófagos, etc.), estimula la expresión de variedad de factores de crecimiento, agentes proangiogénicos y proinflamatorios, proteínas intracelulares que inhiben la apoptosis y metaloproteasas de matriz que son vitales en la infiltración y metástasis. Estos efectos parecen estar mediados por el receptor AT1, aunque de modo indirecto se ven también implicados otros receptores (Deshayes y Nahmias, 2005; Ager y cols., 2008; George y cols., 2010).

Uno de los métodos para demostrar estos efectos mediados por la ang II ha sido el empleo de ACEi y ARA-II. Así, se ha demostrado que fármacos conocidos en el tratamiento de la hipertensión como los "priles" y "sartanes" (captopril, lisinopril, candesartan, telmisartan, etc.) pueden inhibir el crecimiento y la invasividad de distintos tumores sólidos de pulmón, colon, hígado, vejiga, estómago, ovario, etc. (Ager y cols., 2008; George y cols., 2010; Lee y cols., 2014; Okazaki y cols., 2014).

En contraste con lo anterior, todo parece indicar que la angiotensina 1-7, producida fundamentalmente por acción de la ACE2, es un péptido que inhibe la angiogénesis, efecto mediado por el receptor Mas. Los estudios sobre la implicación del eje ACE2-Ang1-7-Mas en la biología tumoral son aún escasos. Se ha demostrado por ejemplo que la ang 1-7 inhibe el crecimiento del cáncer de pulmón (Gallager y Tallant, 2004). También se ha demostrado que los aumentos de expresión de la ACE y los descensos de la ACE2 inducen el crecimiento y angiogénesis en el cáncer de páncreas y de próstata (Deshayes y Nahmias, 2005; Arafat y cols., 2007; Zhou y cols., 2009). Todo ello sugiere la posibilidad de desequilibrios entre ambos ejes en el cáncer, lo que apunta a los ratios ACE/ACE2 o Ang II/Ang 1-7 como herramientas

de interés en el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad y al SRA como diana terapéutica del cáncer (Figura 7).

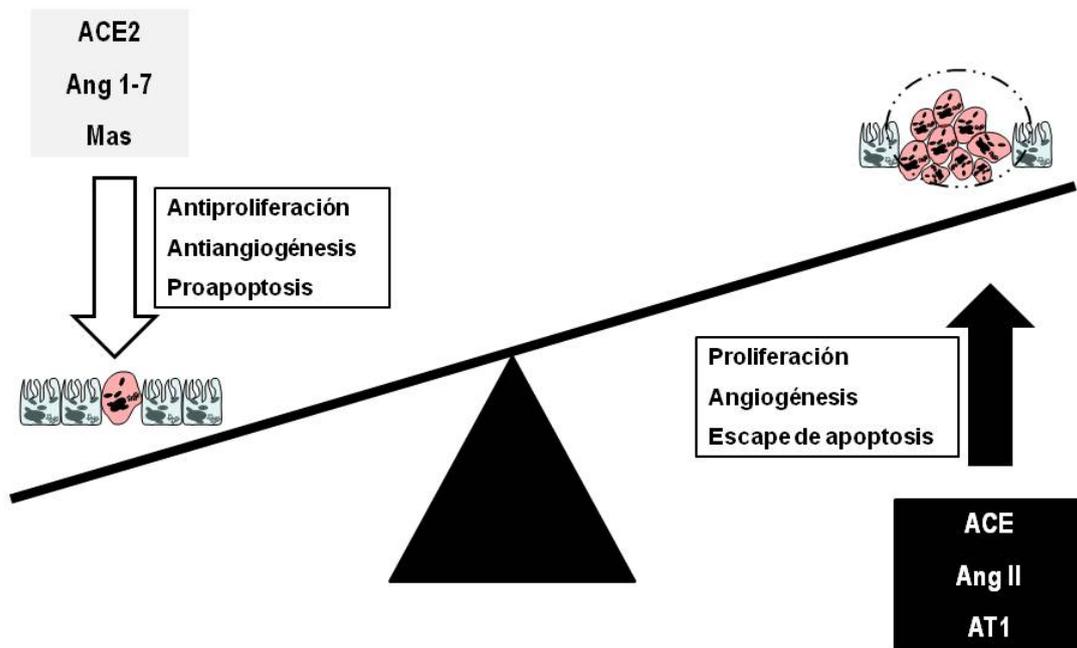


Figura 7. Balance sistemas SRA y su implicación en el cáncer

3.2.2. Desregulación de SRA en líneas celulares y tejidos neoplásicos humanos

Teniendo en cuenta que hay muchos tejidos que poseen SRA locales (Paul y cols., 2006), sería esperable que muchos de sus componentes puedan expresarse en tejidos y células neoplásicas. Sin embargo, se ha observado en varios casos que dicha expresión se altera durante el proceso de transformación maligna.

Se han descrito aumentos en la expresión de la ACE en el cáncer de próstata, colon, páncreas, mama y en el glioblastoma (Deshayes y cols., 2005; Arafat y cols., 2007; Ager y cols., 2008; Bernardi y cols., 2012). También se han descrito aumentos de la APA en el cáncer de cérvix uterino, colon y cabeza y cuello (Ino y cols., 2004; Marchio y cols., 2004; Perez y cols., 2009). A su vez, la expresión y actividad de la ACE2 disminuye en el cáncer de páncreas y aumenta en el de colon (Zhou y cols., 2009; Bernardi y cols., 2012). En cuanto a los receptores, especialmente en el caso del AT1, son más comunes los aumentos de expresión o la neoexpresión que las regulaciones a la baja. Además, en el caso del cáncer de

próstata, hígado y mama, se ha visto que existen variaciones significativas en función de la agresividad tumoral (grados y estadios), lo que implica un valor pronóstico de estos resultados (Deshayes y Nahmias, 2005; Ager y cols., 2008; George y cols., 2010).

3.2.3. Estudios retrospectivos y ensayos clínicos

Uno de los primeros trabajos que introdujo el debate sobre la implicación del SRA en el cáncer fue publicado en 1998 en la prestigiosa revista médica *The Lancet* (Lever y cols., 1998). El estudio, realizado de forma retrospectiva en 5200 pacientes que habían recibido diferentes tratamientos farmacológicos contra la hipertensión, sugería que el uso a largo plazo de los ACEi protegía frente al cáncer. No exento de controversia (Grossman y cols., 2002), el debate ha seguido vivo y el número de trabajos relacionados ha ido aumentando de forma exponencial en los últimos años. Muchos de ellos apuntan a que el uso de los ACEi y ARA-II protege del riesgo de padecer diversos tumores sólidos (próstata, mama, pulmón, colorrectal y páncreas, entre otros) o que incluso mejora el pronóstico de quienes los padecen (Keizman y cols., 2011; McMenamin y cols., 2012; Wang y cols., 2013; Chiang y cols., 2014; Makar y cols., 2014; Nakai y cols., 2014). Estos resultados son reflejo de los mecanismos específicos (locales) de los ACEi y ARA-II, más que de su acción antihipertensiva general (Ager y cols., 2008; George y cols., 2010). En relación con esto, se ha sugerido que el uso de estos fármacos podría incrementar los niveles de ang 1-7 que, como hemos mencionado, reduciría la angiogénesis y la proliferación (George y cols., 2010).

Otro de los campos que está siendo muy prolífico es el de los estudios de polimorfismos del gen ACE y el riesgo de padecer distintas patologías, entre ellas el cáncer. En humanos hay dos alelos para la ACE: el alelo D (*Deletion*) se asocia con mayor actividad de la ACE en suero (y en algunos tejidos) si se compara con el alelo I (*Insertion*) (Ager y cols., 2008). Aunque también existen discrepancias entre estos estudios, se ha descrito mayor riesgo de cáncer de mama y de formas avanzadas de cáncer de próstata, de estómago y de colon en pacientes con genotipo D/D que con I/I, es decir, en pacientes en los que puede haber mayor actividad de ACE y, por lo tanto, mayor producción de ang II (Vand der Knaap y cols., 2008; George y cols., 2010). El único estudio realizado en pacientes con cáncer renal no demostró ninguna asociación entre el polimorfismo ACE y esta neoplasia (Usmani y cols., 2000).

Debido a que los estudios preclínicos apuntan al potencial uso de los fármacos que actúan sobre el SRA en la terapéutica del cáncer, algunos grupos han

realizado ensayos clínicos en pacientes oncológicos. Estos han demostrado que los ARA-II o la administración subcutánea de ang 1-7 pueden retrasar la progresión de neoplasias prostáticas, colorrectales y sarcomas (Uemura y cols., 2005; Petty y cols., 2009; George y cols., 2010).

3.2.4. Sistema renina angiotensina intrarrenal (SRAi) y daño renal: ¿Implicación en el cáncer renal?

En el riñón se encuentran todos los componentes necesarios para producir angiotensinas (Kobori y cols., 2007; Rosivall, 2009). El descubrimiento de este SRA intrarrenal ha permitido comprender mejor el papel crucial de este sistema en la homeostasis renal y los beneficios de los iECA y ARA-II en nefropatías hipertensivas y diabéticas, donde existe un marcado componente proliferativo y fibrótico (Wakahara y cols., 2007; Wysocki y cols., 2006; Santos y cols., 2008). Numerosos estudios describen un desequilibrio en favor del eje de la ang II como factor de riesgo en su desarrollo, lo que explica que el efecto beneficioso de los ACEi y los ARA-II observado en algunas de estas patologías va más allá del bloqueo que ejercen estos agentes sobre el SRA circulatorio, actuando también sobre el SRAi. Sin embargo, a pesar de la abundante información existente sobre el SRAi y daño renal, esta se ha centrado casi exclusivamente en patología no neoplásica del riñón (Kobori y cols., 2007).

A comienzos de esta década, un estudio realizado en una larga serie de CCRCCs, demostró que la expresión inmunohistoquímica de los receptores AT1 y AT2 en el carcinoma renal de células claras aumenta según aumenta el grado histológico y que se correlaciona positivamente con peores índices de supervivencia a los 5 años. Los autores de este trabajo sugirieron el empleo de ARA-II y ACEi como herramienta terapéutica adicional en el tratamiento de esta enfermedad (Dolley-Hitze y cols., 2010). Así lo apuntan también algunos trabajos realizados con estos fármacos en líneas celulares renales y en modelos animales de cáncer renal (Hii et al., 1998; George y cols., 2010; de Araujo Junior y cols., 2014). Del mismo modo, un estudio retrospectivo y un ensayo clínico en pacientes con cáncer renal avanzado demostraron mejores pronósticos en aquellos pacientes que habían recibido iECAs y ARA-II como tratamiento coadyuvante de sunitinib e interferón-alfa (Keizman y cols., 2011; Tatokoro y cols., 2011).

En cuanto a las enzimas que componen el complejo esquema metabólico del SRA, estas son muy abundantes en el epitelio tubular, donde se originan la mayoría de los tumores renales (Metzger y cols., 1999; Lely y cols., 2004). Su expresión y actividad varía en los tumores renales, lo que hace de ellas buenas candidatas a

marcadores de diagnóstico/pronóstico en estos tumores. Así, por ejemplo, la endopeptidasa neutra (NEP) ó CD10, es habitualmente utilizada en clínica como marcador de carcinomas renales de nefrona proximal (Pan y cols., 2004). Otras peptidasas, como la aminopeptidasa N (APN/CD13), la aspartil aminopeptidasa (ASP), prolil endopeptidasa (PEP) y aminopeptidasa B (APB), se ha demostrado que cambian su actividad y expresión proteica y genómica en el proceso de transformación maligna de las células epiteliales renales. Además, también varía en función del subtipo histológico y se correlaciona con la agresividad tumoral y la supervivencia de los pacientes con cáncer renal (Varona y cols., 2007; 2010; Blanco y cols., 2008; 2010; Larrinaga y cols. 2007; 2010; 2012). Estos resultados orientan a que un desequilibrio metabólico en el SRAi podría jugar un papel importante tanto en la transformación maligna del tejido renal como en la evolución y pronóstico del cáncer renal.

Con el fin de conocer mejor el patrón de actividad y expresión de las enzimas reguladoras del SRA en las neoplasias renales, en el presente trabajo de tesis doctoral se abordó el estudio de tres peptidasas clave en el SRA, como son las enzimas convertidoras de angiotensina (ACE y ACE2) y la APA o angiotensinasa en una serie de tumores renales.

II. Objetivos

A pesar del importante número de publicaciones existentes en referencia a la patología tumoral y el papel de las peptidasas en la misma (Göhring y cols., 1998; Nanus y cols., 1998; Antczak y cols., 2001; Ino y cols., 2004; Carl-McGrath y cols., 2006), el número de trabajos en los que se presentan y discuten de manera simultánea parámetros como actividad enzimática, expresión tisular y expresión génica de las mismas no ha sido muy abundante, incluyendo los estudios realizados en riñón. En este sentido, el grupo de investigación en el que se ha realizado esta tesis doctoral, ha publicado algunos trabajos que describen cambios en la actividad y expresión proteica y génica de diferentes peptidasas en tumores renales (Varona y cols., 2007; Larrinaga y cols., 2007; Blanco y cols., 2008; Varona y cols., 2010; Larrinaga y cols., 2010; 2012). Algunas de estas peptidasas se sitúan en el complejo esquema metabólico del SRA, lo que hace sospechar que la actividad de otras enzimas reguladoras de angiotensinas podría también sufrir alteraciones. Por esta razón, en el presente trabajo se analizaron las 3 enzimas consideradas claves en la conversión de angiotensinas: la ACE, ACE2 y APA.

Los distintos histotipos de neoplasias renales se seleccionaron siguiendo los criterios que se explican a continuación. Por un lado, se analizó el tumor renal más frecuente, el CCRCC, que abarca las tres cuartas partes de todas las neoplasias renales (López-Beltrán y cols., 2006). Por otro, se analizaron tumores renales que se originan en diferentes partes de la nefrona, CCRCC de la parte proximal, y ChRCC y RO de la nefrona distal. Por último, se analizó un tumor benigno (RO), frente a dos malignos (CCRCC y ChRCC).

Así, los objetivos de este trabajo de tesis doctoral se pueden resumir del modo siguiente:

- 1.- Estudiar la actividad enzimática de la ACE, ACE2 y APA tanto en las neoplasias renales como en sus respectivos tejidos no tumorales adyacentes.
- 2.- Conocer la expresión tisular de las tres peptidasas en los distintos subtipos histológicos (CCRCC, ChRCC y RO) y en el parénquima renal no neoplásico adyacente.
- 3.- Analizar los niveles de mRNA de las tres enzimas en las neoplasias renales y en el tejido no tumoral adyacente.
- 4.- Estratificar la actividad enzimática de las tres enzimas convertidoras de angiotensina en función del grado histológico, el estadio de la enfermedad, el tamaño del tumor y la supervivencia a los 5 años de los pacientes con CCRCC.

III. Materiales y Métodos

1. Reactivos y productos

En este trabajo se han empleado los reactivos y productos que aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1: Reactivos y productos empleados. Se indica el proveedor, así como la ciudad y el país de origen. Todos los reactivos químicos eran de calidad para análisis o equivalente.

Proveedor	Reactivos y Productos
Amersham Bioscience Buckinghamshire, UK	Hexámeros Inhibidor de RNasa (<i>RNA guard</i>) DNasa I (<i>FPLC pure</i>)
Bachem Bubendorf, Suiza	Abz-Ser-Pro-3-nitro-Tyr-OH (SPNPT)
Trinity Biotech Leiden, Holanda	3-2-furylacryloyl-l-phenylalanylglycylglycine (FAPGG)
Biocare Medical Concorde, EEUU	Reactivo BORG Reactivo bloqueante de peroxidada Reactivo <i>Background Sniper</i> Kit <i>Avidin-Biotin blocking</i> Estreptavidina-HRP Diaminobencidina (DAB)
Eppendorf Hamburgo, Alemania	<i>Phase lock gel heavy</i> 0,5 ml
Labolan Esparza del Galar,NA, España	Medio de montaje Eukit
Maher Bilbao, España	Formol
Merck Damstact, Alemania	Acetato sódico tri-hidratado Acido ortofosfórico Cloruro de manganeso Cloruro sódico Eosina Etanol absoluto Fosfato sódico monobásico Fosfato sódico dibásico Isopropanol Parafina
Quantace London, UK	<i>SensiMixPlus SYBR & Fluorescein</i>
Quiagen Hilden, Alemania	Agua libre de RNasas
Sigma-Aldrich Steinheim, Alemania	Glu- β -naftilamida Azul brillante de Coomassie G-250 Azul de bromofenol Bromuro de etidio Captopril Fenantrolina DX-600 Dimethyl-sulfóxido (DMSO) DL-Dithiothreitol (DTT)

Sigma-Aldrich Steinheim, Alemania (continuación)	RNAlater Puromicina Seroalbumina bovina (BSA) Tris (hidroximetil) aminometazol (Tris- base) <i>Tri-reagent</i> 1-Bromo-3-cloro-propano
Panreac Barcelona, España	Acido clorhídrico Agarosa
Probus Badalona, España	Acido acético glacial
USB Ohio, EEUU	Transcriptasa Reversa (M-MLV) dNTPs Tampón de reacción 5X (M-MLV RT)
Zymo Research California, EEUU	<i>RNA clean-up kit-5</i>

2. Obtención del tejido biológico empleado

En la presente tesis se analizaron 66 neoplasias renales procedentes de pacientes nefrectomizados, diagnosticados y tratados en el Hospital Universitario de Basurto (Bilbao). Estas muestras fueron incluidas en la Colección Privada de Muestras Biológicas C.0002800 (Investigación en cáncer), del Registro de Biobancos, Sección Colecciones, Instituto de Salud Carlos III (Madrid).

Las muestras obtenidas, tanto de tejido tumoral como no neoplásico adyacente al tumor, se procesaron inmediatamente. Así, para ensayar las actividades enzimáticas las muestras se conservaron en un ultracongelador MDF-U5 186 S (Sanyo) a -80 °C. Posteriormente, el tejido renal se homogeneizó siguiendo el procedimiento específico que se detalla en el apartado 3.1. Aquella fracción de tejido que iba a ser empleada para su posterior análisis histológico e inmunohistoquímico fue fijada tal y como se describe en el apartado 4.1. Simultáneamente, y cuando el tejido iba a ser empleado para determinar los niveles de mRNA, las muestras se sumergieron inmediatamente en RNAlater (Sigma-Aldrich) y se almacenaron a -80 °C, para evitar así la degradación del mismo.

3. Análisis de la actividad convertidora de angiotensina

3.1. Fraccionamiento de la muestra

La actividad enzimática se midió en la fracción unida a membrana y en la fracción soluble, para lo que se realizó un fraccionamiento subcelular del tejido

renal. Durante todo el proceso (reflejado en la Figura 1) las muestras se mantuvieron a 4 °C.

Las muestras, tanto de tejido tumoral como de tejido no neoplásico adyacente, fueron sometidas en primer lugar a un proceso de homogeneización. Así, una cantidad adecuada de tejido (100 mg de tejido fresco) se resuspendió en 1,5 ml de tampón Tris-HCl (0,2 M, pH 7,4) y se homogeneizó a potencia máxima en un homogenizador PZR 50 (Heidolph). El homogenado resultante se centrifugó a 10.000 \times g y 4 °C durante 35 min en una centrífuga Centrikon T2190 empleando el rotor TFT 45.6 (Kontron).

Tras la centrifugación, se depositó el sobrenadante, correspondiente a la Fracción Soluble del tejido a analizar, en tubos eppendorf. El sedimento resultante se resuspendió en 1 ml de tampón Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4 y se sometió a un nuevo proceso de homogeneización como el previamente descrito. A continuación, se centrifugó a 800 \times g durante 3 min en una centrífuga Labofuge 200 (Heraeus). El sobrenadante resultante, correspondiente a la Fracción de Membrana del tejido a estudiar, se depositó en tubos eppendorf.

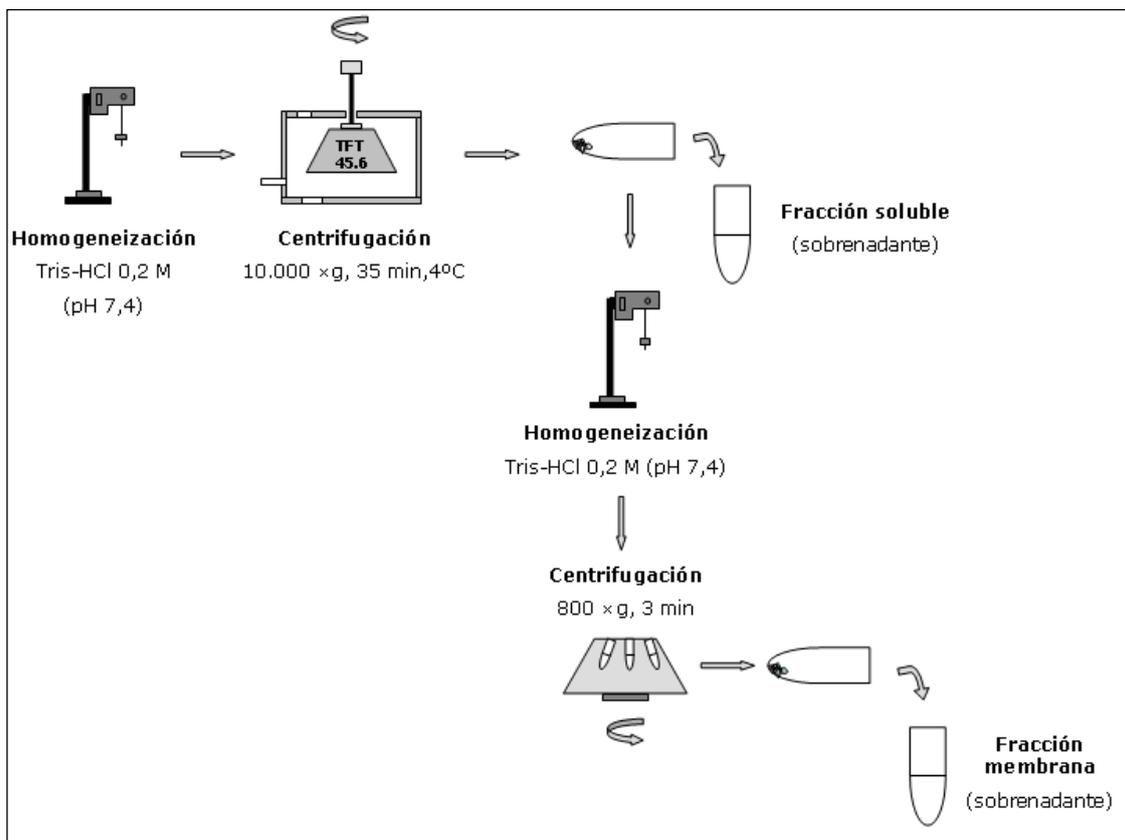


Figura 1: Esquema del procedimiento realizado para separar las fracciones celulares. La fracción soluble y la fracción membrana representadas se emplearon en los análisis de la actividad enzimática de las peptidasas del estudio.

3.2. Determinación de la cantidad de proteína

La proteína total de las muestras se determinó según el método Bradford y cols. (1976). Para ello, se añadieron 2 ml del reactivo Bradford (azul brillante Coomassie 0,117 mM, etanol al 5% y ácido ortofosfórico al 15%) a 10 μ l de muestra procesada tal y como se ha descrito anteriormente. Transcurridos 10 min se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV-2401 PC (Shimadzu). Se empleó una recta patrón usando concentraciones conocidas de BSA.

3.3. Ensayos enzimáticos

En la Tabla 2 se desglosan las disoluciones empleadas para la determinación de las distintas actividades enzimáticas. Posteriormente, se describe cómo se midió cada una de las actividades.

Tabla 2: Composición de las disoluciones empleadas en la determinación de la actividad enzimática. En todos los casos contenían albúmina bovina sérica (BSA) en una concentración de 0,1 mg/ml. Son sustratos preparados en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). NA: naftilamida; mM: concentración final del sustrato enzimático (en mM).

	Sustrato	mM	pH	NaCl (mM)	MnCl₂ (mM)
APA	Glu- β -NA	0,125	7,4	-	1
ACE	FAPGG	0,800	8	300	-
ACE2	SPNPT	0,100	6.5	-	-

3.3.1. Actividad de la Enzima Convertidora de Angiotensina

La actividad de la ACE se analizó en muestras neoplásicas renales y tejido no tumoral adyacente de 45 pacientes con CCRCC (39 hombres, 6 mujeres, edad media: 62 años), 8 con ChRCC (4 hombres, 4 mujeres, edad media: 67 años) y otros 8 con RO (7 hombres, 1 mujer, edad media: 63 años).

Para la determinación de la actividad enzimática de ACE (Homquist y cols., 1979) se empleó el sustrato artificial FAPGG (3-(2-furylacryloyl-l-Phe-Gly-Gly)) (Homquist y cols., 1979). La enzima rompe la unión Phe-Gly, produciéndose FAP (3-(2-furylacryloyl-l-Phe)) y Gly-Gly, de modo que FAP es medido mediante método fotométrico (Figura 2).

Se incubaron 900 μl de sustrato con 100 μl de muestra y seguidamente (t_0) se midió la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm mediante el espectrofotómetro (Hitachi Roche) a 25 °C. Después de 15 min (t_{15}), se volvió a medir la absorbancia a la misma longitud de onda. El cambio del espectro de la absorbancia durante este período corresponde a la acción que la enzima tiene sobre el sustrato. La actividad enzimática se expresó como actividad específica, unidades de actividad peptidásica (UP) (μmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min)/mg de proteína.

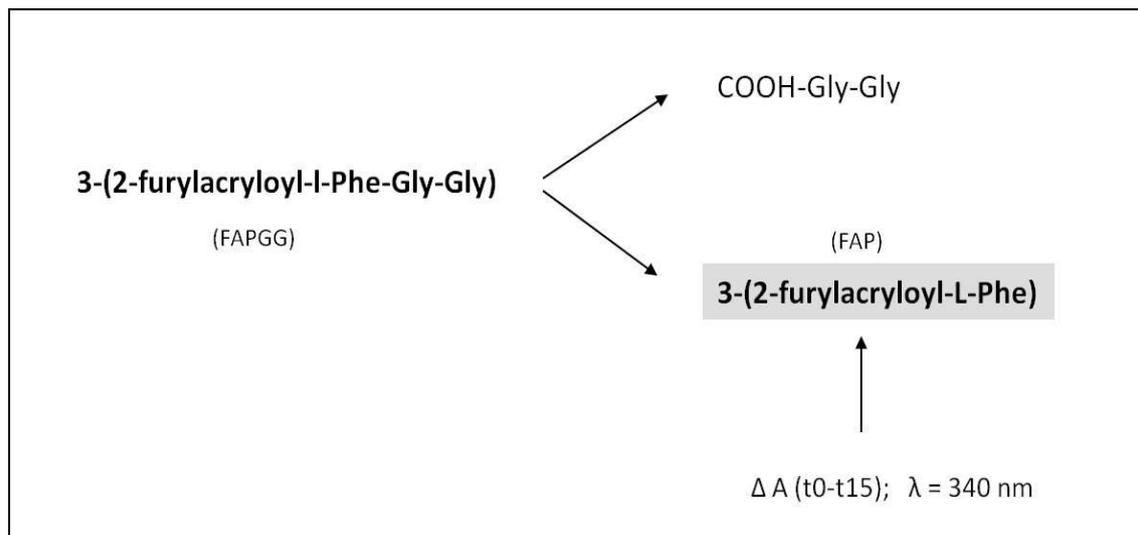


Figura 2: Esquema de la hidrólisis del sustrato FAPGG. Se mide la absorbancia de uno de los productos obtenidos, FAP, en diferentes tiempos a 340 nm.

Para verificar que la liberación de FAP fue mayoritariamente debida a la acción de la ACE, se realizaron ensayos de inhibición con captopril (10 μM) en muestras renales procesadas idénticamente. La inhibición fue del 100%.

3.3.2. Actividad de la Enzima Convertidora de Angiotensina 2

La actividad de la ACE2 se analizó en las mismas muestras que para la ACE: 45 CCRCC, 8 ChRCC y 8 RO.

Se determinó la actividad enzimática mediante el Método de Yan y Cols. (2003), empleándose para ello el sustrato artificial y fluorogénico SPNPT (Abz-Ser-Pro-3-nitro-Tyr-OH). Se incubaron 100 μl de muestra con 1 ml de sustrato durante dos horas a 37 °C. Para detener esta reacción, se añadió 1 ml de 0,1 M de acetato

(pH 4,2) y seguidamente se cuantificó la actividad enzimática mediante el espectrofluorímetro (Shimadzu) a 410 nm tras ser excitada a 360 nm (Figura 3).

La enzima hidroliza el sustrato Abz-Ser-Pro-3-nitro-Tyr-OH, liberando Abz-Ser-Pro y 3-nitro-Tyr-OH. La fluorescencia nativa del grupo Abz (2-Aminobenzoil) está apantallada por el 3-nitro-Tyr-OH. De esta manera, cuando la enzima hidroliza el sustrato se libera Abz-Ser-Pro emitiendo una fluorescencia que es directamente proporcional a la actividad enzimática. Por tanto, mediante una curva de regresión se extrapola la acción de ACE-2 sobre este sustrato.

Los ensayos de inhibición de la ACE2 realizados con DX-600 (1 μ M) en las mismas muestras, mostraron una inhibición del 97%.

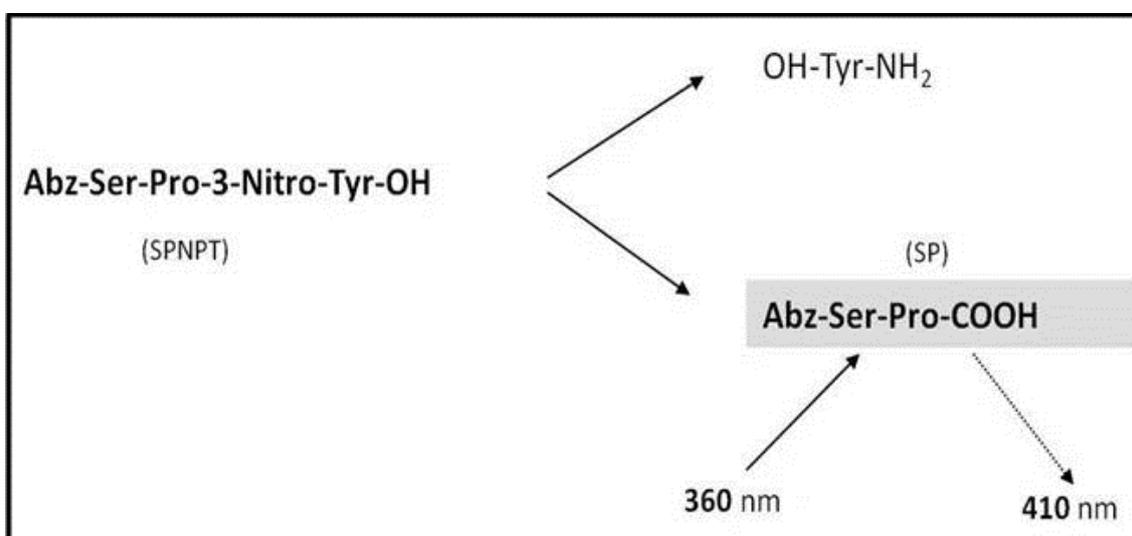


Figura 3: Esquema de la hidrólisis del sustrato SPNPT por la ACE2. Uno de los productos obtenidos, SP, emite fluorescencia a 410 nm cuando es excitado a 360 nm.

3.3.3. Actividad de la Aminopeptidasa A

Para la actividad de la APA se emplearon 50 CCRCC (40 hombres, 10 mujeres, edad media: 62 años), 8 ChRCC (4 hombres, 4 mujeres, edad media: 67 años) y 8 RO (6 hombres, 2 mujeres, edad media: 64 años).

Se emplearon 50 μ l de muestra para el análisis de la enzima, al que se le añadió 1 mL del sustrato glutamyl- β -naftilamida (Tobe y cols., 1980). La muestra se incubó durante 30 minutos. La presencia de actividad peptidásica en la muestra hace que la aminoacil- β -naftilamida se rompa liberando aminoácidos libres y moléculas de β -naftilamina (Figura 4). Esta última molécula tiene la particularidad de ser fluorescente, emitiendo energía a una longitud de onda de 412 nm cuando es excitada a 345 nm. La actividad enzimática se determinó por métodos espectrofluorimétricos, para lo que se empleó un espectrofluorímetro RF-540 de

Shimadzu.

Los ensayos de inhibición con fenantrolina (1.2 mM) arrojaron una inhibición de la APA del 93% en la fracción unida a membrana del tejido renal y del 84% en la fracción soluble.

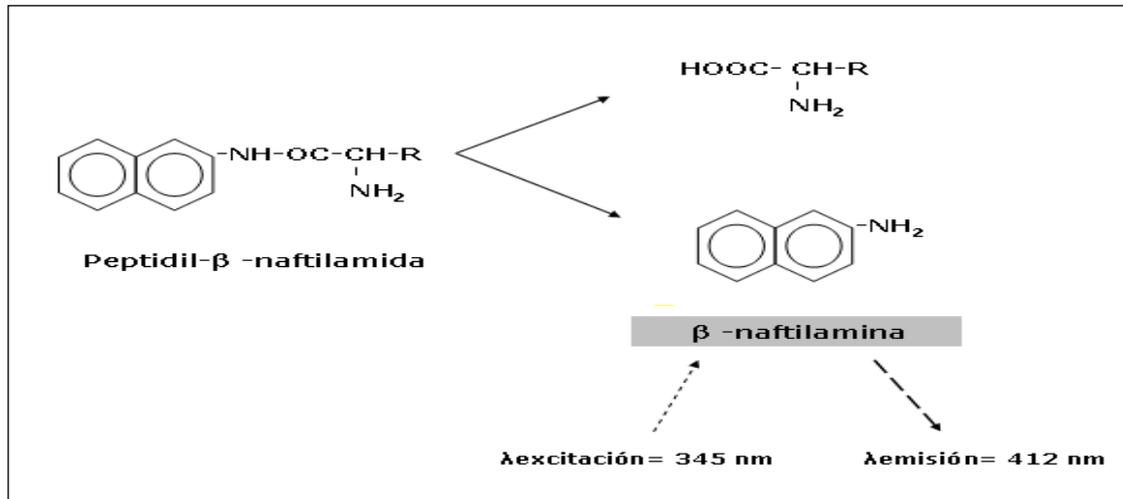


Figura 4: Esquema de la hidrólisis del sustrato de peptidasa en el ensayo enzimático. Uno de los productos obtenidos, β-naftilamina, emite fluorescencia a 412 nm cuando es excitado a 345 nm.

Todas las muestras se ensayaron por triplicado y se calculó la media y la desviación estándar. También se hicieron controles negativos ("blancos"), para lo que se añadieron 50-100 μl de solución Tris-HCl 50 a los respectivos sustratos.

Los valores obtenidos en los análisis de actividad enzimática se transformaron en unidades de actividad peptidásica (UP), definiéndose dicha unidad como la cantidad de enzima que hidroliza un picomol de sustrato por minuto. Posteriormente, los resultados finales se expresaron como actividad específica (UP/miligramo de proteína en la muestra).

4. Análisis histológico e inmunohistoquímico

4.1. Preparación de las muestras: fijación, inclusión, microtomía, desparafinado e hidratación

El proceso de fijación tiene como objetivo aumentar la consistencia de un tejido mediante la desnaturalización de sus proteínas e impedir la difusión de las moléculas que se pretenden detectar.

Así, las muestras objeto de estudio se fijaron con formol tamponado al 10% (v/v) durante 24 h. Posteriormente se realizó el tallado de la pieza, obteniéndose

una muestra representativa. Antes de la inclusión en parafina se llevó a cabo la deshidratación del tejido, mediante 2 baños de etanol al 96%, 2 baños de etanol al 100% y 2 baños de xileno, cada uno de ellos de 1 h de duración. Finalmente, el tejido se incluyó en parafina líquida durante 2 h a una temperatura de 58-62 °C, de tal forma que se posibilita el almacenamiento de las muestras a temperatura ambiente hasta su procesamiento posterior.

De los bloques anteriormente mencionados, se obtuvieron, mediante un microtomo (HM 340 E, Microm), cortes de 3 micras de espesor que se colocaron en un baño de flotación con agua destilada a 50 °C con el objetivo de conseguir el estiramiento óptimo de los mismos. A continuación, los cortes se recogieron sobre los portaobjetos convenientemente etiquetados y se fijaron en una estufa (Memmert) durante 1 h a 60 °C. Para el desparafinado y la hidratación del tejido se realizaron 3 baños de xileno de 5 min cada uno y a continuación, 2 baños de alcohol al 100%, 2 baños de alcohol al 95% y 1 baño de agua destilada, cada baño de 1-2 min de duración. Los portaobjetos se mantuvieron en este último baño de agua destilada hasta el paso siguiente.

4.2. Análisis inmunohistoquímico

4.2.1. Procesamiento de la muestra

Tras el desparafinado e hidratación de la muestra, se procedió a la recuperación antigénica. Para ello, los portaobjetos se introdujeron en una cubeta con reactivo BORG (Biocare Medical, Concorde, EEUU) y la cubeta se introdujo en una cámara de presión (Decloaking Chamber, Biocare Medical) con un programa en dos pasos. Primero, la temperatura fue subiendo hasta alcanzar 125 °C, temperatura que se mantuvo durante 10 min. A continuación, se disminuyó la temperatura a 90 °C, durante 10 s. Pasado este tiempo, los portaobjetos se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 10 min.

El estudio de la expresión tisular se llevó a cabo mediante el método indirecto de inmunoperoxidasa. En la Tabla 3 se muestran los anticuerpos empleados para el análisis inmunohistoquímico.

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en los análisis inmunohistoquímicos. Se indica el huésped, la dilución empleada, así como el proveedor, la ciudad y el país.

Anticuerpo primario	Huésped	Dilución	Proveedor
Anti-ACE	Ratón	1:50	Abcam Cambridge, UK
Anti-ACE2	Ratón	1:20	Santa Cruz California, EEUU
Anti-BP1 (APA)	Conejo	1:250	AbCam Cambridge, UK

El proceso se realizó en una cámara húmeda a 25 °C sobre un agitador orbital (Biocare Medical) a 35 rpm. Tras lavar los portaobjetos con PBS se cubrió la muestra con un reactivo bloqueante de peroxidasa (Biocare Medical, Concorde, EEUU) durante 15 min, a fin de bloquear moléculas del tejido que pudieran interferir en la reacción indirecta.

Las muestras se lavaron con PBS, y a continuación con el reactivo *Background Sniper* de Biocare Medical (Concorde, EEUU) durante 10 min, para evitar uniones inespecíficas. Finalmente, los portaobjetos se lavaron de nuevo con PBS y se cubrieron con abundante bloqueador de avidina, y tras otro lavado con PBS, con bloqueador de biotina. En ambos casos, los portaobjetos se incubaron durante 20 min, se empleó el Kit *Avidin-Biotin blocking* (Biocare Medical, Concorde, EEUU).

Tras 3 lavados con PBS, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario correspondiente, cubriendo bien las secciones de tejido, durante 2 h. Posteriormente, se lavaron los portaobjetos en PBS durante 5 min y se aplicó generosamente el anticuerpo secundario biotinilado (Biocare Medical, Concorde, EEUU) durante 30 min. Pasado este tiempo se lavaron las secciones en PBS durante 5 min, se aplicó la estreptavidina-HRP (Biocare Medical, Concorde, EEUU) y se incubó en la cámara húmeda durante 30 min. Tras un lavado en PBS durante 5 min, se aplicó el sustrato diaminobencidina (DAB) (Biocare Medical, Concorde, EEUU) en una incubación de 3 min.

Tras 2 lavados, el primero con PBS y el segundo con agua destilada, se realizó el contraste del tejido con un preparado de hematoxilina durante 1 ó 2 min. El contraste se realizó, de nuevo, en cámara húmeda a 25°C y a 35 rpm. A continuación, se lavó el tejido con PBS y se procedió a su deshidratación gradual a través de alcoholes al 70, 80, 95 y 100%, durante 1 min cada uno. Finalmente, las secciones se bañaron en xileno, donde se mantuvieron hasta el siguiente paso.

Por último, los portaobjetos se secaron en la parte posterior, donde no se encontraba el tejido, manteniendo la humedad del tejido con xileno residual y se les aplicó unas gotas de medio de montaje Eukit (Labolan, Esparza del Galar, Navarra, España) directamente en la zona de tejido. Se colocó el cubreobjetos suavemente y se empujaron hacia afuera las burbujas que se formaron. Una IgG inespecífica fue usada como control negativo. La reacción positiva fue visualizada con la solución DAB seguida por la tinción de contraste con hematoxilina.

4.2.2. Evaluación de la expresión tisular de las peptidasas empleadas como marcadores tumorales

La expresión tisular de las enzimas fue evaluada tras la tinción inmunohistoquímica previamente descrita. Las secciones de tejido fueron examinadas bajo microscopía óptica (Nikon 80i), cada sección fue considerada como positiva ante la presencia de tinción, independientemente de su localización e intensidad y negativa como la ausencia completa de tinción. Los resultados fueron divididos en cuatro categorías: negativo (-); tinción débil (+); tinción moderada (++); tinción intensa (+++). Dependiendo de su distribución, cada tinción positiva fue subdividida en dos categorías: difusa o focal.

4.3. Análisis histológico

4.3.1. Tinción con hematoxilina y eosina

Para la determinación del grado y el estadio de CCRCC se realizó un análisis histológico de las muestras tras la tinción con hematoxilina y eosina. Para ello, los cortes se lavaron durante 5 min con agua corriente y se cubrieron con hematoxilina durante 3 min. Tras lavar de nuevo con agua corriente, se realizaron 3 baños con HCl al 0,5% en alcohol (v/v) durante 3 s cada uno y se enjuagaron con agua durante 5 min. A continuación, los cortes se tiñeron con eosina acuosa al 1% (v/v) durante 25 s y se volvieron a lavar con agua. Para deshidratar las muestras, se realizaron inmersiones de 10 s en disoluciones de concentración creciente de alcohol, 2 baños de alcohol al 96% y 2 baños de alcohol al 100%. Por último, los cortes se sumergieron durante 10 s en 2 baños de xileno. Las muestras se montaron con medio de montaje Eukit (Labolan, Esparza del Galar, España) y se dejaron solidificar toda la noche a temperatura ambiente.

4.3.2. Determinación del grado histopatológico

Para determinar el grado histopatológico que presentaban las muestras de CCRCC se empleó el sistema de grados de Fuhrman (Fuhrman y cols., 1982). Este sistema es en la actualidad el mejor indicador del grado histológico en todos los carcinomas renales. La graduación se hace de acuerdo con el área de mayor grado nuclear, así sea muy pequeña, tal y como muestran la Tabla 4 y la Figura 5.

Tabla 4: Características de los diferentes grados nucleares empleadas en el sistema de Fuhrman y cols. (1982).

Grado Bajo
G1: núcleos pequeños monomorfos, sin nucléolos visibles.
G2: núcleos levemente pleomórficos, con nucléolos visibles a 10x.
Grado Alto
G3: núcleos moderadamente pleomórficos, nucléolos visibles.
G4: núcleos muy pleomórficos, nucléolos grandes y múltiples.

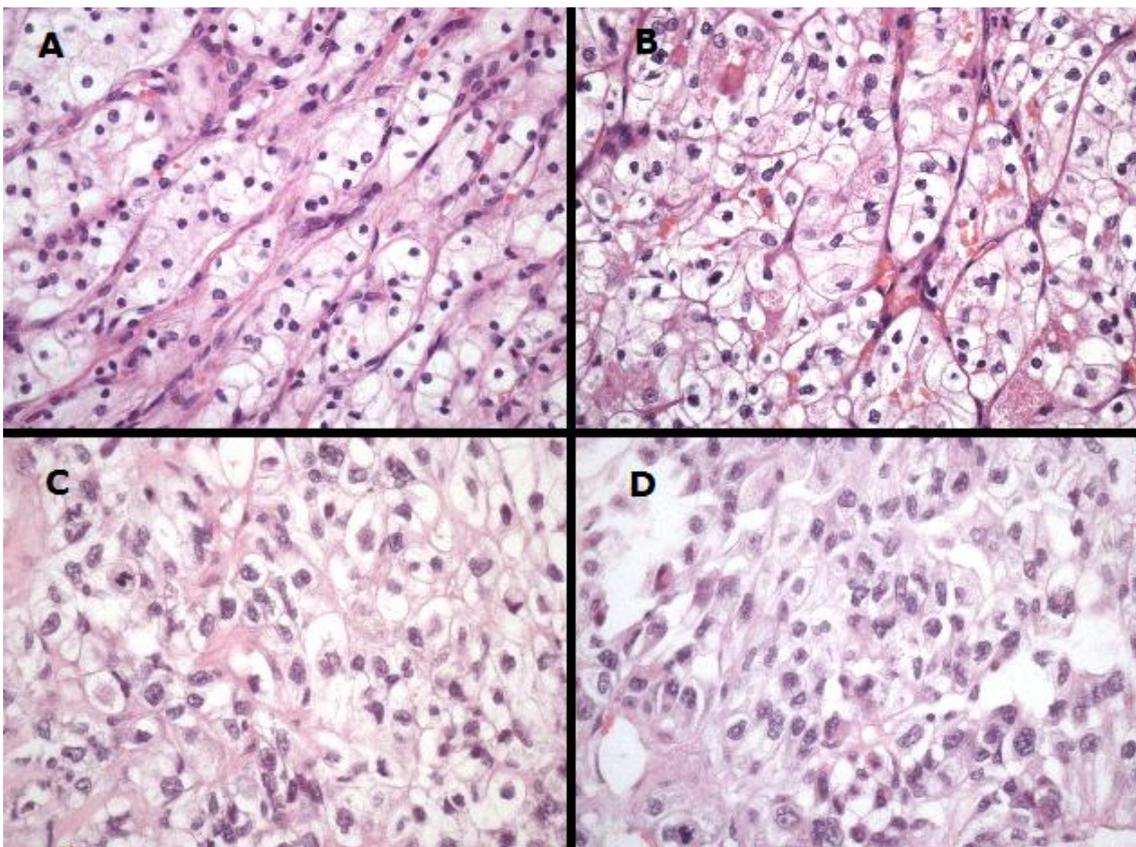


Figura 5: Microfotografías de cortes transversales de carcinomas renales con diferente grado nuclear de Fuhrman. (A) Grado 1, (B) Grado 2, (C) Grado 3, (D) Grado 4. Tinción H&E, X400 en las 4 microfotografías. (Imágenes tomadas de: <http://www.kidney pathology.com>).

4.3.3. Clasificación del estadio neoplásico

Para determinar el estadio de los adenocarcinomas renales se han conformado diferentes sistemas. Entre ellos el sistema más utilizado es el método TNM (*Tumor, Node, Metastasis*). Este sistema, que tiene en cuenta la localización del tumor primario, su diámetro mayor, la afectación de estructuras vecinas, las características de los ganglios linfáticos y la presencia de metástasis fue el empleado para la determinación del estadio de las muestras de CCRCC (Tabla 5).

Tabla 5: Características empleadas por el sistema TNM para la determinación del estadio en muestras de RCC. (Tomado de: Greene y cols., 2002 y UICC, 2002).

Tumor primario (<i>Tumor = T</i>)
<p>T0: no hay indicios de tumor primario.</p> <p>T1: Tumor de diámetro máximo menor o igual a 7 cm, limitado al riñón.</p> <p style="padding-left: 20px;">T1a: Tumor de 4 cm o menos.</p> <p style="padding-left: 20px;">T1b: Tumor de más de 4 cm, pero menor de 7 cm.</p> <p>T2: Tumor de diámetro máximo mayor de 7 cm, limitado al riñón.</p> <p>T3: Tumor que se extiende a las venas principales o invade la glándula suprarrenal o los tejidos perirrenales, pero sin atravesar la Fascia de Gerota.</p> <p style="padding-left: 20px;">T3a: Tumor que invade la glándula suprarrenal o los tejidos perirrenales, pero sin atravesar la Fascia de Gerota.</p> <p style="padding-left: 20px;">T3b: Tumor que se extiende de forma importante en las venas renales o cava por debajo del diafragma.</p> <p style="padding-left: 20px;">T3c: Tumor que se extiende de forma importante en la vena cava por encima del diafragma.</p> <p>T4: Tumor que atraviesa la Fascia de Gerota.</p> <p>Tx: No se puede evaluar el tumor primario.</p>
Ganglios linfáticos (<i>Lymphatic Node = N</i>)
<p>N0: No hay evidencia de ganglios linfáticos afectados.</p> <p>N1: Metástasis en un único ganglio linfático regional.</p> <p>N2: Metástasis en más de un ganglio linfático regional.</p> <p>Nx: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.</p>
Metástasis (<i>Metastasis = M</i>)
<p>M0: No hay metástasis a distancia.</p> <p>M1: Metástasis a distancia.</p> <p>Mx: No se pueden evaluar las metástasis a distancia.</p>

5. Análisis de la expresión génica de los genes que codifican para peptidasas por qRT-PCR

Se analizaron los niveles de mRNA de los genes que codifican para peptidasas por qRT-PCR a tiempo real. Los genes de las peptidasas analizados fueron los siguientes: *ACE*, *ACE2* y *ENPEP* (o gen *APA*). Como genes normalizadores se utilizaron el *TBP* (proteína de unión a la caja TATA), *SDHA* (complejo succinato deshidrogenasa, subunidad A), *PPIA* (peptidilprolil isomerasa A) y *BA* (β -actina).

5.1. Extracción de mRNA

El RNA total de tejido renal se extrajo con el reactivo *Tri-reagent* de Sigma (St. Louis, MO, EEUU) según el protocolo del fabricante, basado en el descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Para ello se homogeneizaron los tejidos en un homogenizador Ultra-turax T8 (Ika-Werke) con 500 μ l de reactivo *Tri-reagent*, a potencia máxima y bajo campana de gases ST 1500 (Burdinola). A continuación, la muestra se centrifugó a 18.228 \times g durante 12 min, empleando una centrífuga 350R (MPW). El sobrenadante que resultó tras la centrifugación se transfirió a tubos *Phase lock gel heavy* 0,5 ml de Eppendorf (Hamburgo, Alemania) y se adicionaron 100 μ l de 1-bromo-3-cloro-propano. Estos tubos poseen una fase acuosa, una interfase y una fase orgánica donde quedan retenidos el RNA, DNA y las proteínas respectivamente. De modo que, tras una centrifugación a 18.228 \times g durante 12 min, la fase acuosa, que contiene el RNA, se transfirió a tubos eppendorf con 500 μ l de isopropanol donde se mantuvieron durante 5 min a 4 $^{\circ}$ C con el objetivo de ayudar en la precipitación del RNA libre de DNA y proteínas. Los tubos eppendorf se agitaron enérgicamente y se centrifugaron a 18.228 \times g durante 12 min.

Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante, y al sedimento resultante se adicionaron 500 μ l de una solución que contenía etanol al 70% (v/v) en agua libre de RNasas (Quiagen, Hilden, Alemania). A continuación, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 18228 \times g durante 5 min. Todo el proceso se realizó a 4 $^{\circ}$ C para preservar la integridad del RNA. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento resultante durante 2 min a 60 $^{\circ}$ C en una estufa (P-Selecta). A continuación, el sedimento se resuspendió en 50 μ l de agua libre de RNasas y se agitó en un vortex. 45 μ l de los 50 μ l se almacenaron en el ultracongelador a -80 $^{\circ}$ C hasta el siguiente paso. Los 5 μ l de RNA restantes se emplearon en una electroforesis realizada para comprobar el estado óptimo del RNA de la muestra tras la extracción.

5.2. Electroforesis en gel de agarosa

La integridad del RNA se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en 49 ml de agua libre de RNasas y 1 ml de tampón TAE [Tris-base 0,4 M; Acido acético 5,7% (v/v); EDTA (Na₂) 10 mM, pH 8,4).

Para ello, se empleó una mezcla que contenía 5 µl de RNA, 5 µl de agua libre de RNasas y 3 µl de azul de bromofenol (al 0,25%, p/v). Las bandas de RNA se separaron mediante una cubeta GNA 100 de Pharmacia Biotech. Se aplicó un voltaje de 140V durante 10 min con una fuente de alimentación LKB-GPS 200/400 de Pharmacia, para que se desnaturalizaran las proteínas. A continuación, se cargó la muestra y se aplicó un voltaje de 120V. A continuación, el gel de agarosa se sumergió en bromuro de etidio (1 µg/ml) diluido en agua destilada, durante 10 min y posteriormente en agua destilada durante 30 min para eliminar el exceso de tinción. Las imágenes de separación electroforética se obtuvieron mediante una placa ultravioleta TC-312 A de Spectroline y un sistema de fotografía Gelprinter de TDI (Figura 6).

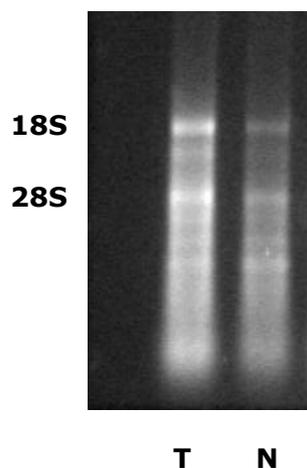


Figura 6: Imagen representativa de la separación electroforética del RNA purificado en gel de agarosa y de las bandas de RNA ribosómico 18S y 28S. T: tejido tumoral y N: tejido no neoplásico adyacente al tumor.

5.3. Tratamiento con DNasa I

Se realizó un tratamiento con DNasa I para eliminar del RNA extraído la contaminación con DNA genómico. Para ello se utilizó la mezcla descrita en la Tabla 6.

Tabla 6: Composición de la mezcla de reacción empleada para el tratamiento con DNasa I. Los volúmenes están referidos a una muestra.

Tris HCl	2 μ l (1 M pH 7,5)
MgCl ₂	0,6 μ l (1 M)
DNasa I	0,36 μ l (10.000 U/ml)
Inhibidor de RNasas	0,14 μ l (21.500 U/ml)
H ₂ O libre de RNasas	21,9 μ l

Así, a 25 μ l de muestra se adicionaron 25 μ l del tratamiento, la mezcla resultante se agitó en un *vortex* a baja velocidad. A continuación, la mezcla se incubó a 37 °C durante 10 min en un termobloque D 1200 de Labnet.

Para realizar una purificación del RNA se empleó el kit *RNA Clean-Up Kit-5* de Zymo Research (California, EEUU) y se siguieron las instrucciones del fabricante. A los 50 μ l de mezcla (muestra con tratamiento DNasa I) se adicionaron 200 μ l de tampón de unión. El volumen de mezcla resultante se pasó por una columna *Zymo-Spin* acoplada a un tubo colector, ambas incluidas en el kit, se centrifugó a 14.000 \times g, a temperatura ambiente y durante 1 min en una centrífuga Eba 12 de Hettich zentrifugen. A continuación, se adicionaron a la columna 350 μ l de tampón de lavado y se centrifugó a 14.000 \times g, a temperatura ambiente y durante 1 min, este paso de lavado se repitió dos veces. Por último, se adicionaron 50 μ l de agua libre de RNasas y se sustituyó el tubo colector por un tubo eppendorf donde se recogió la muestra eluída tras una centrifugación en las condiciones mencionadas en el paso anterior.

5.4. Cuantificación de mRNA

La concentración de RNA de las muestras se determinó utilizando un espectrofotómetro *LKB Gene ATAQ Controller* de Pharmacia. Para ello, se tomaron 5 μ l de la solución con RNA y se resuspendieron en 45 μ l de agua libre de RNasas. Se calculó la concentración original de la muestra a partir de las unidades de densidad óptica obtenidas a 260 nm (una densidad óptica corresponde a 40 μ g/ml).

5.5. Síntesis de cDNA

Para realizar la retrotranscripción (RT) se tomaron 8 μ g de RNA libre de DNA genómico, se mezcló con 1 μ l de hexámeros (*Random hexamer*, Amersham

Bioscience, Buckinghamshire, UK) al azar como cebadores y se llevó a un volumen de 35 µl con agua libre de RNasas. La mezcla se incubó en un termociclador PTC-100 de MJ Research durante 10 min a 65 °C para desnaturalizar el RNA y los cebadores. Tras la incubación, las muestras se mantuvieron en hielo y rápidamente se adicionaron 15 µl del preparado de la reacción de cDNA. El volumen final de reacción (50 µl) con la composición mostrada en la Tabla 7 se introdujo de nuevo en el termociclador con el siguiente programa: 70 min a 37 °C, 2 min a 94 °C y 5 min a 22 °C. El cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Tabla 7: Composición de la mezcla de reacción empleada para la síntesis de cDNA. Los volúmenes están referidos a una muestra.

Hexámeros	1 µl (265 ng)
mRNA	0,24 µg/µl
dNTPs	2,5 µl (10 mM)
Tampón de reacción 5x	10 µl
Transcriptasa Reversa (M-MLV)	1 µl (25.000 U/ml)
Inhibidor de RNasas	1 µl (21.500 U/ml)
H ₂ O libre de RNasas	0.5 µl

5.6. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

Los niveles de mRNA en la muestra se determinaron por PCR cuantitativa a tiempo real, para ello se utilizaron los cebadores que aparecen en la Tabla 8.

Tabla 8: Cebadores empleados en la PCR. Los oligonucleótidos presentes en la Tabla fueron diseñados con el software Primer 3 y suministrados por Sigma-Genosys (Cambridge, UK).

Símbolo del Gen	Cebador Sentido	Cebador Antisentido	pb
<i>ACE</i>	5'-CGAACCCACTTTGATGCTG-3'	5'-GAGAAGTGGAGGTGGATGGTCT-3'	112
<i>ACE2</i>	5'-CCTCATAGCCTGCCTCCTTG-3'	5'-GAACAGAGATGCGGGGTCA-3'	133
<i>ENPEP</i>	5'-CGGAGAACGGACAAGTCAAG-3'	5'-CGGAGAACGGACAAGTCAAG-3'	133
HKG			
<i>TBP</i>	5'-GGATAAGAGAGCCACGAACCAC-3'	5'-TTAGCTGAAAACCCAACCTTCTG-3'	139
<i>SDHA</i>	5'-TCTGCCACACCAGCACT-3'	5'-CCTCTCCACGACATCCTTCC-3'	142
<i>PPIA</i>	5'-GGTCCCAAAGACAGCAGAAAA-3'	5'-TCACCACCCTGACACATAAACC-3'	114
<i>ACTB</i>	5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3'	5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAG-3'	362

Para la determinación de la expresión de los genes indicados en la Tabla 8, se utilizaron 5 μ l de cDNA (25 ng), 0,4 μ l de la mezcla de cebadores, 2,1 μ l de agua Milli-Q autoclavada y 7,5 μ l de *SensiMixPlus SYBR & Fluorescein* (Quantace, London, UK). La mezcla de reacción empleada contiene *SYBR Green I*, un fluorocromo inespecífico que se une a la doble cadena de DNA y detecta su generación exponencial, tras ser excitado mediante luz azul (λ max = 488 nm), por la emisión de luz verde (λ max= 522 nm) como muestra la Figura 7 (Zipper y cols., 2004). Para el análisis de PCR se empleó un termociclador *Lightcycler* de Bio-Rad (Hércules, PA, EEUU) acoplado a un sistema informático que emplea el *software iCYCLER iQ*. El proceso constó de una desnaturalización inicial de 10 min a 94 °C, y tres incubaciones posteriores de, 10 s a 94 °C, 20 s a 60 °C y 30 s a 72 °C para 40 ciclos.

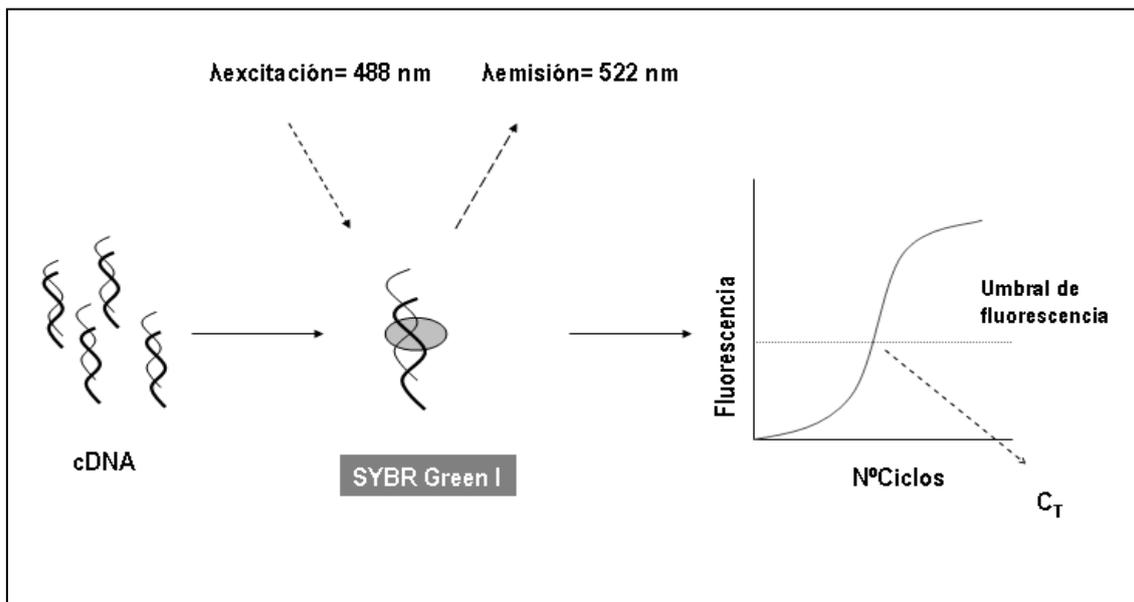


Figura 7: Representación gráfica de la unión del fluorocromo (SYBR Green I) a la cadena de DNA y detección de su generación exponencial. C_T : ciclo umbral.

Una vez concluida la reacción, se obtuvieron los C_T (Ciclo umbral), correspondientes a los niveles transcripcionales de cada gen, tanto en la muestra de tejido tumoral como en la de tejido no neoplásico adyacente al tumor. Estos valores se obtienen a partir de la representación de la intensidad de la fluorescencia frente al número de ciclos de PCR. El valor C_T es el número de ciclos a los cuales la señal de fluorescencia de una muestra cruza la línea umbral, y es inversamente proporcional a la cantidad de DNA de partida (Figura 7). Todas las muestras se ensayaron por triplicado y se calculó la media y la desviación estándar. La conversión de las C_T en valores relativos de cantidad se realizó

mediante la siguiente fórmula a todos los valores: Nivel de expresión relativa = $2^{-\Delta\Delta C_T}$, donde el $\Delta C_T = (C_T \text{ gen diana} - C_T \text{ gen de referencia})$ y $\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T \text{ muestra} - \Delta C_T \text{ muestra control})$. De esta manera se normaliza la cantidad de mRNA de cada una de las muestras con respecto a la muestra control.

6. Tratamiento estadístico y ajuste de datos

Todo el tratamiento estadístico fue realizado con el programa SPSS 19.0 (IBM).

En primer lugar, se realizaron Pruebas de Normalidad (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) para saber si los resultados cuantitativos tenían una distribución normal o no. Posteriormente, los resultados de actividad y niveles de mRNA en el tejido renal neoplásico se compararon con lo obtenido en el tejido renal normal adyacente. Además, los datos en el CCRCC se estratificaron en función del grado y estadio, y según el diámetro del tumor. Basándonos en la información obtenida de las Pruebas de Normalidad, se emplearon pruebas no paramétricas para realizar estas comparaciones (Test de Mann-Whitney y Rho de Spearman). Por último, se realizaron Test Log-rank y Curvas de Kaplan-Meier para evaluar la asociación entre la actividad de estas enzimas y la supervivencia a los 5 años de los pacientes con CCRCC. Se compararon grupos creados por puntos de corte basándonos en los valores de la mediana de cada una de las actividades.

Los resultados cuantitativos obtenidos en los análisis experimentales se expresaron como la media \pm error estándar (ES). Las diferencias significativas se indican de la siguiente manera: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

IV. Resultados

Antes de realizar todo el tratamiento estadístico comparativo, se hizo una Prueba de Normalidad de los datos de actividad y de niveles de mRNA. En todos los casos, para las 3 enzimas analizadas, el estadístico demostró que los datos no seguían una distribución normal (*Prueba de Shapiro-Wilk*: $p < 0.05$ para los datos de actividad; $p < 0.001$ para los datos de la PCR cuantitativa). Por este motivo, todo el análisis estadístico posterior fue realizado mediante *pruebas no paramétricas*.

Para una mejor comprensión del apartado de Resultados y la posterior Discusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral se describen en dos grandes grupos:

En el primero, se muestran aquellos datos que pueden tener relación con el proceso de transformación neoplásica del riñón. Es decir, se describen la actividad fluorimétrica, la expresión inmunohistoquímica y los niveles de mRNA de la ACE, ACE2 y APA en el tejido tumoral de CCRCC, ChRCC y RO, comparándolas con el tejido no neoplásico adyacente al tumor.

En el segundo apartado se muestran los datos que puedan correlacionarse con el crecimiento, la agresividad y el pronóstico de la neoplasia renal más frecuente, el CCRCC. Para ello, se estratificaron los datos de actividad y expresión génica según el grado histológico y estadio del tumor, y según el diámetro tumoral. También se realizaron estudios de supervivencia a los 5 años, correlacionando los datos de actividad con los índices de supervivencia de los pacientes.

Todos los datos numéricos (medias y errores estándar) representados en las figuras de este apartado de Resultados se encuentran especificados en los Anexos que acompañan este documento.

1. Datos relacionados con transformación neoplásica: Actividad enzimática, localización tisular y expresión génica en tejido neoplásico renal y tejido no tumoral adyacente

1.1. Enzima convertidora de angiotensina (ACE)

1.1.1. Actividad enzimática

La Figura 1 muestra la actividad enzimática de ACE en la fracción de membrana de los distintos tejidos analizados (no se detectó actividad en la fracción soluble).

La actividad fue significativamente inferior en el tejido tumoral respecto al tejido no neoplásico en todos los casos estudiados, en CCRCC (4 veces), ChRCC (3 veces) y RO (5 veces).

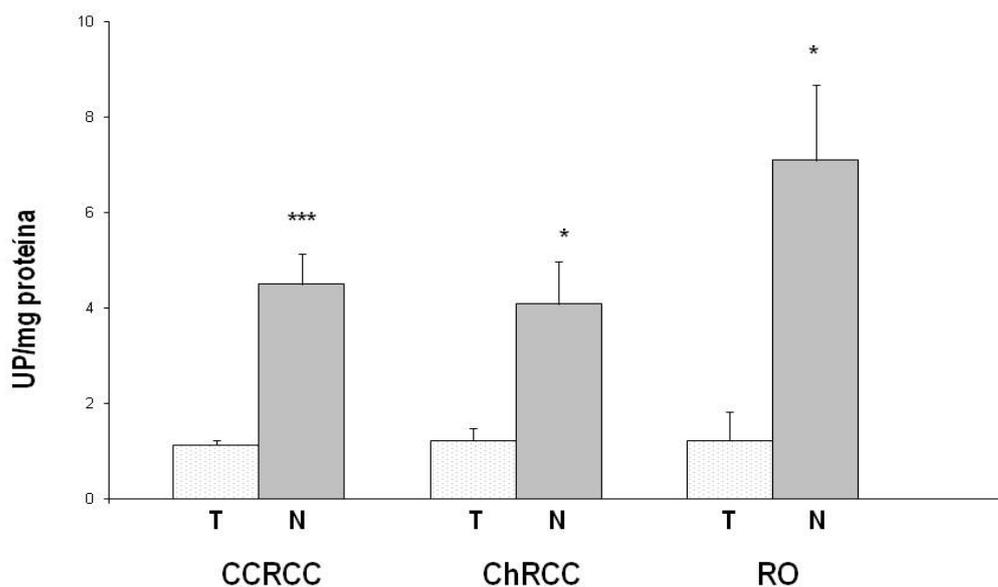


Figura 1: Actividad enzimática de ACE medida en la Fracción de Membrana de tejido tumoral □ (CCRCC, ChRCC y RO) y sus respectivos tejidos no neoplásico ■. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Se representan la media ± error estándar (ES) y los valores estadísticamente significativos mediante el Test de Mann-Whitney (***p<0,001; *p<0,05). CCRCC (n=45), ChRCC (n=8) y RO (n=8).

1.1.2. Localización tisular

La Figura 2 muestra la expresión inmunohistoquímica de la ACE en los 3 subtipos de neoplasias renales y en el tejido no tumoral adyacente. En este último, se tiñeron intensamente los túbulos proximales. Sin embargo, el inmunomarcaje desapareció en las células tumorales de todos los histotipos analizados.

Por otro lado, la ACE se expresaba en los nuevos vasos en formación en el CCRCC (Figura 3).

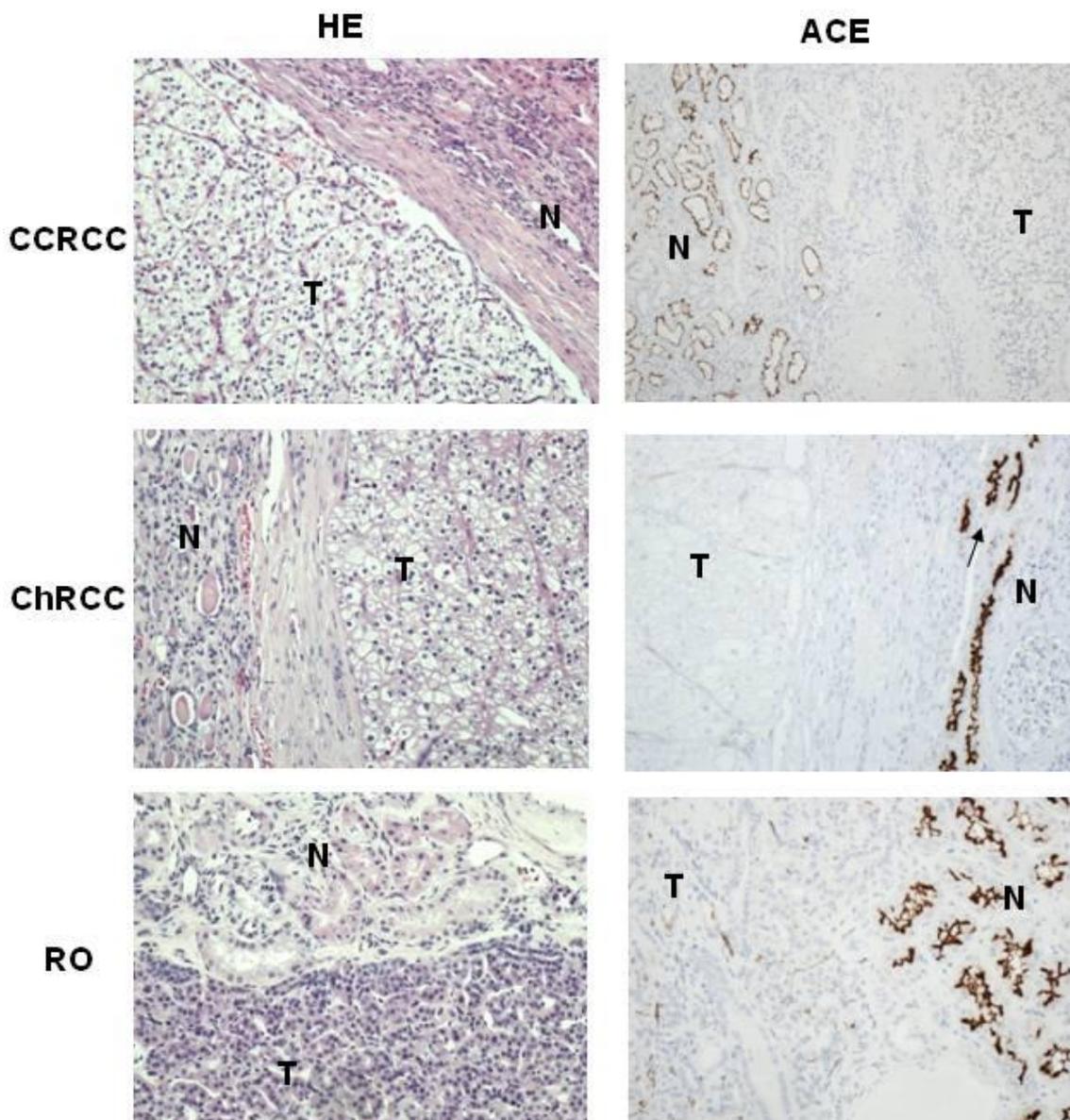


Figura 2: Inmunohistoquímica de la ACE en neoplasias renales. Tinción en hematoxilina eosina (HE) y tinción ACE en CCRCC, ChRCC y RO. Aumentos: 200X. T: tumor; N: no neoplásico.

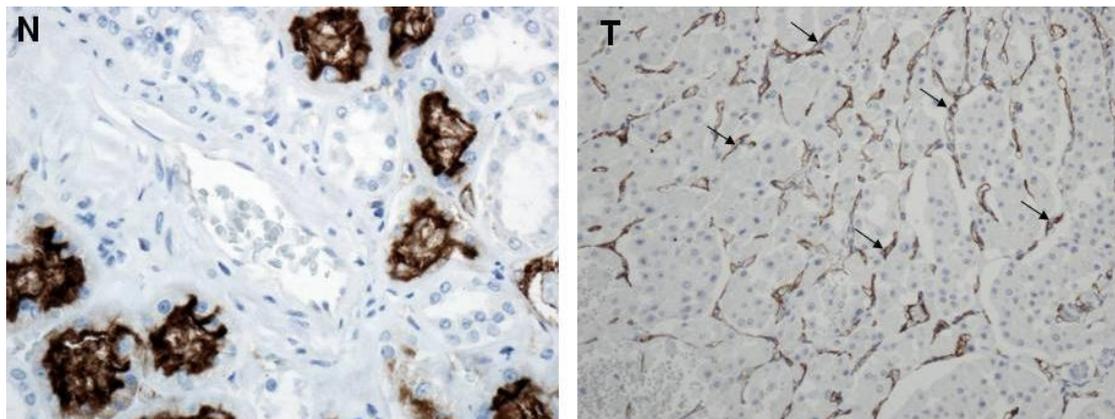


Figura 3: Inmunohistoquímica de la ACE en tejido renal no tumoral y en el CCRCC. Aumentos: 400X. N: no neoplásico; T: tumor. Las flechas indican neoexpresión de ACE en las células endoteliales de los vasos del tumor.

1.1.3. Expresión génica

Los niveles de expresión de mRNA de *ACE* se muestran en la Figura 4. Aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, en el CCRCC la expresión génica de *ACE* fue algo mayor en el tejido tumoral que en el tejido no neoplásico. En ChRCC fue inferior y en RO fue similar.

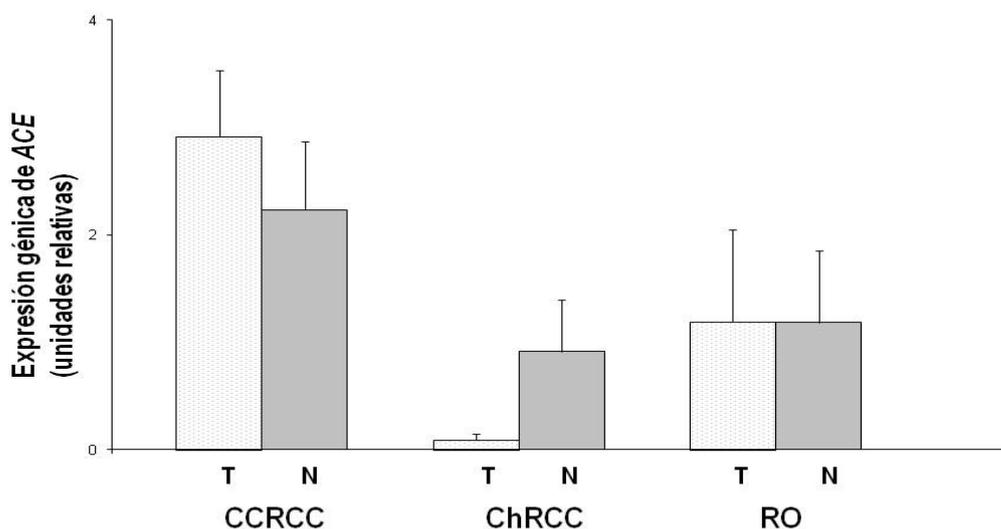


Figura 4: Niveles de mRNA de ACE medidos en tejido tumoral □ (CCRCC, ChRCC y RO) y sus respectivos tejidos no neoplásicos ■. Los datos de qRT-PCR para cada muestra analizada se expresan en unidades relativas calculadas. Se representan la media \pm ES. CCRCC (n=25), ChRCC (n=4) y RO (n=4)

1.2. Enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2)

1.2.1. Actividad enzimática

La Figura 5 muestra la actividad de ACE2 en la fracción unida a membrana de los riñones estudiados (no se detectó en la fracción soluble). La actividad enzimática fue significativamente menor en el tejido tumoral que en el tejido no neoplásico en todas las neoplasias analizadas: CCRCC (1.5 veces), ChRCC (4 veces) y RO (2.5 veces).

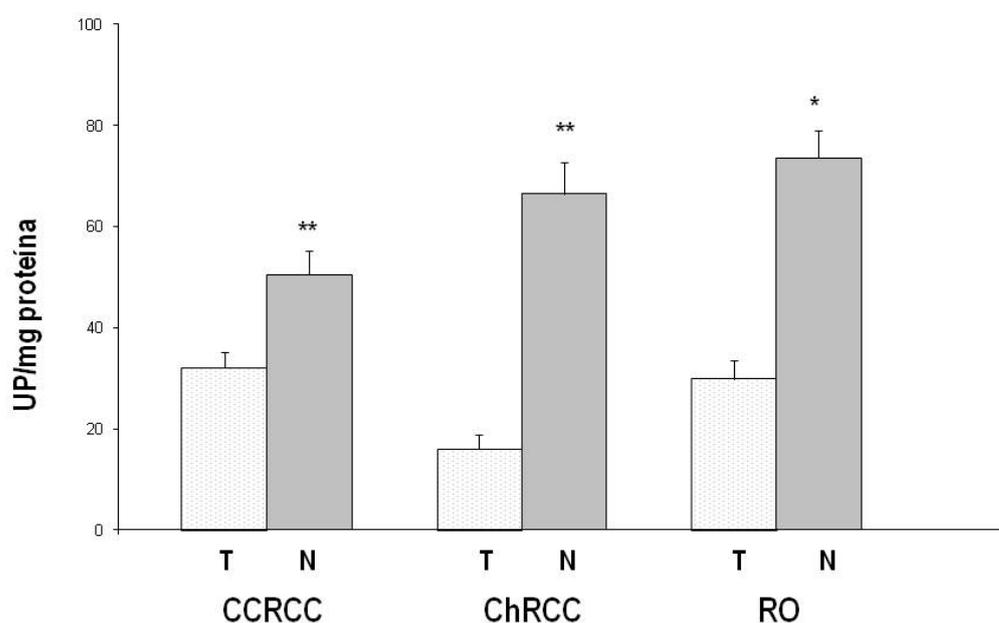


Figura 5: Actividad enzimática de ACE2 medida en la Fracción de Membrana del tejido tumoral □ (CCRCC, ChRCC y RO) y sus respectivos tejidos no neoplásicos ■. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Se representan la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos mediante el Test de Mann-Whitney (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). CCRCC (n=45), ChRCC (n=8) y RO (n=8).

1.2.2. Localización tisular

Tal y como puede verse en la Figura 6, la ACE2 también se expresó de forma intensa en los túbulos proximales del riñón no tumoral. A nivel neoplásico se observó una tinción moderada en el CCRCC, mientras que fue negativa en ChRCC y RO.

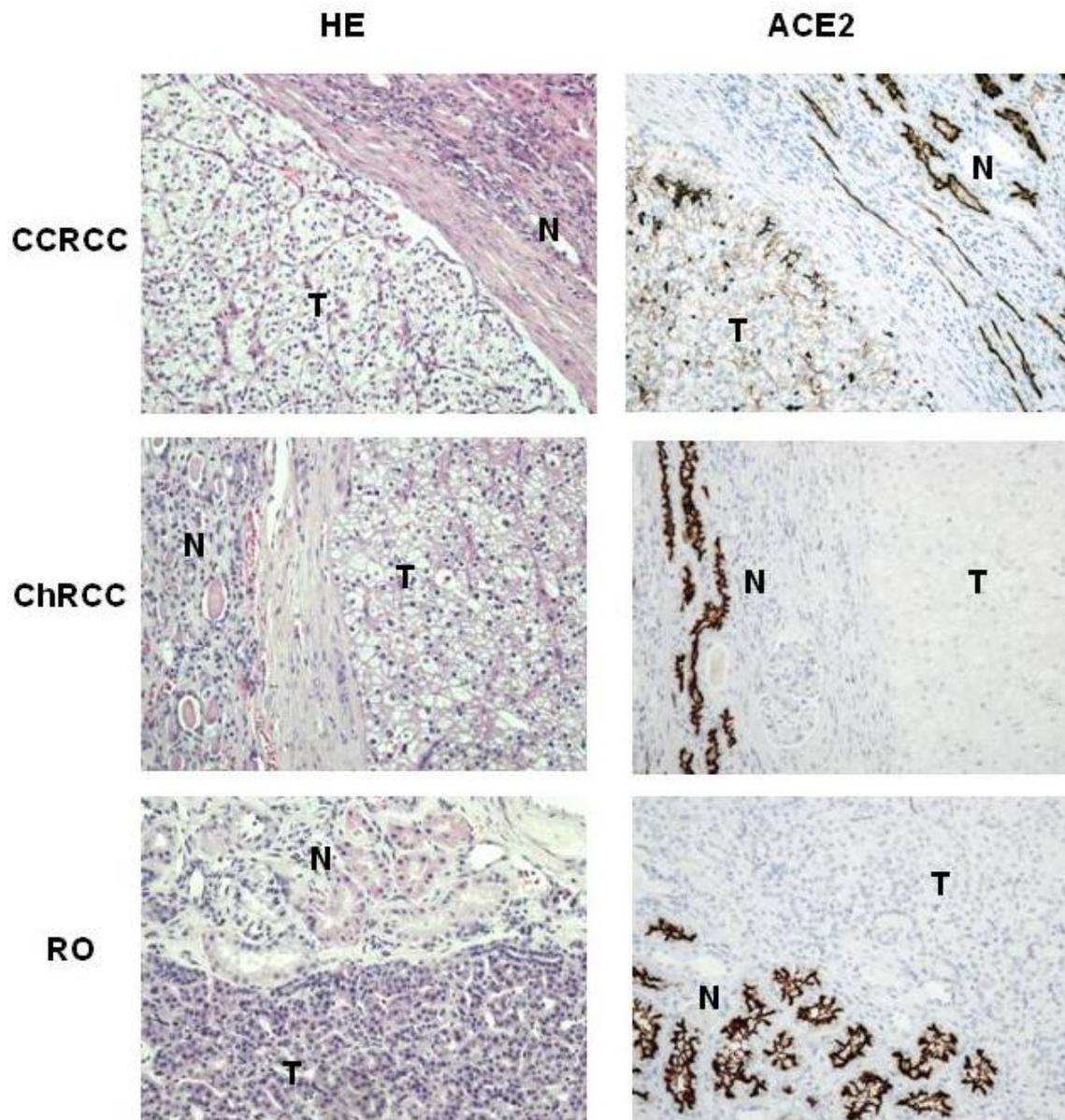


Figura 6: Inmunohistoquímica de la ACE2 en neoplasias renales. Tinción en hematoxilina eosina (HE) y tinción ACE2 en CCRCC, ChRCC y RO. Aumentos: 200X. T: tumor; N: no neoplásico.

1.2.3. Expresión génica

Se cuantificaron los niveles de mRNA de *ACE2* en los distintos tejidos objeto de estudio (Figura 7).

La expresión génica de *ACE2* fue menor en el tejido tumoral que en el tejido no neoplásico de ChRCC y RO, y mayor en CCRCC. Aunque al analizar el tejido tumoral de ChRCC y RO se encontraron diferencias varios órdenes de magnitud inferiores a su correspondiente tejido no neoplásico, estas sólo fueron estadísticamente significativas en ChRCC ($p < 0,05$).

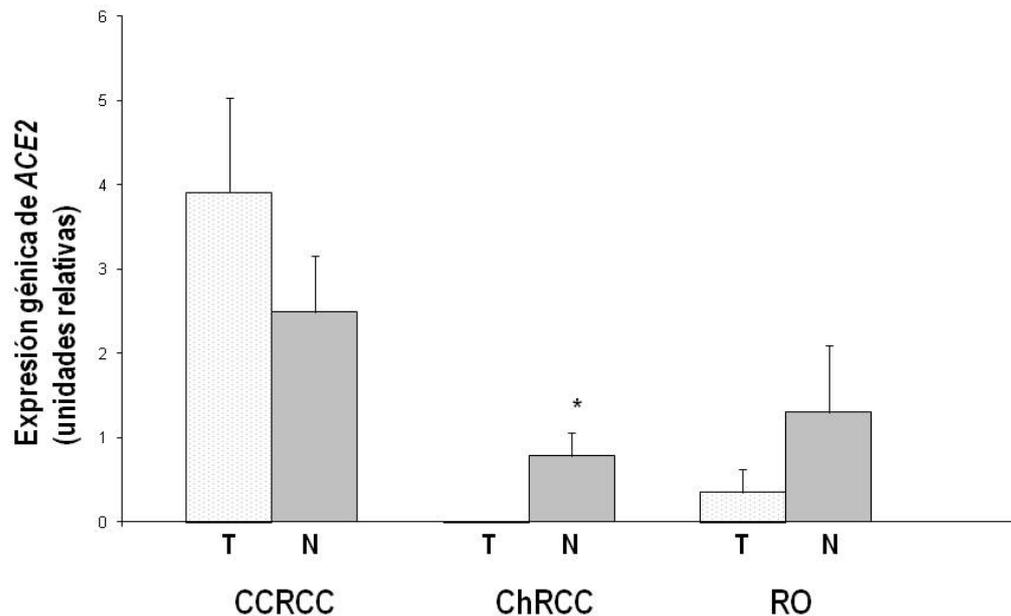


Figura 7: Niveles de mRNA de ACE2 medidos en tejido tumoral □ (CCRCC, ChRCC y RO) y sus respectivos tejidos no neoplásicos ■. Los datos de qRT-PCR para cada muestra analizada se expresan en unidades relativas. Se representan la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos mediante el Test de Mann-Whitney (* $p < 0,05$). CCRCC (n=25), ChRCC (n=4) y RO (n=4).

1.3. Aminopeptidasa A (APA)

1.3.1. Actividad enzimática

La actividad enzimática correspondiente a APA se detectó tanto en la Fracción unida a Membrana como en la Fracción Soluble de los tejidos sujetos a estudio.

La Figura 8 muestra la actividad enzimática de APA en la fracción unida a membrana. Los resultados mostraron una actividad significativamente inferior en el tejido tumoral que en el tejido no neoplásico para todos los casos analizados. Merece la pena destacar que mientras en CCRCC la actividad fue 2 veces inferior, en ChRCC y RO fue 15 y 33 veces menor que en el tejido no tumoral, respectivamente.

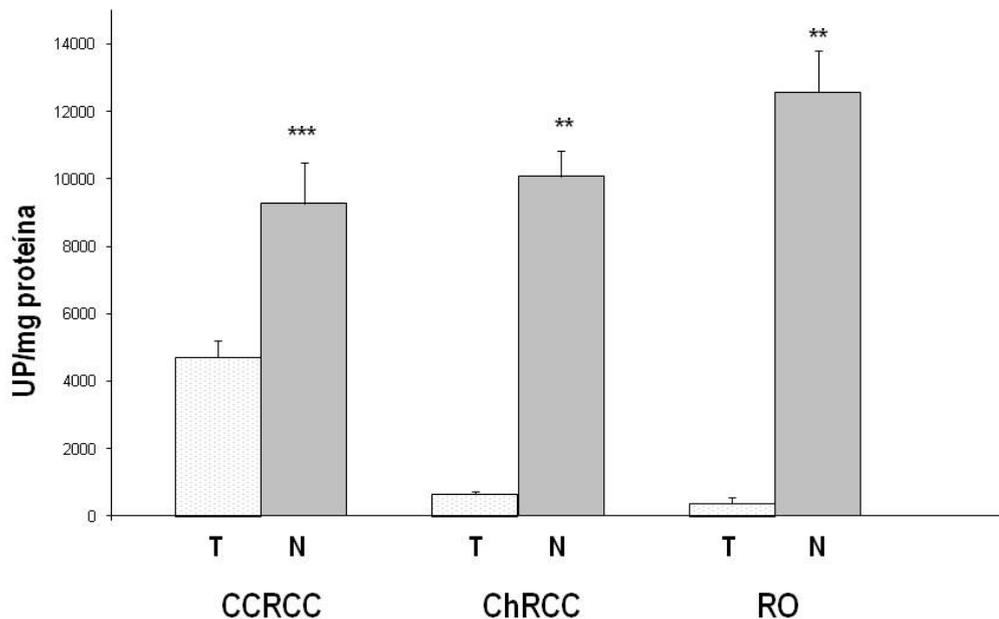


Figura 8: Actividad enzimática de APA medida en la Fracción de Membrana de tejido tumoral □ (CCRCC, ChRCC y RO) y sus respectivos tejidos no neoplásicos ■. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Se representan la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos mediante el Test de Mann-Whitney (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). CCRCC (n=50), ChRCC (n=8) y RO (n=8).

La Figura 9 muestra la actividad enzimática de APA en la Fracción Soluble. En este caso también se observaron actividades significativamente menores en los tumores respecto al tejido no neoplásico, aunque no reflejaron el gradiente observado en la APA de membrana.

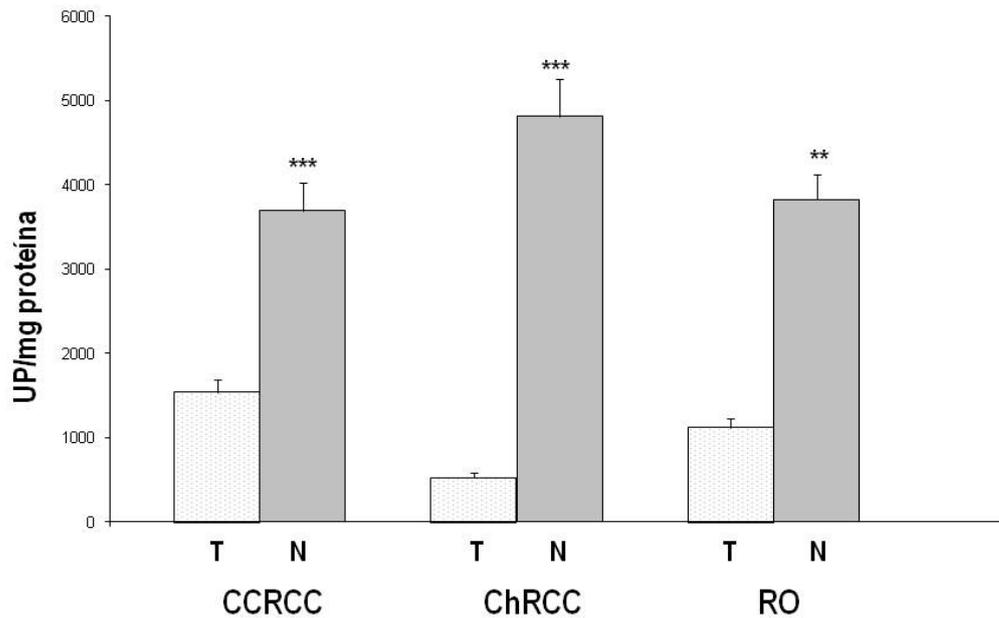


Figura 9: Actividad enzimática de APA medida en la Fracción Soluble de tejido tumoral □ (CCRCC, ChRCC y RO) y sus respectivos tejidos no neoplásicos ■. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Se representan la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos mediante el Test de Mann-Whitney (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). CCRCC (n=50), ChRCC (n=8) y RO (n=8).

1.3.2. Localización tisular

La Figura 10 muestra el inmunomarcaje de la APA en el tejido renal no neoplásico. Este fue muy intenso en los túbulos proximales y ligeramente positivo en los distales y los glomérulos.

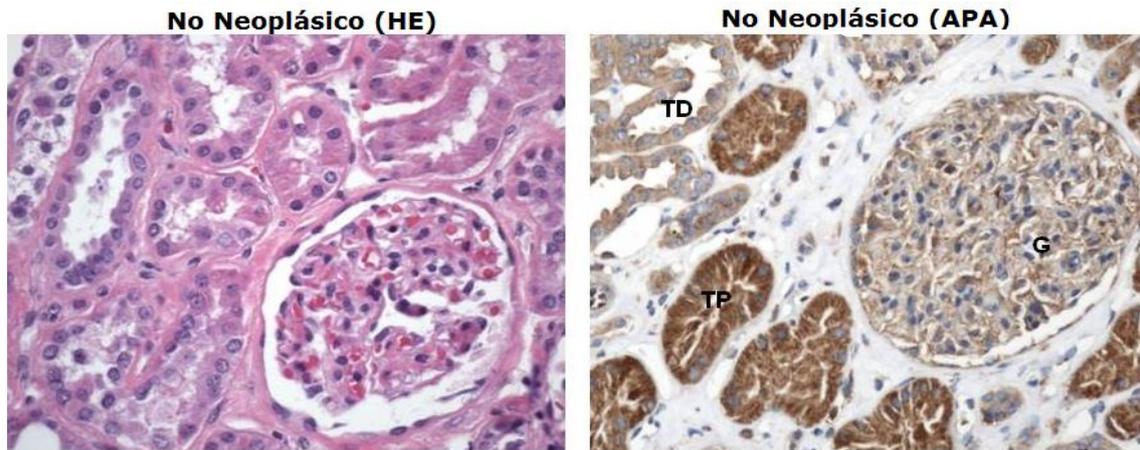


Figura 10: Inmunohistoquímica de la APA en tejido renal no neoplásico. Aumentos: 400X. TP: túbulo proximal; TD: túbulo distal; G: glomérulo.

Por otro lado, al analizar las neoplasias renales (Figura 11-12), la tinción se mostró moderadamente positiva en los 3 subtipos. En el CCRCC la APA se localizaba fundamentalmente en la superficie de la membrana, mientras que en ChRCC y RO se marcaba difusamente a nivel citoplásmico. En la figura 12 puede verse la transición entre tejido no neoplásico, intensamente marcado, y el CCRCC, moderadamente positivo.

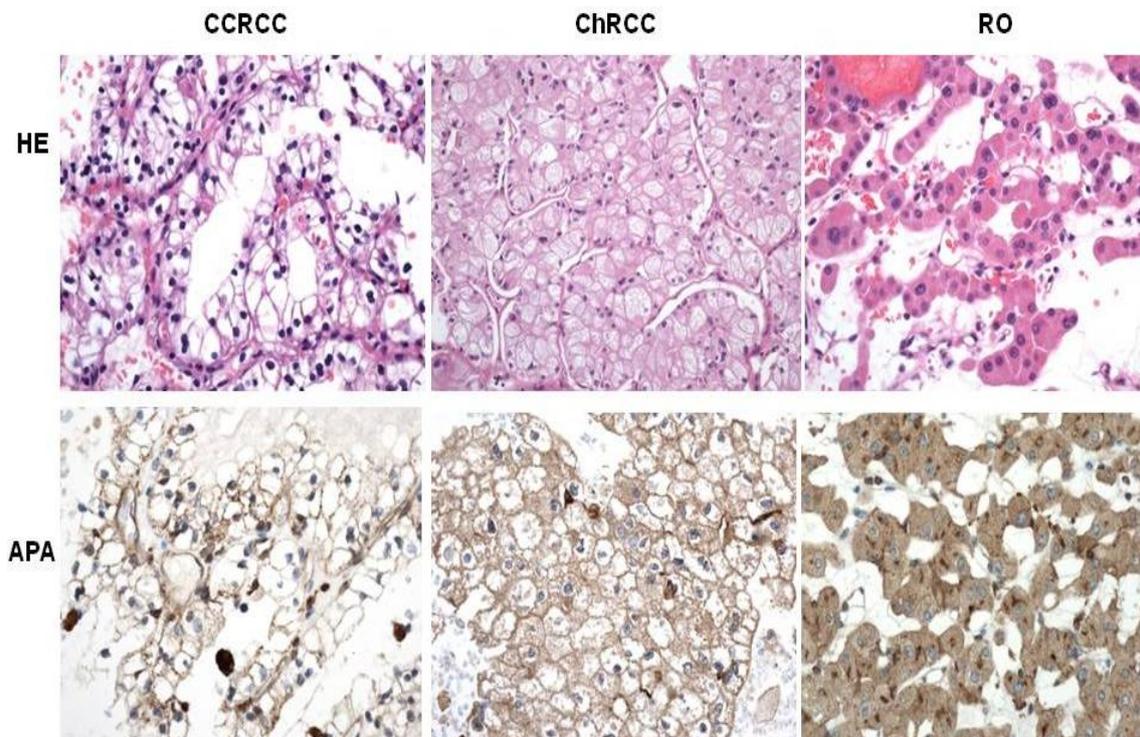


Figura 11.: Inmunohistoquímica de la APA en neoplasias renales. Tinción en hematoxilina eosina (HE) y tinción APA en CCRCC, ChRCC y RO. Aumentos: 400X.

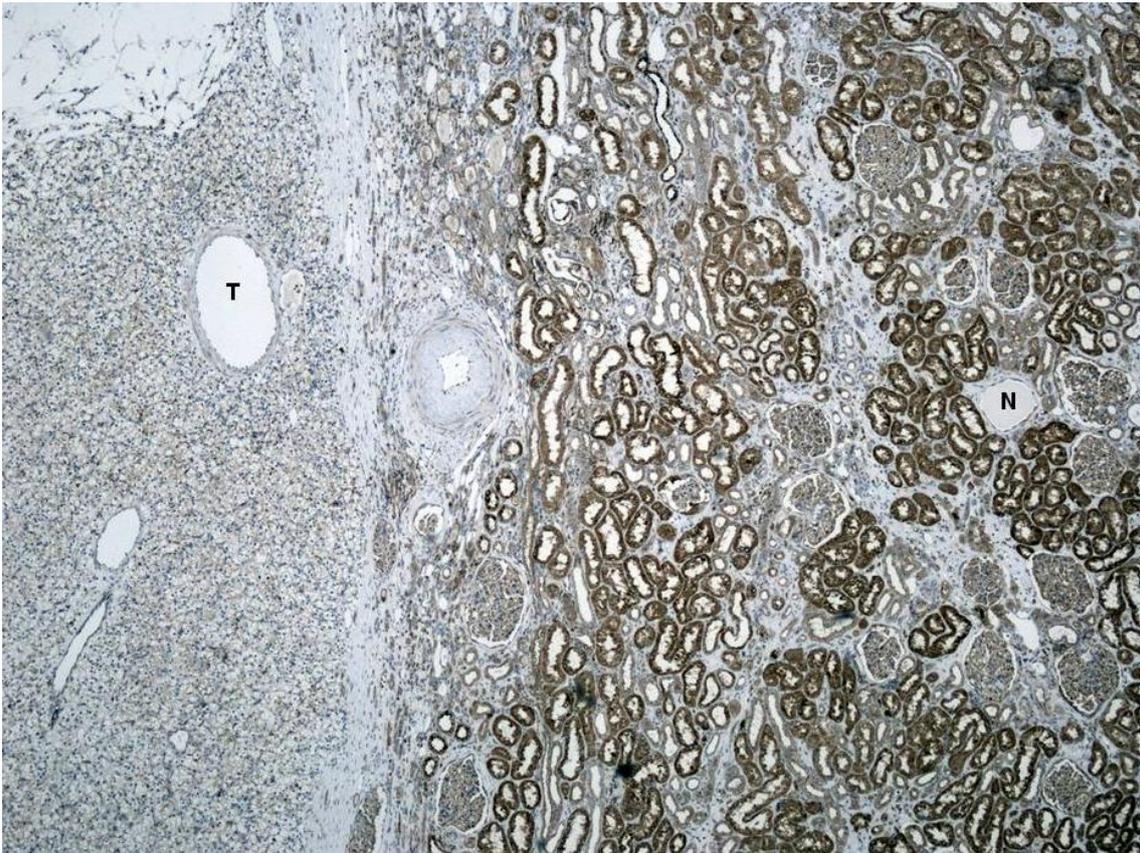


Figura 12: Inmunohistoquímica de la APA en CCRCC. Transición entre el parénquima renal no neoplásico (N) (a la derecha), intensamente marcado, y el tejido tumoral (T) (a la izquierda), moderadamente positivo. Aumentos: 200X.

1.3.3. Expresión génica

Los niveles de mRNA de *APA* se cuantificaron en los distintos tejidos objeto de estudio (Figura 13).

La expresión génica de *APA* fue significativamente mayor en CCRCC que en su tejido no neoplásico circundante. Sin embargo, en ChRCC y RO los niveles de mRNA en el tejido tumoral fueron marcadamente inferiores al tejido no neoplásico.

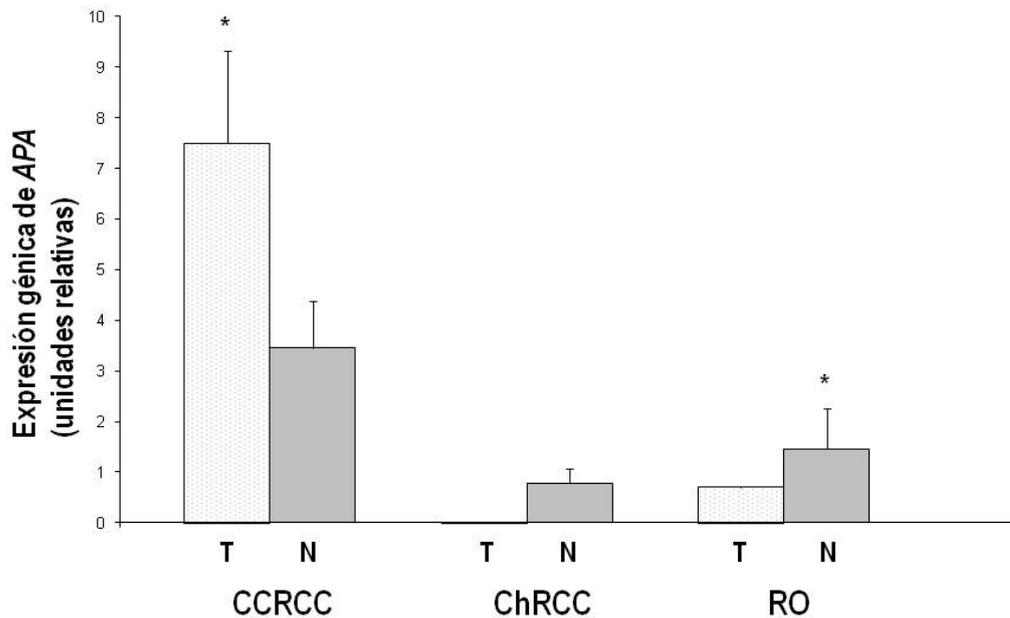


Figura 13: Niveles de mRNA de APA medidos en tejido tumoral □ (CCRCC, ChRCC y RO) y sus respectivos tejidos no neoplásicos ■. Los datos de qRT-PCR para cada muestra analizada se expresan en unidades relativas. Se representan la media ± ES y los valores estadísticamente significativos mediante el Test de Mann-Whitney (* $P < 0.05$). CCRCC (n=25), ChRCC (n=4) y RO (n=4).

2. Datos relacionados con la progresión, la agresividad y el pronóstico de los CCRCC

2.1. Estratificación de los datos de actividad en función del grado histológico y el estadio

2.1.1. Actividad de la ACE

La actividad enzimática de ACE fue significativamente mayor en los CCRCC de grado alto (G3-G4) que en los de grado bajo (G1-G2). Sin embargo, no se observaron diferencias destacables al estratificar la actividad en estadios (Figura 14).

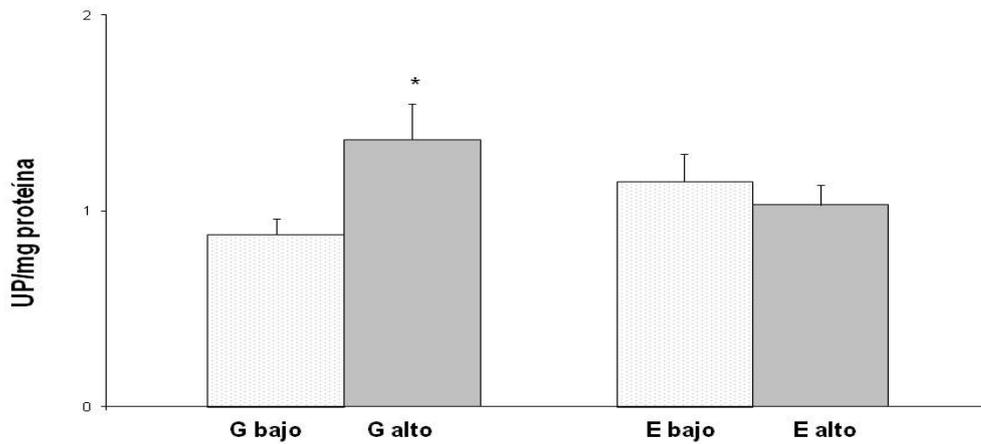


Figura 14: Actividad enzimática de ACE en grado y estadio bajo □ y alto ■ medida en la Fracción de Membrana de muestras de CCRCC. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Se representan la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos mediante el Test de Mann-Whitney ($*p < 0,05$). Grado Bajo (n=23) y Grado Alto (n=22). Estadio Bajo (n=30) y Estadio Alto (n=15).

2.1.2. Actividad de ACE2

No se observaron diferencias destacables al estratificar la actividad ACE2 en grados y estadios (Figura 15).

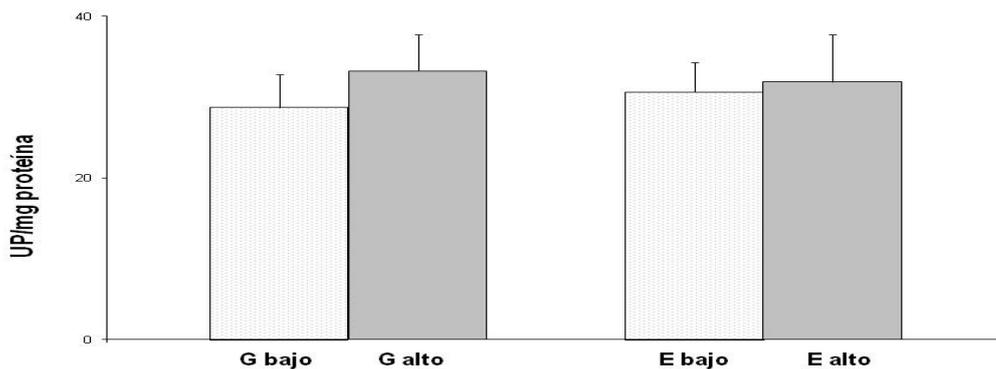


Figura 15: Actividad enzimática de ACE2 en grado y estadio bajo □ y alto ■ medida en la Fracción de Membrana de muestras de CCRCC. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Se representan la media \pm ES. Grado Bajo (n=23) y Grado Alto (n=22). Estadio Bajo (n=30) y Estadio Alto (n=15).

2.1.3. Actividad de la APA

La actividad enzimática de APA, en la fracción unida a membrana, no varió según el grado y el estadio del CCRCC (Figura 16).

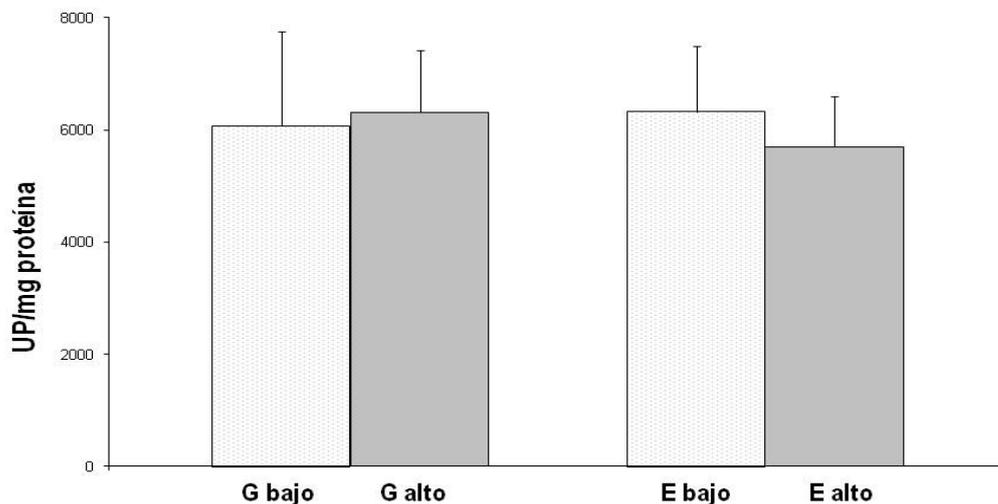


Figura 16: Actividad enzimática de APA en grado y estadio bajo □ y alto ■ medida en la Fracción de Membrana de muestras de CCRCC. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Se representan la media \pm ES. Grado Bajo (n=24) y Grado Alto (n=26). Estadio Bajo (n=33) y Estadio Alto (n=17).

Sin embargo, la actividad APA detectada en la fracción soluble fue significativamente superior en los tumores de grado alto que en los de grado bajo. No se observaron diferencias destacables al estratificar la actividad APA soluble en estadios (Figura 17).

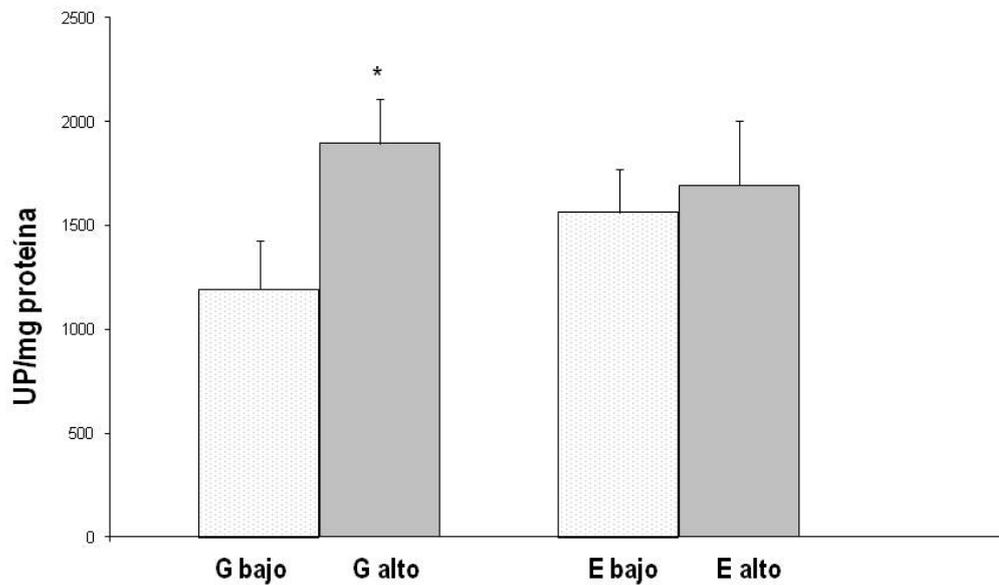


Figura 17: Actividad enzimática de APA en grado y estadio bajo □ y alto ■ medida en la Fracción soluble de muestras de CCRCC. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por mg de proteína. Se representan la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos mediante el Test de Mann-Whitney (* $p < 0,05$). Grado Bajo ($n=24$) y Grado Alto ($n=26$). Estadio Bajo ($n=33$) y Estadio Alto ($n=17$).

2.2. Estratificación de los datos de expresión génica en función del grado histológico y el estadio

Los niveles de mRNA de *ACE*, *ACE2* y *APA* no variaron significativamente en el CCRCC al estratificarlos según el grado y el estadio, como puede observarse en los gráficos siguientes (Figuras 18 a 20).

2.2.1. Expresión génica de la ACE

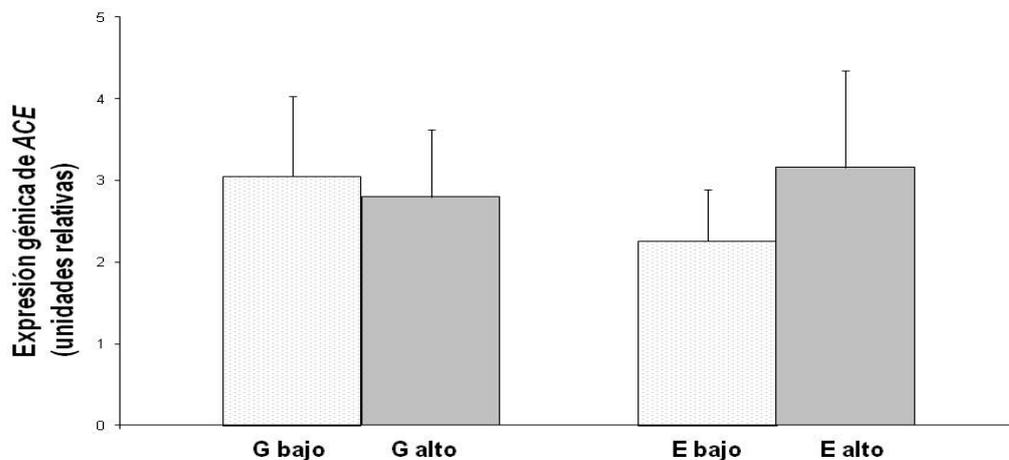


Figura 18: Niveles de mRNA de ACE medidos en CCRCCs de Grado y Estadio bajo □ y alto ■. Los datos de qRT-PCR para cada muestra analizada se expresan en unidades relativas. Se representan la media \pm ES. Grado Bajo (n=12) y Grado Alto (n=13). Estadio Bajo (n=15) y Estadio Alto (n=10).

2.2.2. Expresión génica de la ACE2

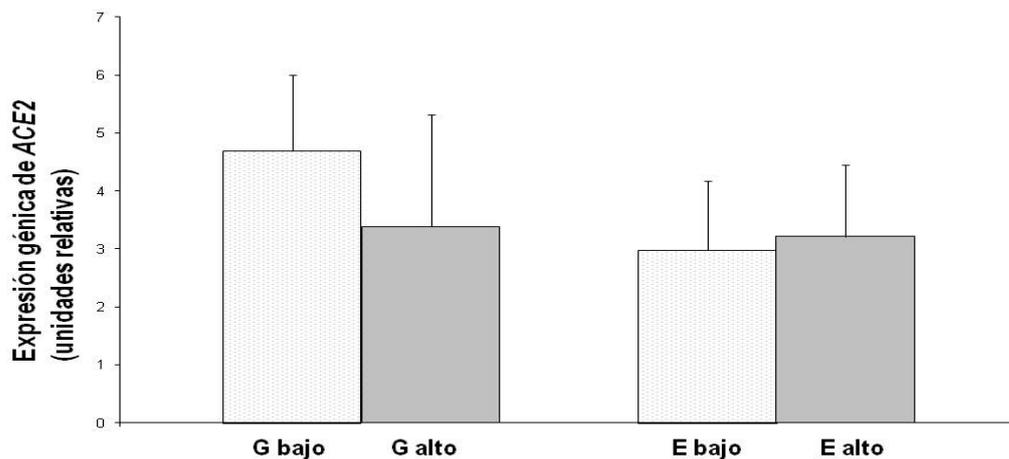


Figura 19: Niveles de mRNA de ACE2 medidos en CCRCCs de Grado y Estadio bajo □ y alto ■. Los datos de qRT-PCR para cada muestra analizada se expresan en unidades relativas. Se representan la media \pm ES. Grado Bajo (n=12) y Grado Alto (n=13). Estadio Bajo (n=15) y Estadio Alto (n=10).

2.2.3. Expresión génica de la APA

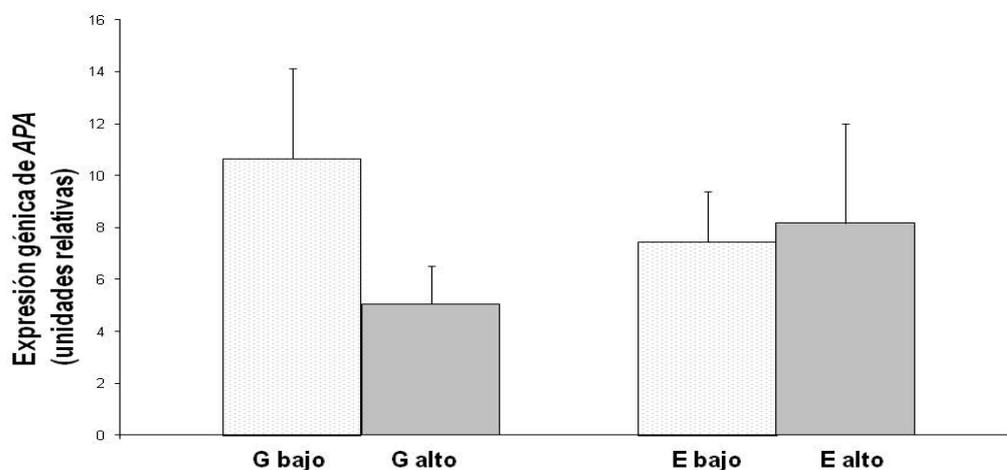


Figura 20: Niveles de mRNA de APA medidos en CCRCCs de Grado y Estadio bajo □ y alto ■. Los datos de qRT-PCR para cada muestra analizada se expresan en unidades relativas. Se representan la media ± ES. Grado Bajo (n=12) y Grado Alto (n=13). Estadio Bajo (n=15) y Estadio Alto (n=10).

2.3. Relación entre la actividad y los niveles de mRNA y el diámetro tumoral (CCRCC)

Para conocer si la actividad o los niveles de mRNA de las enzimas cambia en función del diámetro tumoral se realizaron dos pruebas estadísticas.

Por un lado, el estudio de correlación (Rho de Spearman) mostró que la actividad de la APA unida a membrana es mayor cuanto mayor es el diámetro tumoral ($p < 0.05$), dato que se representa en la Figura 21. El resto de actividades no revelaron cambios significativos ($p > 0.05$). Tampoco observamos cambios en los niveles de mRNA al compararlos con el diámetro del tumor ($p > 0.05$).

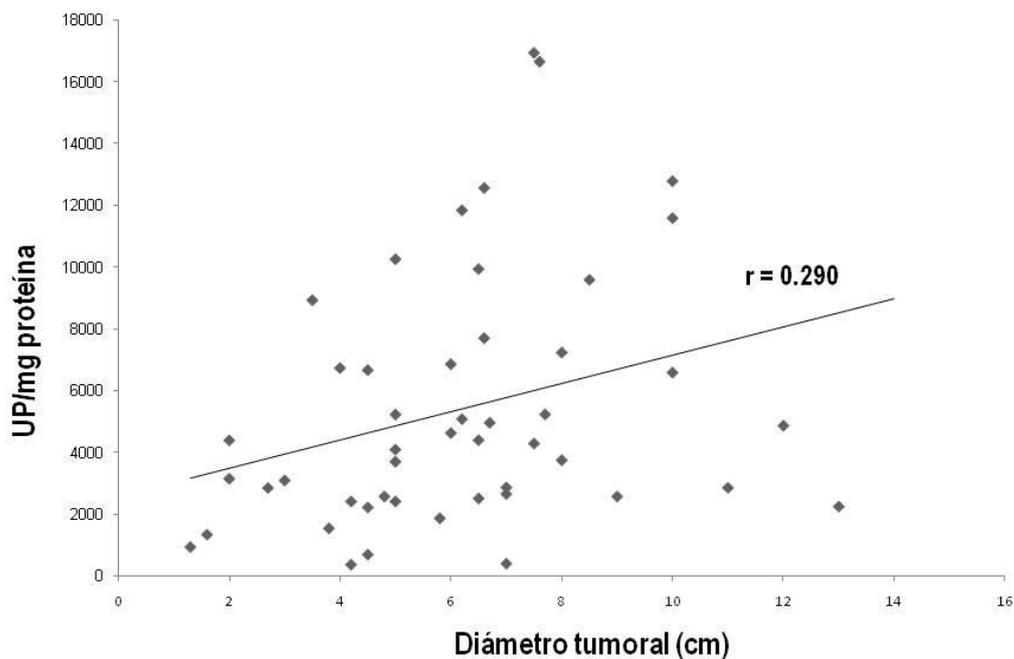


Figura 21: Representación de la correlación entre la actividad APA de la fracción unida a membrana y el diámetro del tumor (CCRCC). Los valores representan la media \pm ES. Rho de Spearman, coeficiente (r)= 0.290; $p < 0.05$.

También se comparó la actividad y la expresión génica en tumores con diámetro menor (o igual) y mayor de 7cm. En este caso, se pudo ver que la actividad de la APA de membrana y la ACE era significativamente mayor en los tumores de más de 7cm (Test de Mann-Whitney, $p < 0.05$ en ambos casos). Se observó una tendencia parecida para la actividad ACE2 y la APA soluble, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$) (Tabla 1). Sin embargo, los niveles de mRNA no presentaron cambios al estratificarlos de este modo ($p > 0.05$) (Tabla 2).

	$\leq 7\text{cm}$	$> 7\text{cm}$	p
ACE	0.958 ± 0.08	1.259 ± 0.15	< 0.05
ACE2	29.7 ± 3.4	34.1 ± 6.5	> 0.05
APAm	5054 ± 792	7666 ± 1351	< 0.05
APAs	1420 ± 163	1846 ± 336	> 0.05

Tabla 1: Actividad ACE, ACE2 y APA según el diámetro del tumor (CCRCC). Se empleó un Test no paramétrico de Mann-Whitney. Se representan la media ± ES (UP/mg de proteína). APAm: APA unida a membrana; APAs: APA soluble.

	$\leq 7\text{ cm}$	$>7\text{ cm}$	p
ACE	3 ± 0.8	2.77 ± 1.04	> 0.05
ACE2	4.44 ± 1.63	2.91 ± 1.13	> 0.05
APA	6.9 ± 1.67	8.62 ± 4.37	> 0.05

Tabla 2: Niveles de mRNA de ACE, ACE2 y APA según el diámetro del tumor (CCRCC). Se empleó un Test no paramétrico de Mann-Whitney. Se representan la media ± ES (expresión relativa).

2.4. Relación entre la actividad enzimática y la supervivencia a los 5 años de los pacientes con CCRCC

El seguimiento clínico de los pacientes con CCRCC se cerró el 31 de diciembre de 2011. El seguimiento medio fue de 62 meses y el número de fallecidos hasta ese momento fue de 12 pacientes.

El análisis de supervivencia realizado mediante el método de Kaplan-Meier y el Test Log-Rank (Figuras 22 a 25) demostraron que la actividad de ACE, ACE2 y APA no se correlacionan con la supervivencia a 5 años de los pacientes con CCRCC (Log-Rank: $p > 0.05$ en todos los casos).

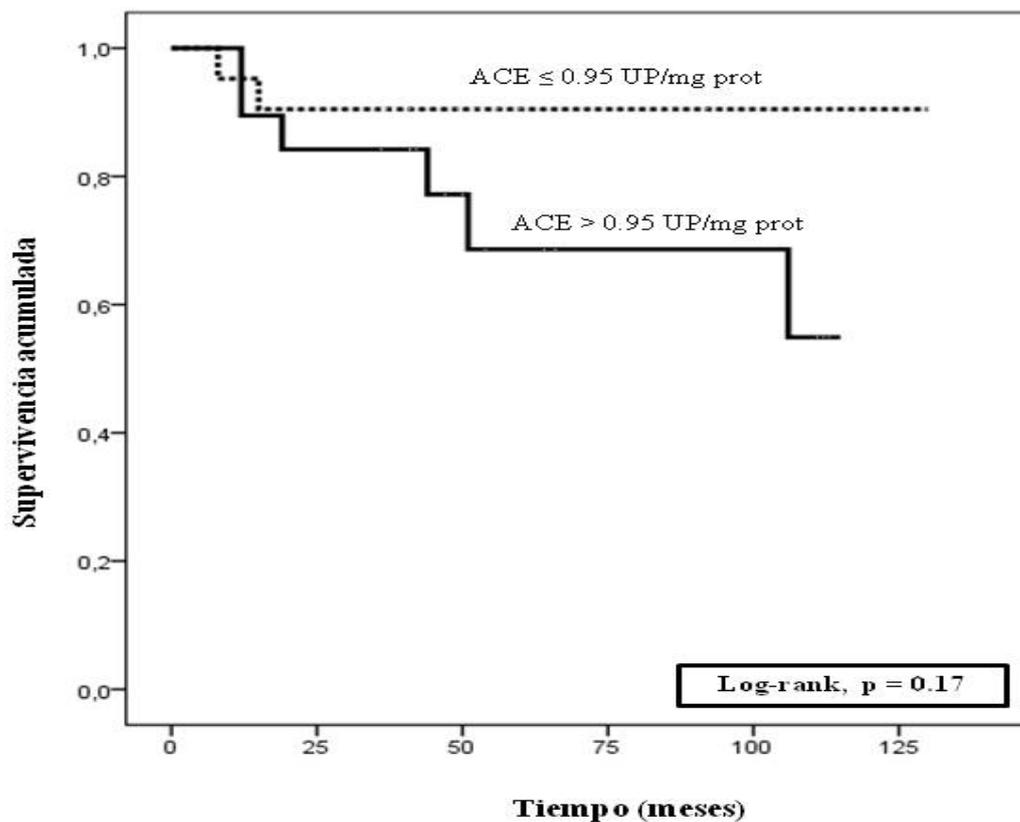


Figura 22: Representación de la correlación entre los niveles de actividad de ACE y la supervivencia a 5 años de los pacientes con CCRCC (Test Log-Rank). Actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Log-Rank, $p = 0.17$.

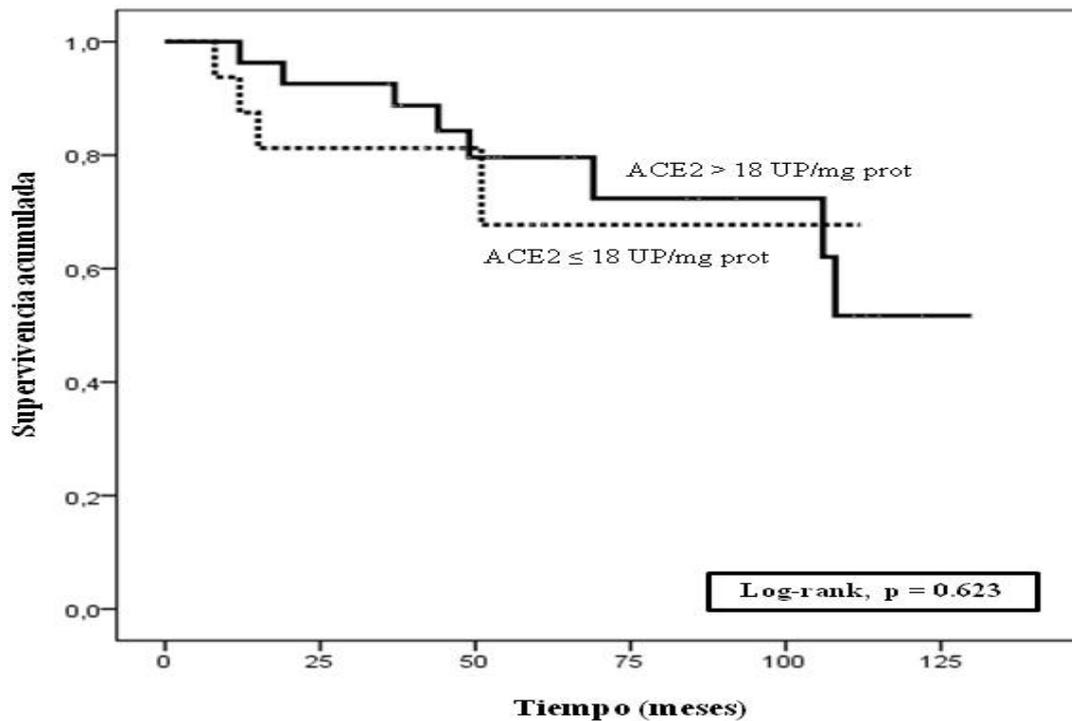


Figura 23: Representación de la correlación entre los niveles de actividad de ACE2 y la supervivencia a 5 años de los pacientes con CCRCC (Test Log-Rank). Actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Log-Rank, $p = 0.623$.

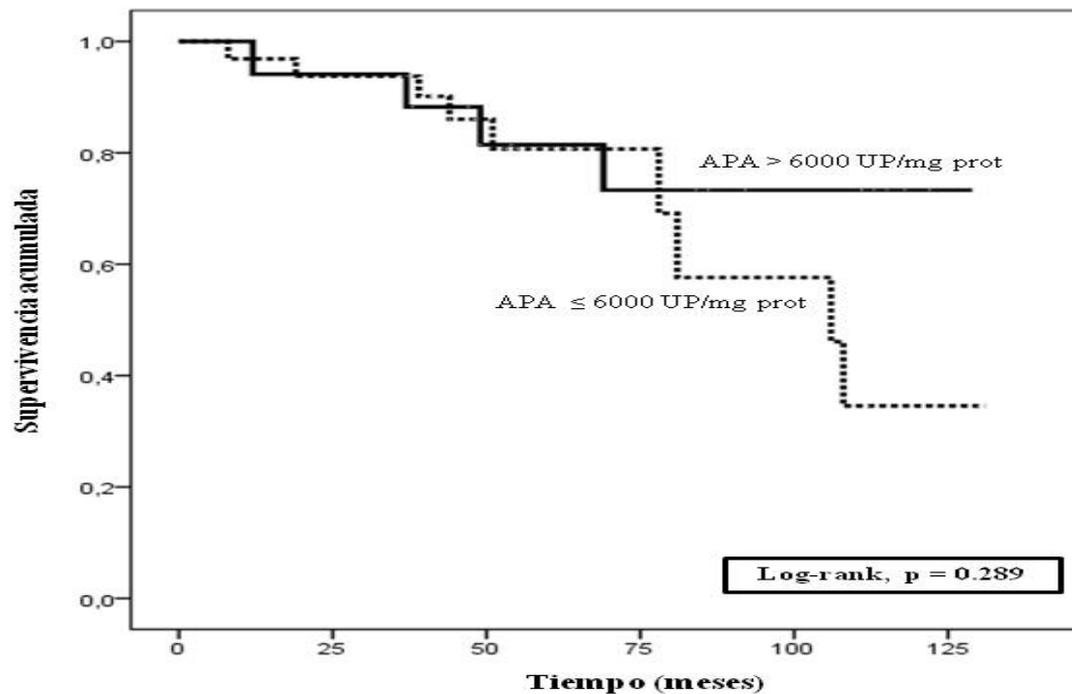


Figura 24: Representación de la correlación entre los niveles de actividad de APAm y la supervivencia a 5 años de los pacientes con CCRCC (Test Log-Rank). Actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Log-Rank, $p = 0.289$.

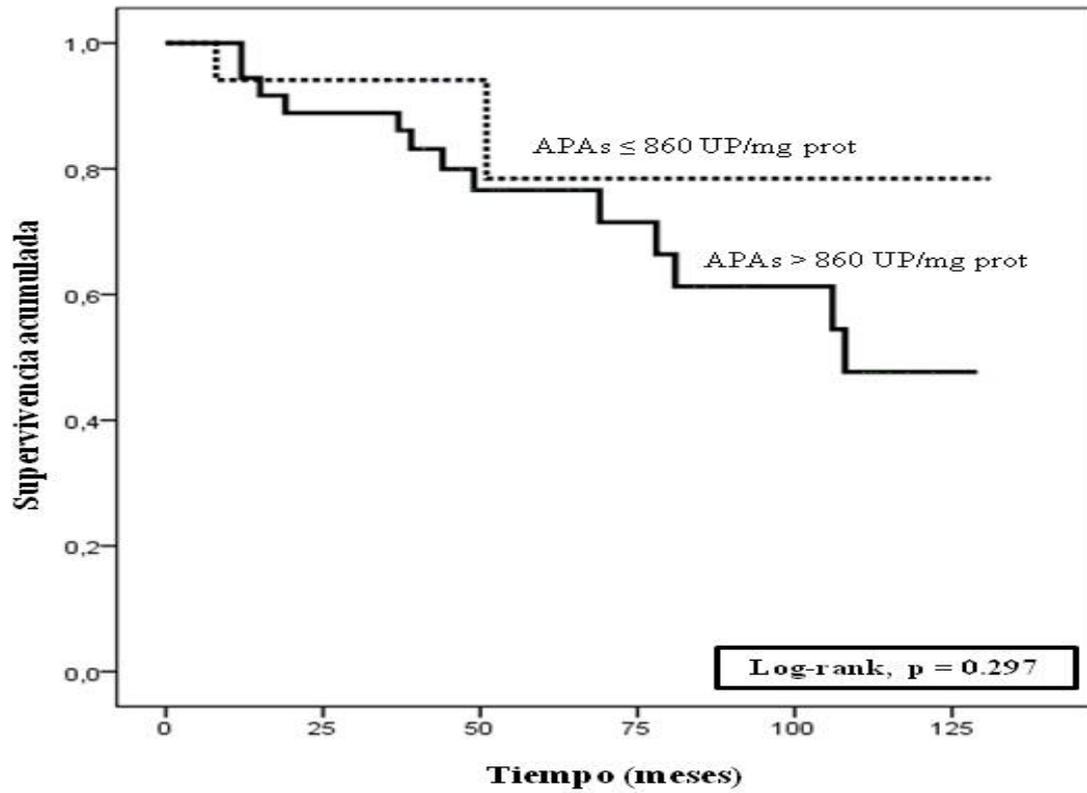


Figura 25: Representación de la correlación entre los niveles de actividad de APAs y la supervivencia a 5 años de los pacientes con CCRC (Test Log-Rank). Actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Log-Rank, p= 0.297.

V. Discusión

1. Actividad enzimática, expresión tisular y génica de enzimas convertidoras de angiotensinas en neoplasias renales y parénquima renal no tumoral adyacente

Los primeros resultados relevantes del presente trabajo se obtuvieron al comparar el tejido renal no tumoral con el transformado o neoplásico. Los cambios observados afectaron de distinto modo a la actividad, a la expresión proteica y a los niveles de mRNA de las tres enzimas convertidoras de angiotensinas estudiadas, la ACE, ACE2 y APA.

En todos los tumores analizados –un total de 66 entre CCRCC, ChRCC y RO–, la actividad de estas tres enzimas demostró ser marcadamente inferior respecto al tejido no neoplásico adyacente. Estos resultados corroboran lo descrito previamente en trabajos en los que se analizó la actividad de la ACE (Takada y cols., 1985) y APA en neoplasias renales (Göhring y cols., 1998; Nanus y cols., 1998). Aunque estos estudios fueron realizados en pocos casos y mediante técnicas semicuantitativas, los resultados demostraron descensos en la actividad en CCRCC, ChRCC y RO. Además, este patrón fue previamente observado en este laboratorio al analizar otras peptidasas que conforman el complejo esquema metabólico del SRA. Se observaron, por ejemplo, descensos significativos de la actividad de la NEP/CD10, APN/CD13 y la cistinil aminopeptidasa (Varona y cols., 2007; Larrinaga y cols., 2007; Blanco y cols., 2008; 2010).

Si tenemos en cuenta todos estos resultados, podría pensarse que en las neoplasias renales se produce una pérdida general de la actividad peptidásica, si la comparamos con el tejido renal no tumoral. Sin embargo, una enzima con acción sobre angiotensinas, como la prolil endopeptidasa muestra aumentos de actividad en el CCRCC (Larrinaga y cols., 2010), mientras que otras no varían significativamente en ninguna neoplasia renal (Varona y cols., 2007; Blanco y cols., 2008). Por lo tanto, es poco probable que estas diferencias entre tejido tumoral y no neoplásico se deban a cambios generales en la proteólisis, sino más bien a cambios selectivos que podrían indicar la implicación de enzimas como la ACE, ACE2 y APA en el desarrollo de neoplasias renales.

Con el objetivo de conocer si los cambios de actividad eran debidos a diferencias en la expresión proteica, se realizaron ensayos inmunohistoquímicos en las mismas neoplasias. Según diferentes autores, la expresión de estas tres glucoproteínas es abundante en el parénquima renal, especialmente a nivel tubular (Bander y cols., 1985; Nanus y cols., 1993; Metzger y cols., 1999; Lely y cols., 2004), algo que pudimos constatar también en nuestros ensayos. Tanto la ACE,

como la ACE2 y APA se marcan intensamente en el túbulo proximal. Sin embargo, en la nefrona distal solamente se expresan la ACE2 y APA.

Al analizar las diferentes neoplasias renales sometidas a inmunotinción, observamos que la ACE no se expresaba en ninguno de los 3 histotipos. Este resultado indica que la baja actividad de la ACE en estos tumores está relacionada con la baja o nula expresión proteica de esta enzima en las propias células tumorales. El CCRCC se origina en el túbulo proximal (López-Beltrán y cols., 2006; López, 2007), lugar en el que la ACE se expresa abundantemente (Metzger y cols., 1999). Ello sugiere que en el CCRCC ocurre una regulación a la baja de la expresión tisular de esta proteína. Sin embargo, en la nefrona distal, lugar de origen del ChRCC y RO (López-Beltrán y cols., 2006; López, 2007), no se detecta esta enzima. Por lo tanto, en estos dos tumores, la ausencia o muy escasa presencia de la enzima no parece guardar relación con regulaciones a la baja en la expresión de la proteína (en el siguiente punto se hará hincapié en los cambios relacionados con el origen histogenético de estas neoplasias).

Por otro lado, la inmunohistoquímica demostró que en el CCRCC la ACE se expresa en los vasos, mientras que no lo hace en el riñón no tumoral. Este resultado es importante porque esta enzima ha sido postulada como marcador de angiogénesis en patología no neoplásica del riñón (Metzger y cols., 1999) y en tumores de otro origen (Deshayes y Nahmias, 2005), lo que apunta a un papel de la ACE en la formación de nuevos vasos en el cáncer renal.

En cuanto a la expresión proteica de la ACE2, esta fue moderada en el CCRCC y negativa en el ChRCC y RO. Este patrón se correlacionó positivamente con la actividad de la enzima en estos tumores, ya que esta fue 1'5 veces inferior en el CCRCC, mientras que en las neoplasias de nefrona distal fue 2'5-4 veces inferior. La ACE2 se expresa a lo largo de toda la nefrona (Lely y cols., 2004), por lo que estas pérdidas de actividad y expresión tisular en las neoplasias renales podrían deberse a regulaciones a la baja de esta enzima.

La APA es una glucoproteína que se expresa fuertemente en el túbulo proximal (Bander y cols., 1985; Nanus y cols., 1993). Cuando analizamos el tumor en el CCRCC, los ensayos mostraron una tinción moderada que, a su vez, se correspondía con la pérdida de actividad enzimática. Por lo tanto, al igual que ocurre con la ACE2, en este tumor renal de origen proximal podría hablarse de una regulación a la baja de la APA. Este resultado coincide solo parcialmente con lo descrito previamente en otros estudios (Göhring y cols., 1998; Nanus y cols., 1998). Estos autores demostraron regulaciones a la baja solo en parte de los CCRCC analizados, sugiriendo que la pérdida de actividad de la APA puede deberse

también a una pérdida de la función catalítica de esta enzima. Por ejemplo, podría ser consecuencia de la liberación de inhibidores enzimáticos por parte del tumor o tejidos adyacentes (Nanus, 2003). Este hecho ya ha sido descrito en el caso de otras proteasas, como las metaloproteasas (MMPS) y sus inhibidores tisulares (TIMMPS), y ha abierto un importante campo en la búsqueda de herramientas contra el cáncer (Van der Jagt y cols., 2010). También podría deberse a la existencia de mutaciones puntuales en los sitios activos, que den lugar a enzimas no funcionales (Nanus y cols., 1998). Estas hipótesis también deberán ser tenidas en cuenta a la hora de analizar nuestros resultados y planificar futuros estudios.

La expresión inmunohistoquímica de la APA en la nefrona distal, en el ChRCC y en el RO fue moderada, lo que sugiere que en estos tumores no se da una pérdida de expresión tisular de la proteína. Sin embargo, la actividad de la APA, especialmente la que se midió en la fracción unida a membrana, era 15-30 veces más baja respecto al tejido no tumoral. Fenómenos parecidos ya han sido descritos previamente con esta y otras peptidasas (Göhring y cols., 1998; Nanus y cols., 1998; Blanco y cols., 2008), pero son de difícil interpretación. Una de las causas podría ser la pérdida de función catalítica de esta enzima, ya sugerida anteriormente (Göhring y cols., 1998; Nanus y cols., 1998). Otra causa podría ser la localización intracitoplásmica de la APA en estos tumores. Efectivamente, la actividad APA en la membrana baja mucho más pronunciadamente que la soluble, lo que podría deberse a que parte de la enzima se encuentre en el citosol. Futuros estudios permitirán saber si esa APA citoplásmica se encuentra libre en el citosol o/y unida a membranas de los orgánulos intracelulares y si se trata de una enzima funcional o no en los tumores renales.

En este trabajo de tesis doctoral también se analizaron los niveles de mRNA de estas enzimas en todas las neoplasias renales. En dichos análisis observamos que el mRNA de las tres enzimas del estudio se expresa tanto en el tejido tumoral como en el tejido no neoplásico. Aunque las diferencias no fueron tan significativas como en la actividad enzimática, al menos desde un punto de vista estadístico, sí se observaron algunos cambios destacables que nos permiten deducir que en función de la enzima y la neoplasia renal estudiada los cambios se dan a diferente nivel del *eje expresión génica/expresión proteica/actividad enzimática*.

Los niveles de mRNA de la ACE y ACE2 no variaron en el CCRCC respecto al tejido no tumoral. Por lo tanto, lo más probable es que la pérdida de actividad de estas dos enzimas en el CCRCC sea consecuencia de alteraciones en la síntesis proteica o/y en la función de la proteína una vez sintetizada. En el ChRCC la expresión génica de ACE y ACE2 fue más baja. Una tendencia parecida se observó

en RO para la ACE2. Por lo tanto, en estos casos podría decirse que la baja actividad y la poca o nula expresión proteica de las dos enzimas se debe a una menor transcripción de estos genes.

En el caso de la APA (gen *ENPEP*), la expresión génica fue mayor en el CCRCC respecto al tejido no tumoral, lo que sugiere que la baja actividad y expresión tisular de esta proteína se deben a fenómenos postranscripcionales. En contraste con lo anterior, la expresión de *ENPEP* en el ChRCC y RO bajaba respecto al tejido no neoplásico. La muy baja actividad de APA en estos tumores podría ser resultado de los bajos niveles de mRNA, sin embargo, lo observado en la inmunohistoquímica abre otras hipótesis, mencionadas en párrafos anteriores.

Existen numerosos trabajos que demuestran discrepancias entre expresión génica y proteica en patologías renales de diferente tipo, es decir, estudios que revelan cambios postranscripcionales en diferentes proteínas (Wysocki y cols., 2006; Kasinath y cols., 2006; Wang y cols., 2009). Por ejemplo, Wang y cols. (2009) y Wysocki y cols. (2006), observaron cambios en la expresión tisular y la actividad de ACE y ACE2 en nefropatías diabéticas. Al contrastarlo con la expresión génica, encontraron que los niveles de mRNA no variaban significativamente. Discrepancias parecidas han sido descritas en el caso de otras peptidasas convertidoras de angiotensinas en neoplasias renales (Varona y cols., 2007; 2010) y también con los receptores de angiotensina AT1 y AT2 en el CCRCC (Dolley-Hitze y cols., 2010). Ante este tipo de discrepancias, varios autores remarcan que hay que evitar utilizar los niveles de mRNA exclusivamente como indicadores de cambios a nivel proteico, y que es fundamental analizar tanto la expresión proteica como la actividad de las peptidasas en este tipo de estudios (Wysocki y cols., 2006; Kasinath y cols., 2006; Wang y cols., 2009).

Al contrastar estos resultados en los tumores renales con la bibliografía existente podemos ver, por ejemplo, que la expresión y actividad de la ACE2 disminuye también en el cáncer de páncreas (Zhou y cols., 2009). Sin embargo, ésta aumenta en el cáncer de colon (Bernardi y cols., 2012). A su vez, se han descrito aumentos en la expresión de la ACE en el cáncer de próstata, colon, páncreas, mama y en el glioblastoma (Deshayes y Nahmias, 2005; Arafat y cols., 2008; Ager y cols., 2008; Bernardi y cols., 2012). También se han descrito aumentos de la APA en el cáncer de cérvix uterino, colon y cabeza y cuello (Ino y cols., 2004; Marchio y cols., 2004; Perez y cols., 2009) y descensos de su actividad en el cáncer de mama (Martínez y cols., 1999). Por lo tanto, se puede decir que aunque hay algunos elementos comunes con nuestros resultados, también existen diferencias importantes.

Esta variabilidad indica, según algunos autores, que las alteraciones en las peptidasas son específicas de tumor y que se circunscriben a los cambios concretos que pueda haber en el microambiente de cada neoplasia (Nanus, 2003; Ino y cols., 2004; Carl-McGrath y cols., 2006), lo que confirma que nos encontramos ante una enfermedad de enorme complejidad a la hora de encontrar elementos comunes contra los que idear herramientas terapéuticas eficaces.

2. Cambios relacionados con el origen histogenético: CCRCC, ChRCC y RO son diferentes

El grupo de tumores renales analizado en este trabajo es bastante heterogéneo en diversos sentidos. Engloba varios tipos de neoplasias que tienen origen histogenético diferente, presentan comportamientos variados en lo que a agresividad respecta y se diagnostican con diferente frecuencia (Eble y cols., 2004; Argüelles y cols., 2006; López y cols., 2009).

En cuanto al origen histogenético, actualmente se postula que el CCRCC es un tumor que se origina a partir de la célula epitelial del túbulo contorneado proximal de la nefrona. Sin embargo, tanto el RO como el ChRCC tienen un origen común en las células intercalares del conducto colector en la nefrona distal (López, 2007). Además del origen histológico común, también comparten algunas alteraciones genéticas (Al-Saleem y cols., 2004; Abrahams y Tamboli, 2005). Por ello, la opinión actual más aceptada por la comunidad científica es que RO y ChRCC son los extremos benigno y maligno respectivamente de un mismo tipo de neoplasia renal (López y cols., 2009). Por otro lado, dentro de los dos carcinomas renales analizados, el CCRCC presenta por lo general un comportamiento biológico más agresivo que el ChRCC (López, 2007).

La identificación correcta y precisa de estos tres tipos histológicos tiene connotaciones clínicas relevantes debido a las diferentes implicaciones pronósticas que conllevan (Amin y cols., 2002; Cheville y cols., 2003). En particular, la distinción entre el ChRCC y el CCRCC es importante para el paciente (Amin y cols., 2002; Cheville y cols., 2003; Liu y cols., 2007) ya que el primero tiene mejor comportamiento clínico que el segundo, y muchos de los esfuerzos realizados hasta ahora en este campo van encaminados a reforzar la identificación de ambos (Shen y cols., 2005; Choi y cols., 2007; Liu y cols., 2007).

En la literatura especializada existe un gran número de artículos que intentan establecer un perfil inmunohistoquímico característico para cada uno de los subtipos histológicos de tumores renales más comunes (Zhou y cols., 2005;

Hammerich y cols., 2008; Truong y Shen, 2011). El listado de proteínas diana para el diagnóstico e identificación de estas neoplasias es amplio (Truong y Shen, 2011). Sin embargo, la realidad es que el problema del diagnóstico diferencial dista mucho aún de estar resuelto en esta área concreta y con esta herramienta. Es muy cierto que determinados anticuerpos caracterizan a determinados tumores, pero también lo es que existen porcentajes significativos de excepciones a la regla (Truong y Shen, 2011). Lo anteriormente comentado hace de la inmunohistoquímica una herramienta muy útil por un lado, pero imperfecta por otro. La búsqueda y aparición de nuevos marcadores proteicos permitirá resolver estas deficiencias.

Por su relación con el presente trabajo, merece la pena destacar que una peptidasa con actividad sobre angiotensinas, la NEP/CD10, se emplea en clínica como marcador inmunohistoquímico de tumores originados en el túbulo proximal (Truong y Shen, 2011). Otra peptidasa convertidora de angiotensinas, la APN/CD13, también ha sido propuesta como diana diagnóstica de estos tumores (Göhrling y cols., 1998). Entre las tres glucoproteínas analizadas en esta tesis, la ACE2 mostró un perfil diferente al comparar neoplasias de nefrona proximal y distal. La tinción fue positiva en CCRCC y negativa en ChRCC y RO. Aunque será necesario ampliar este ensayo a un mayor número de casos, este resultado perfila a la ACE2 como una diana adicional a la batería ya existente de proteínas empleadas como marcadores tumorales renales de nefrona proximal.

Para la identificación de estos tumores renales también son empleadas diferentes técnicas moleculares en la rutina clínica (Cheville y cols., 2003). Detectar diferencias en los niveles de expresión de genes y la actividad de distintas proteínas puede ser muy útil en la búsqueda de nuevos marcadores de diagnóstico/pronóstico. En la presente tesis se observó que, en comparación con el tejido no neoplásico adyacente, los tumores presentaban un perfil diferente en los niveles de mRNA y actividad de enzimas convertidoras de angiotensinas que podrían ser útiles en el diseño de herramientas de diagnóstico diferencial. Por ejemplo pudo verse que la cantidad de mRNA de la ACE, ACE2 y APA (*ENPEP*) eran mucho más bajas en el ChRCC y en el RO (en este último la *ENPEP* sobre todo), mientras que en el CCRCC apenas variaron e incluso aumentaron. En cuanto a la actividad, cabe destacar el gradiente observado con la APA entre el CCRCC, donde era 2 veces más baja, mientras que en el ChRCC y RO era 15 y 30 veces inferior que en el tejido no neoplásico. Trabajos previos donde se analizaron la actividad y el mRNA de otras peptidasas convertidoras de angiotensinas han dibujado perfiles parecidos (Varona y cols., 2007; Larrinaga y cols., 2007; Blanco y cols., 2008; 2010; Varona y cols., 2010).

En resumen, los resultados del presente trabajo sugieren que la expresión génica y proteica y la actividad de algunas peptidasas guardan relación con el origen y el comportamiento biológico de CCRCC, ChRCC y RO. Próximos estudios permitirán conocer su valor tanto desde el punto de vista diagnóstico como pronóstico en las neoplasias renales.

3. Cambios relacionados con la agresividad tumoral en el CCRCC

La agresividad tumoral está caracterizada por la capacidad de infiltración y la capacidad de producir metástasis por parte del tejido neoplásico, y la resistencia al tratamiento (Kumar y cols., 2008). El carcinoma de células renales (RCC) se caracteriza por una evolución impredecible, difícil de determinar en base a criterios histológicos clásicos. De hecho, actualmente se desconocen cuáles son los verdaderos factores pronósticos que condicionan su evolución. Un ejemplo de este desconocimiento, es la aparición de metástasis en algunos pacientes que han sufrido RCC, incluso muchos años después de una cirugía curativa, o incluso en tumores renales histológicamente bien diferenciados (García y cols., 2007).

La metodología habitualmente empleada para el estudio de la agresividad tumoral requiere de un análisis histológico de las muestras y su posterior clasificación en los distintos grados y estadios de la neoplasia. Así, clásicamente se ha establecido que una neoplasia renal con grado y estadio avanzado denota una mayor agresividad y un mal pronóstico de la enfermedad (López-Beltrán y cols., 2006).

Una posible respuesta al comportamiento del RCC puede depender de la heterogeneidad tumoral. En efecto, los tumores pueden contener áreas con diversos grados de diferenciación que no siempre están muestreados en el estudio histológico convencional. En este sentido, López y cols. (2012) han estudiado 47 CCRCCs completamente muestreados en el estudio histológico y han encontrado que hasta 1/3 de los CCRCCs de bajo grado contienen áreas minoritarias de alto grado cuando se analizan en su totalidad. Este dato abunda en el concepto de heterogeneidad tumoral en el carcinoma renal, que está actualmente mal resuelto, y pone en cuestión los protocolos actuales de estudio rutinario de los carcinomas renales en los laboratorios de anatomía patológica. Este hallazgo precisa, sin embargo, estudios adicionales confirmatorios.

Dado que el CCRCC es la variante más frecuente de carcinoma renal en el adulto, se utilizó como modelo para observar si existen cambios en la actividad y expresión de mRNA de la ACE, ACE2 y APA en función de dos parámetros histopatológicos clave para el pronóstico tumoral, el grado (Ficarra y cols., 2002) y el estadio (Minardi y cols., 2005).

Los resultados mostraron que la actividad enzimática de la ACE y la APA soluble era significativamente superior en tumores de grado alto (G3-G4) respecto a los de grado bajo (G1-G2). Sin embargo, al estratificar la actividad según los estadios, no se encontraron diferencias relevantes. Curiosamente, los niveles de mRNA de la ACE2 y APA (*ENPEP*) eran inferiores en los grados altos, aunque los resultados no alcanzaron significación estadística ni se correlacionaron con la actividad. También se realizaron correlaciones entre el diámetro del tumor y la actividad y expresión de mRNA. Así, observamos que cuanto más grande era el CCRCC mayor era la actividad de ACE y APA unida a membrana.

Los trabajos que describen correlaciones entre la expresión y actividad de algunos componentes del sistema renina angiotensina y la agresividad de diferentes neoplasias son cada vez más numerosos, lo que abunda en la idea de su implicación en el crecimiento, invasión y pronóstico de la enfermedad. Se ha descrito, por ejemplo, que en el cáncer de páncreas la expresión de ACE2 disminuye según aumentan los estadios, es decir, según empeora el pronóstico (Zhou y cols., 2009). En cuanto a la ACE, estudios de polimorfismos I/D han mostrado mayor riesgo de estadios avanzados de cáncer de próstata, mama, estómago y colon en pacientes con genotipo D/D, es decir, en pacientes en los que puede haber mayor actividad de la ACE (Vand der Knaap y cols., 2008; George y cols., 2010). A su vez, la expresión de otras enzimas que también conforman el complejo esquema metabólico del SRA, como la cistinil-aminopeptidasa (*CAP*), se correlaciona positivamente con el grado histológico del cáncer endometrial, la invasión del miometrio y de los nódulos linfáticos y la infiltración vascular (Shibata y cols., 2004). También se ha demostrado que la expresión del receptor AT1 aumenta según avanza el cáncer de endometrio, de cérvix uterino y de ovario (Ino y cols., 2011).

En relación con las neoplasias renales, estudios realizados en este laboratorio demostraron que la propia *CAP* y la aminopeptidasa B (*APB*), que también actúa sobre angiotensinas, muestran mayor actividad en los grados y estadios altos del CCRCC (Larrinaga y cols., 2007; Blanco y cols., 2008). En el mismo sentido, un trabajo reciente realizado en 82 CCRCCs demostró que la expresión inmunohistoquímica de los receptores AT1 y AT2 es mayor según

aumenta el grado histológico (Dolley-Hitze y cols., 2010). Estos resultados sugieren que los desequilibrios del SRA podrían estar implicados en el pronóstico de este tumor. Tal y como hemos visto en este trabajo de tesis doctoral, la actividad de la ACE y APA se correlacionaba positivamente con el grado histológico y el tamaño del CCRCC, lo que apunta en el mismo sentido que los estudios previos.

En la literatura también existen estudios, aunque menos abundantes, que relacionan la actividad o expresión de componentes del SRA con la supervivencia de los pacientes con cáncer. Así, por ejemplo, la expresión de la APN/CD13 en neoplasias pulmonares y en el suero de estos pacientes se correlaciona negativamente con la supervivencia media (Murakami y cols., 2005; Tokuhara y cols., 2006). A su vez los aumentos de expresión de la CAP guardan una relación inversa con la supervivencia de las pacientes con cáncer de endometrio (Ino y cols., 2004). En estas mismas pacientes, y también en las que padecen cáncer de ovario, la supervivencia media es menor cuanto mayor es la expresión del receptor AT1 y de angiotensina II (Ino y cols., 2011).

En cuanto al cáncer renal, el grupo de Dolley-Hitze y cols. (2010) demostró que en los pacientes con CCRCCs en los que la expresión de AT1 y AT2 fue mayor, la supervivencia empeoraba significativamente. Nuestro análisis estadístico, correlacionando los datos de actividad de ACE, ACE2 y APA con los índices de supervivencia a los 5 años de los pacientes con CCRCC, no arrojó resultados significativos. Hay autores que han descrito cambios significativos entre actividad de distintas proteasas y grados y estadios de diferentes neoplasias sin que exista correlación con las supervivencias (Carl-McGrath y cols., 2006; Miyata y cols., 2007). Futuros estudios, en los que se aporten más casos a los ya analizados para la presente tesis, permitirán concluir si nos encontramos ante este ejemplo o no.

En resumen, estos resultados en el CCRCC refuerzan la idea de un papel importante de estas enzimas no sólo en la transformación neoplásica de las células renales sino también en su comportamiento agresivo, pudiendo ser herramientas útiles para el diagnóstico, pronóstico y el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas frente a las neoplasias renales.

4. Alteraciones peptidásicas y regulación peptídica en la carcinogénesis renal: posible alteración del SRA intrarrenal

Durante la carcinogénesis, muchos de los cambios fundamentales que ocurren en la fisiología celular están mediados por las vías de señalización extracelular que interactúan con los circuitos intracelulares. Por ello, existen

moléculas que juegan un papel fundamental en la biopatología del cáncer, tanto en la superficie celular como en el espacio intracelular.

La función principal de las enzimas con actividad peptidásica localizadas en la membrana de la superficie celular (ectopeptidasas) es la interconversión de péptidos bioactivos (Turner, 1986; 1987). Estas peptidasas pueden regular el desarrollo y la progresión tumoral a través de la activación ó inactivación local de sustratos peptídicos que actúan como factores de inhibición o estimulación sobre las células cancerosas (Nanus, 2003; Ino y cols., 2004; Carl-McGrath y cols., 2006). Por ello, la pérdida o disminución de expresión y/o actividad en las peptidasas de membrana, podría promover la proliferación de células tumorales mediante la acumulación de altas concentraciones de ciertos péptidos en la superficie celular, que favorecen la progresión neoplásica (Nanus, 2003; Sumitomo y cols., 2005).

El descubrimiento de los SRA locales ha dado lugar a importantes avances en el conocimiento de la implicación de este sistema peptídico en los procesos neoplásicos. Tal y como hemos podido comprobar en nuestro trabajo, se ha demostrado que la expresión de diferentes componentes del SRA en distintos tumores está alterada (Ino y cols., 2004; Deshayes y Nahmias, 2005, Arafat y cols., 2007; Ager y cols., 2008; Zhou y cols., 2009; Dolley-Hitze y cols., 2010; Ino y cols., 2011; Bernardi y cols., 2012). Por otro lado, ensayos realizados en cultivos celulares y en modelos animales sugieren un papel antitumoral de los inhibidores de la ACE (ACEi) y los antagonistas de los receptores de angiotensina (ARA-II) frente al cáncer (Ager y cols., 2008; George y cols., 2010; Lee y cols., 2014; Okazaki y cols., 2014). Además, los estudios retrospectivos realizados en gran cantidad de pacientes con terapia antihipertensiva indican que el riesgo de padecer distintos cánceres es menor y que el de obtener mejores pronósticos es mayor en quienes han tomado estos fármacos (Lever y cols., 1998; Ager y cols., 2008; George y cols., 2010; McMenamin y cols., 2012; Wang y cols., 2013; Chiang y cols., 2014; Makar y cols., 2014; Nakai y cols., 2014). En este sentido, en un estudio reciente realizado en pacientes con carcinoma renal metastásico que estaban en tratamiento con sunitinib (bloqueante de receptores de VEGF y PDGF) se demostró que aquellos que tomaban previamente ACEi ó ARA-II, tenían mayor supervivencia que los que no las tomaban (Keizman y cols., 2011). En el mismo año, un ensayo clínico realizado también en pacientes con cáncer renal avanzado demostró que el tratamiento con interferón alfa complementado con ACEi o ARA-II, inhibidores de la ciclooxigenasa y cimetidina, mejoraba el pronóstico de los pacientes (Tatokoro y cols., 2011). Son ya, por lo tanto, un número importante de

trabajos, realizados en distintos campos de la biomedicina, que apuntan hacia la implicación del SRA en procesos carcinogénicos.

En el contexto de los SRA locales, se ha propuesto la existencia de dos ejes complementarios, cuyo desequilibrio podría inducir o afectar al desarrollo de distintas enfermedades crónicas como el cáncer (Santos y cols., 2008; Zhou y cols., 2009; George y cols., 2010). Un primer eje, el mejor conocido y constituido por la ACE/angiotensina II/receptor AT1, que induciría, a nivel local, proliferación celular, hipertrofia, inflamación, estrés oxidativo, fibrosis, etc. Y un segundo eje, constituido por la ACE2/Ang 1-7/Mas, que contrarrestaría los efectos del anterior gracias a su acción vasodilatadora, antihipertrófica, antiangiogénica y antiproliferativa (Gallager y Tallant, 2004). Este descubrimiento ha convertido los ratios ACE/ACE2 y ang II/ang 1-7 en "switches" moleculares a tener en cuenta en el desarrollo y evolución de distintas enfermedades (Santos y cols., 2008). En cuanto a la patología renal, el campo en el que los desequilibrios entre uno y otro eje han sido investigados en mayor profundidad son las enfermedades no neoplásicas, como la nefropatía diabética, donde se da una hipertrofia del eje de la ang II (Wysocki y cols., 2006; 2008; Kobori y cols., 2007; Wakahara y cols., 2007; Santos y cols., 2008).

Los resultados de la presente tesis y de estudios previos con peptidasas convertidoras de angiotensinas en neoplasias renales (Göhring y cols., 1998; Nanus y cols., 1998; Varona y cols., 2007; 2010; Larrinaga y cols. 2007; 2010; 2012), sumados a los ensayos en modelos animales y a estudios retrospectivos (George y cols., 2010; Keizman y cols., 2011) sugieren alteraciones en la regulación del SRA intrarrenal (SRAi) en la carcinogénesis renal. Sin embargo, solo permiten lanzar hipótesis sobre lo que puede estar ocurriendo con las angiotensinas en estas neoplasias.

Hemos comprobado que las tres enzimas clave de este sistema tienen menor actividad y/o expresión proteica en el tejido tumoral respecto al no neoplásico, lo que hace difícil interpretar cómo se podrían desregular la ang II y la ang 1-7 en estos tumores. Hemos observado, sin embargo, que en los CCRCC con grados histológicos altos y mayor diámetro la actividad de la ACE es mayor, lo que podría indicar una mayor producción de ang II en los tumores más agresivos. Del mismo modo, la actividad de la APA aumenta en CCRCC más agresivos y avanzados. Una posibilidad es que este aumento fuera una consecuencia de esa mayor producción de ang II, su sustrato natural (Wolf y cols., 1997). Algo similar se ha demostrado en tumores ginecológicos, donde el aumento de expresión de APA es una respuesta celular en el microambiente del tumor a los mayores niveles de ang II (Ino y cols., 2004; Ino y cols., 2011).

Aunque todos los procesos que definen el cáncer son interdependientes y cooperativos, y aunque cada tumor pueda tener su propio perfil, es muy probable que el mecanismo más importante por el que las angiotensinas regulan el cáncer sea mediante la modulación de la angiogénesis (Ager y cols., 2008; George y cols., 2010). La angiotensina II estimula la expresión de variedad de agentes proangiogénicos y factores de crecimiento (VEGF, EGF, etc.) (Heffelfinger, 2007). A su vez, la ACE y la APA han sido descritas como marcadores endoteliales de neoangiogénesis en el cáncer (Marchio y cols., 2004; Deshayes y Nahmias, 2005). En relación con esto, fue interesante comprobar que el endotelio vascular del CCRCC expresa la ACE mientras que el tejido no neoplásico adyacente no lo expresa. Ello sugiere que en ese microambiente vascular tumoral podría haber una mayor síntesis de ang II, péptido que podría estar acumulándose ya que ni la APA ni la ACE2 se expresaron en los vasos tumorales renales.

En definitiva, aunque estos estudios abundan en la idea de un SRAi alterado en el cáncer renal, no permiten concluir cuál es su papel real. Serán necesarios nuevos ensayos tanto en tejido humano como en modelos animales y en cultivos celulares, en los que se midan niveles de angiotensinas y se estudie su acción directa o indirecta sobre el crecimiento, angiogénesis y diseminación a distancia de las células tumorales.

Hoy en día, la participación de las peptidasas en los procesos intracelulares, sigue siendo tema de discusión. Durante mucho tiempo se pensó que su función en el interior de las células se limitaba a la última etapa del catabolismo proteico (Mantle, 1992; O'Cuinn, 1998). Sin embargo, en este nuevo siglo, se ha descrito que además de la acción endocrina, paracrina y autocrina, los mensajeros peptídicos podrían unirse a receptores intracelulares y realizar acciones dentro de la propia célula que afectan a procesos como el crecimiento, diferenciación celular y angiogénesis (Re, 2002; Zagon y cols., 2002; Re y Cook, 2006; 2008). En este mismo sentido, algunos autores postulan que esta acción intracrina podría estar regulada por peptidasas intracelulares, siendo partícipes de estos mismos procesos (Shrimpton y cols., 2002; Re, 2003; Re y Cook, 2006; 2008; 2011; 2015).

A nivel celular, la APA siempre se ha descrito como *glucoproteína de membrana tipo II*, es decir, asociada a la superficie celular y con el extremo amino situado dentro de la célula (Nanus y cols., 1993). Sin embargo, varios autores han demostrado actividad de APA en la fracción soluble en diferentes tejidos, entre otros, en el cáncer de mama (Martínez y cols., 1999; Ramírez-Expósito y cols., 2000; Ramírez y cols., 2008). En el presente trabajo se realizó un fraccionamiento subcelular sencillo para separar la actividad enzimática unida a membrana de la

soluble. El empleo de esta herramienta tuvo como objetivo conocer el comportamiento de las tres enzimas en la fracción de membrana y también en la soluble de los tejidos renales, fracciones que son representativas, al menos en parte, de lo que sucede en la superficie celular o en el citosol (Mantle, 1992; Gil y cols., 2001; Irazusta y cols., 2002).

Los resultados mostraron que existía actividad APA en la fracción soluble y que, al igual que en la fracción unida a membrana, esta varía respecto al tejido no tumoral adyacente y también en función de la agresividad en el CCRCC. Ello sugiere que el papel que pueda jugar la enzima en las neoplasias renales no sólo se limita a su acción en la superficie celular, sino también dentro de la célula. Resultados similares han sido descritos con otras peptidasas convertidoras de angiotensinas en estas mismas neoplasias (Varona y cols., 2007; Larrinaga y cols., 2007). Por lo tanto, más allá de que la APA u otras puedan actuar en el espacio extracelular por constituir enzimas de superficie o por haber sido secretadas (Balogh y cols., 1998; Shrimpton y cols., 2002), debe tenerse en cuenta la posibilidad de una regulación intracrina de los péptidos bioactivos en estos procesos proliferativos, tal y como sugieren estudios previos (Re y Cook, 2006; 2011).

Además de la existencia de SRA locales en diferentes tejidos (Paul y cols., 2006; Kobori y cols., 2007), son cada vez más los estudios que describen la presencia de SRA "intracelulares". Es decir, que la angiotensina II, 1-7, etc. pueden no sólo producir efectos mediante su unión a receptores AT1, Mas, etc. en la superficie celular, sino que podrían unirse a receptores intracelulares (Zhuo y Li, 2011). Así, se ha demostrado la existencia de receptores AT1, AT2 y Mas en el núcleo de las células tubulares renales (Gwathmey y cols., 2010). Estos autores, postulan que parte de las acciones a medio/largo plazo de la angiotensina II, como por ejemplo la regulación de la angiogénesis, podría estar mediada también por sus acciones intracrininas (Re y Cook, 2006; 2011; 2015; Gwathmey y cols., 2010; Zhuo y Li, 2011). El sustrato natural mejor conocido de la APA es la angiotensina II (Wolf y cols., 1997). La actividad de esta enzima varía en la fracción soluble de los tejidos tumorales renales, lo que podría ser causa (o consecuencia) de una desregulación de este péptido y del SRA intracelular en el cáncer renal. Todos estos resultados permiten vislumbrar un nuevo campo en el estudio de la regulación peptídica de esta patología.

En resumen, estos resultados apuntan a que uno de los mecanismos fisiopatológicos que subyace en las neoplasias renales pueda ser la desregulación del SRA intrarrenal, fuera y dentro de la célula.

5. Otras posibles acciones de las peptidasas convertidoras de angiotensinas en el carcinoma renal

Junto con la regulación peptídica, las peptidasas ejercen otras acciones dependientes e independientes de su actividad catalítica (Antczak y cols., 2001; Carl-McGrath y cols., 2006). Este hecho es muy importante a la hora de interpretar nuestros resultados y lanzar nuevas hipótesis sobre su implicación en la fisiopatología del cáncer renal. Como bien es sabido, los procesos carcinogénicos son el resultado de diferentes cambios en la maquinaria molecular celular que en conjunto dan lugar a la desdiferenciación, el crecimiento descontrolado de las células y su diseminación local y a distancia (Kumar y cols., 2008). Por ello, es esperable que el papel que las peptidasas desarrollen en las neoplasias renales se deba a la suma de sus distintas acciones biológicas o, más bien, a su resultado neto. Entre ellas destaca la regulación peptídica, porque es la que mejor se conoce. Sin embargo, la degradación de proteínas de la matriz, su acción como moléculas de adhesión y su papel como receptores, cuya activación pone en marcha vías de señalización intracelular, también son importantes (Antczak y cols., 2001; Carl-McGrath y cols., 2006).

El tumor, una vez originado, necesita degradar la membrana basal y la matriz extracelular para poder crecer, infiltrar tejidos, producir nuevos vasos y diseminarse a distancia. Uno de los acontecimientos clave en la malignización del tumor es la degradación de estas dos estructuras (Kumar y cols., 2008). Para llevar a cabo este proceso, es necesaria la acción de distintas enzimas proteolíticas, entre las que destacan las metaloproteasas de matriz (MMP), cuya implicación en procesos proliferativos ha sido ampliamente descrita. Entre otros, hay trabajos que relacionan algunas MMPs con los CCRCC más agresivos y con peor pronóstico (Kallakury y cols., 2001; Kawata y cols., 2006; Miyata y cols., 2007).

Algunos autores indican que estas MMPs se coordinan con otras enzimas proteolíticas para realizar su acción (Antczak y cols., 2001; Carl-McGrath y cols., 2006). Así, se ha descrito que las catepsinas, las calicreinas y las propias peptidasas podrían constituir, junto con las MMPs, dianas terapéuticas eficaces contra el cáncer y otras enfermedades (Cudic y Fields, 2009). Dentro de las peptidasas que podrían ayudar en esta acción coordinada, han sido reconocidas peptidasas ya mencionadas en esta Discusión, como la NEP/CD10, APN/CD13 y la CAP (Ito y cols., 2004b; Carl-McGrath y cols., 2006; Gaggari y cols., 2008; Cudic y Fields, 2009).

Un hecho reseñable en este trabajo es que la actividad enzimática de las tres enzimas convertidoras de angiotensinas fue llamativamente baja al compararla con el tejido no tumoral adyacente. Sin embargo, la actividad de la ACE y la APA es mayor en CCRCCs de mayor tamaño y altos grados histológicos. Es decir, en las formas más agresivas o donde supuestamente mayor actividad degradadora de matriz está ocurriendo (Kumar y cols., 2008). Este fenómeno ya ha sido observado en el caso de otras peptidasas reguladoras de angiotensinas en estas mismas neoplasias (Larrinaga y cols., 2007; Blanco y cols., 2008). La causa de este patrón de carácter bifásico es desconocida, pero parece indicar que las peptidasas juegan un papel diferente cuando el tejido no tumoral se va transformando en neoplásico y cuando éste comienza a adquirir un carácter más agresivo. En esta segunda fase las peptidasas podrían estar ejerciendo acciones coordinadas con otras enzimas degradadoras de matriz que permitan al tumor crecer e invadir estructuras adyacentes.

Además, también se conoce que en los procesos de reparación tisular, inflamación y en el cáncer se da la coexpresión de algunos componentes del SRA y ciertas MMPs (Vinson y cols., 2007; Juillerat-Jeanneret, 2007). En este contexto, se ha descrito que la angiotensina II induce la acción de algunas MMPs y que el uso de bloqueantes del receptor AT1 y ACEi como el captopril la reducen, tanto por inhibición directa sobre las MMPs como por acción indirecta, es decir, mediante la disminución en la producción de angII y el bloqueo de su acción (Williams y cols., 2005; Vinson y cols., 2007; Juillerat-Jeanneret, 2007). Por lo tanto, no debería descartarse que el aumento en la actividad de la ACE en formas más avanzadas del CCRCC aumente la de las MMPs y que esa acción coordinada permita al tumor crecer e invadir otras estructuras.

Más allá de su acción sobre péptidos bioactivos y sobre la matriz extracelular, las peptidasas ejercen acciones biológicas independientes de su actividad catalítica. Se ha descrito por ejemplo, que la estructura de algunas de estas enzimas contiene dominios intracitoplasmáticos que podrían dar lugar a señales intracelulares mediante la interacción con diferentes moléculas, condicionando funciones como el crecimiento o la migración celular (Riemann y cols., 1999; Antczak y cols., 2001; Nanus, 2003; Sumitomo y cols., 2005). En relación con esta función y la patología neoplásica, la proteína mejor estudiada es la NEP/CD10. Esta peptidasa de membrana funciona como un supresor tumoral a través de sus interacciones con proteínas, tales como, PTEN y ERM (Sumitomo y cols., 2005; Goodman y cols., 2006). Según estos autores, al perderse la expresión de NEP en los tumores prostáticos, no sólo se altera la regulación peptídica sino que

se pierde también el control que esta enzima ejerce como receptor en el crecimiento y la migración celular (Sumitomo y cols., 2005).

Las tres enzimas analizadas en este trabajo son glucoproteínas de membrana que poseen dominios intracitoplásmicos (Nanus y cols., 1993; Guy y cols., 2005). En la actualidad, no existen estudios que vinculen estas enzimas con el cáncer mediante acciones independientes de su función catalítica. Sin embargo, esta posibilidad no debería desecharse. Se sabe, por ejemplo, que el dominio intracitoplásmico de la ACE posee residuos serina que pueden ser fosforilados por kinasas, dando lugar a cascadas de señalización intracelulares, con posterior activación de factores de transcripción (por ej. c-Jun) que determinan la activación de genes que codifican distintas proteínas. El modo en el que la ACE podría activarse en el microambiente celular es desconocido, sin embargo, su activación induce la transcripción de proteínas como la COX-2 (Fleming , 2006; Lambert y cols., 2010), proteína cuya sobreexpresión está relacionada con el desarrollo y mal pronóstico en el cáncer renal (Hashimoto y cols., 2004) y cuyos inhibidores se encuentran como potenciales tratamientos adyuvantes en formas avanzadas de esta enfermedad (Tatokoro y cols., 2011).

En definitiva, entre las diferentes hipótesis que surgen del análisis de nuestros resultados, debería tenerse en consideración también estas posibilidades: la acción coordinada de varias enzimas, entre las que podrían estar las enzimas convertidoras de angiotensinas, en la degradación de la matriz extracelular, y la acción de estas enzimas como receptores cuya activación regule la carcinogénesis renal.

VI. Conclusiones

Conclusiones:

1. Los patrones de actividad enzimática y expresión tisular, así como de expresión génica de la ACE, ACE2 y APA, muestran alteraciones en las neoplasias renales respecto al tejido no tumoral. Estas alteraciones son selectivas puesto que se muestran de diferente modo en los distintos tumores, en las distintas fracciones subcelulares analizadas, y no afectan por igual a las tres enzimas.
2. Las diferencias mostradas entre la actividad enzimática, la expresión tisular y la expresión génica, translucen diferentes mecanismos de regulación. En ocasiones, las diferencias podrían obedecer a mecanismos de regulación a nivel proteico, mientras que en otros casos podrían corresponder a mecanismos de regulación génica.
3. El diferente origen histogenético de los subtipos neoplásicos analizados podría condicionar los diferentes patrones mostrados en la actividad y la expresión proteica y génica, lo que apunta a estas enzimas como potenciales marcadores de diagnóstico diferencial.
4. La actividad de la ACE y APA aumenta según aumenta el grado histológico y el tamaño del CCRCC, lo que apunta a estas enzimas como potenciales marcadores de pronóstico de esta neoplasia renal.
5. Los cambios en la actividad, la expresión inmunohistoquímica y niveles de mRNA de las tres enzimas convertidoras de angiotensina sugieren la desregulación del sistema renina angiotensina intrarrenal en los procesos neoplásicos del riñón.

VII. Bibliografía

A

Abrahams NA, Tamboli P. 2005. Oncocytic renal neoplasms: diagnostic considerations. Clin Lab Med. 25:317-39.

Ager EI, Neo J, Christophi C. 2008. The renin-angiotensin system and malignancy. Carcinogenesis. 29:1675-84.

Aizawa S, Chigusa M, Ohno Y, Suzuki M. 1997. Chromophobe cell renal carcinoma with sarcomatoid component. A report of two cases. J Urol Pathol. 6:51-9.

Al-Saleem T, Cairns P, Dulaimi AE, Feder M, Testa JR, Uzzo RG. 2004. The genetics of renal oncocytosis: a posible model for neoplastic progresión. Cancer Genet Cytogenet. 152:23-8.

Amin MB, Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, de-Peralta M, Deshpande A, Menon M. 2002. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. Am J Surg Pathol. 26:281-91.

Ansorge S, Reinhold D. 2006. Imune peptides related to dipeptidyl aminopeptidase IV/CD26. En: Handbook of biologically active peptides. Kastin AJ (Eds.). Elsevier Academic Press. Pp. 567-72.

Antczak C, De Meester I, Bauvois B. 2001. Ectopeptidases in pathophysiology. Bioessays. 23:251-60.

Arafat HA, Gong Q, Chipitsyna G, Rizvi A, Saa CT, Yeo CJ. 2007. Antihypertensives as novel antineoplastics: angiotensin-I-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers in pancreatic ductal adenocarcinoma. J Am Coll Surg. 204:996-1005.

Argani P, Laé M, Hutchinson B, Reuter VE, Collins MH, Perentesis J, Tomaszewski JE, Brooks JS, Acs G, Bridge JA, Vargas SO, Davis IJ, Fisher DE, Ladanyi M. 2005. Renal carcinomas with the t(6;11)(p21;q12): Clinicopathologic features and demonstration of the specific alpha-TFEB gene fusion by immunohistochemistry, RT-PCR, and DNA PCR. Am J Surg Pathol. 29:230-40.

Argüelles E, Marcilla D, Medina R, Congregado B, Campoy P, Cayuela A. 2006. Renal oncocytoma. Review of our 22 patients. Actas Urol Esp. 30:583-90.

B

Bader M, Ganten D. 2008. Update on tissue rennin-angiotensin systems. *J Mol Med.* 86:615-21.

Balogh A, Cadel S, Foulon T, Picart R, Der garabedian A, Rousselet A, Tougard C, Cohen P. 1998. Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Cell Sci.* 111:161-9.

Bander NH, Cordon-Cardo C, Finstad CL, Whitmore WF, Vaughan ED, Oettgen HF, Melamed M, Old LJ. 1985. Immunohistologic dissection of the human kidney using monoclonal antibodies. *J Urol.* 133:502-5.

Bannasch P, Schacht U, Storch E. 1974. Morphogenese und Mikromorphologie epithelialer Nieretumoren bei Nitrosomorpholin-vergifteten Ratten. I. Induktion und Histologie der Tumoren. *Z Krebsforsch.* 81:311-31.

Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. 2004. Handbook of Proteolytic Enzymes. Barrett AJ, Rawlings ND y Woessner JF (Eds.). 2ª Edición. Vol. 1. Elsevier Academic Press.

Bernardi S, Zennaro C, Palmisano S, Velkoska E, Sabato N, Toffoli B, Giacomel G, Buri L, Zanconati F, Bellini G, Burrell LM, De Manzini N, Fabris B. 2012. Characterization and significance of ACE2 and Mas receptor in human colon adenocarcinoma. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 0:1-8.

Blanco L, Larrinaga G, Perez I, López JI, Gil J, Agirregoitia E, Varona A. 2008. Acid, basic, and neutral peptidases present different profiles in chromophobe renal cell carcinoma and in oncocytoma. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290:850-8.

Blanco L, Perez I, Sanz B, Gil J, López JI, Ugalde A, Varona A, Larrinaga G. 2010. Changes in cell-surface peptidase activity in papillary renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 30:1137-41.

Bodmer D, van den Hurk W, van Groningen JJ, Eleveld MJ, Martens GJ, Weterman MA, van Kessel AG. 2002. Understanding familial and non-familial renal cell cancer. *Hum Mol Genet.* 11:2489-98.

Bonsib SM. 1996. Renal chromophobe cell carcinoma: The relationship between cytoplasmic vesicles and colloidal iron stain. *J Urol Pathol.* 4:9-14.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.

Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, Horvath S, Leibovich BC, Chopra S, Liao SY, Stanbridge E, Lerman MI, Palotie A, Figlin RA, Belldegrun AS. **2003**. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced clear renal cell carcinoma: Implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res.* 9:802-11.

Bulnes V, Álvarez-Múgica M, Fernández JM, Nava E, Jalón A, Meilán Á. **2008**. Clinicopathologic features of renal cell carcinoma incidentally detected through radiological studies. *Actas Urol Esp.* 32:976-84.

C

Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Röcken C. **2006**. Ectopeptidases in tumour biology: a review. *Histol Histopathol.* 21:1339-53.

Carroll PR, Murty VV, Reuter V, Jhanwar S, Fair WR, Whitmore WF, Chaganti RS. **1987**. Abnormalities at chromosome region 3p12-14 characterize clear cell renal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 26:253-9.

Cassoni P, **Bussolati G**. **2006**. Oxitocin and cancer. En: *Handbook of biologically active peptides*. Kastin AJ (Eds.). Elsevier Academic Press. 479-82.

Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. **2003**. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 27:612-24.

Chiang YY, Chen KB, Tsai TH, Tsai WC. **2014**. Lowered cancer risk with ACE inhibitors/ARBs: a population-based cohort study. *J Clin Hypertens.* 16:27-33.

Choi YD, Kim KS, Ryu S, Park Y, Cho NH, Rha SH, Jang JJ, Ro JY, Juhng SW, Choi C. **2007**. Claudin-7 is highly expressed in chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *J Korean Med Sci.* 22:305-10.

Chomczynski P, **Sacchi N**. **1987**. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-9.

Cohen HT, **McGovern FJ**. **2005**. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 353:2477-90.

Corvol P, Eyries M, Soubrier F. **2004**. Peptidyl-dipeptidase A/angiotensin I-converting enzyme. *Handbook of proteolytic enzymes*. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. 2nd edition. Elsevier Academic Press. 1:299-303.

Crotty TB, Lawrence KM, Moertel CA, Bartelt DH, Batts KP, Dewald GW, Fallow GM, Jenkins RB. **1992**. Cytogenetic analysis of six renal oncocytomas and a chromophobe cell renal carcinoma: Evidence that -Y, -1 may be characteristic anomaly in renal oncocytomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 61:61-6.

Crotty TB, Farrow GM, Lieber MM. **1995**. Chromophobe cell renal carcinoma: Clinicopathological features of 50 cases. *J Urol.* 154:964-7.

Cudic M, Fields GB. **2009**. Extracellular proteases as targets for drug development. *Curr Protein Pept Sci.* 10:297-307.

D

Daffre S, Bulet P, Spinsi A, Ehret-Sabater L, Rodrigues EG, Travassos LR. **2008**. Bioactive natural peptides. En: *Studies in Natural Products Chemistry*. Atta-ur-Rahman (Eds.) Elsevier. Pp. 597-691.

Danilczyk U, Eriksson U, Oudit GY, Penninger JM. **2004**. Physiological roles of angiotensin-converting enzyme 2. *Cell Mol Life Sci.* 61:2714-9.

Dayal HH, Wilkinson GS. **1989**. Epidemiology of renal cell cancer. *Semin Urol.* 7:139-43.

de Araújo Júnior RF, Leitão Oliveira AL, de Melo Silveira RF, de Oliveira Rocha HA, de França Cavalcanti P, de Araújo AA. **2014**. Telmisartan induces apoptosis and regulates Bcl-2 in human renal cancer cells. *Exp Biol Med.* pii: 1535370214546267.

Delahunt B, Eble JN. **1997**. Papillary renal cell carcinoma: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol.* 10:537-44.

Delahunt B, Eble JN, McCredie MR, Bethwaite PB, Stewart JH, Bilous AM. **2001**. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: Comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum Pathol.* 32:590-5.

DeLong WH, Sakr W, Grignon DJ. **1996**. Chromophobe renal cell carcinoma: A comparative histochemical and immunohistochemical study. *J Urol Pathol.* 4:1-8.

Deshayes F, Nahmias C. **2005**. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab.* 16:293-9.

Dijkman HB, Assmann KJ, Steenbergen EJ, Weltzels JF. **2006**. Expression and effect of inhibition of aminopeptidase-A during nephrogenesis. *J Histochem Cytochem.* 54:253-62.

Dolley-Hitze T, Jouan F, Martin B, Mottier S, Edeline J, Moranne O, Le Pogamp P, Belaud-Rotureau MA, Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Vigneau C. **2010**. Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma?. *Br J Cancer.* 103:1698-705.

Donogue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. **2000**. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 87:1-9.

E

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. **2004**. Tumors of the kidney. En: *Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours.* Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (Eds.). IARC Press. Pp. 9-88.

Eble JN, Young RH. **2007**. Tumors of the urinary tract. En: *Diagnostic Histopathology of Tumors.* Fletcher CDM (Eds.). 3ª Edición. Vol. 1. Churchill Livingstone. Pp. 485-97.

Erlandson RA, Shek TW, Reuter VE. **1997**. Diagnostic significance of mitochondria in four types of renal epithelial neoplasms: an ultrastructural study of 60 tumors. *Ultrastruct Pathol.* 21:409-17.

F

Ferro SE, Hyslop S, Camargo AC. **2004**. Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions, *J Neurochem.* 91:769-77.

Ficarra V, Righetti R, Pilloni S, D'amico A, Maffei N, Novella G, Zanolla L, Malossini G, Mobilio G. **2002**. Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma: Retrospective analysis of 675 cases. *Eur Urol.* 41: 190-8.

Fleming I. **2006**. Signaling by the angiotensin-converting enzyme. *Circ Res.* 98:887-96.

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. **1982**. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 6:655-63.

Füzesi L, Cober M, Mittermayer C. **1992**. Collecting duct carcinoma: Cytogenetic characterization. *Histopathology*. 21:155-60.

Fyhrquist F, Saijonmaa O. 2008. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*. 264:224-36.

G

Gaggar A, Jackson PL, Noerager BD, O'Reilly PJ, McQuaid DB, Rowe SM, Clancy JP, Blalock JE. **2008**. A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J Immunol*. 180:5662-9.

Gallagher PE, Tallant EA. 2004. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis*. 25:2045-52.

García M, Beltrán JR, Verges A, Santolaya JI, Espinosa JJ, Tarín M, Sanjuán de Laorden C. **2007**. Metástasis cutánea de carcinoma de células renales. *Actas Urol Esp*. 31:556-8.

George AJ, Thomas WG, Hannan RD. **2010**. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nature Rev Cancer*. 10:745-59.

Gil J, Larrinaga G, Meana JJ, Rodriguez-Puertas R, Irazusta J, Casis L. **2001**. Regional and subcellular distribution of soluble aminopeptidases in the human and the rat brain: a comparative study. *Neuropeptides*. 35:276-84.

Glenner GG, McMillan PJ, Folk JE. **1962**. A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal alpha-L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature*. 194:867.

Göhring B, Holzhausen HJ, Meye A, Heynemann H, Rebmann U, Langner J, Riemann D. **1998**. Endopeptidase 24.11/CD10 is down-regulated in renal cell cancer. *Int J Mol Med*. 2:409-14.

Goodman OB, Febbraio M, Simantov R, Zheng R, Shen R, Silverstein RL, Nanus DM. **2006**. Nephilysin inhibits angiogenesis via proteolysis of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem*. 281:33597-605.

Grande E, Martin A, Maroto P, Solsona E. **2007**. Biología molecular del carcinoma de células claras renales: Principios para un tratamiento selectivo. *Actas Urol Esp*. 31:233-43.

Greene LF, Page DL, Fleming D, Firtz A, Batch M, HallerDG, Morrow M. **2002**. American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Straging Manual. 6ª Edición. Springer-Verlag.

Grossman E, Messerli FH, Goldbourt U. **2002**. Carcinogenicity of antihypertensive therapy. *J Hum Hypertens*. 4:195-201.

Guy JL, Lambert DW, Warner FJ, Hooper NM, Turner AJ. **2005**. Membrane-associated zinc peptidase families: comparing ACE and ACE2. *Biochim Biophys Acta*. 1751:2-8.

Guyton AC, Hall JE. **2002**. El riñón y los líquidos corporales. En: *Tratado de Fisiología Médica*. Guyton AC y Hall JE (Eds.). 10ª edición. McGraw-Hill Interamericana. Pp. 319-461.

Gwathmey TM, Westwood BM, Pirro NT, Tang L, Rose JC, Diz DI, Chappell MC. **2010**. Nuclear angiotensin-(1-7) receptor is functionally coupled to the formation of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*. 299:983-90.

H

Hallberg M, Le Grevès P, Nyberg F. **2004**. Neuropeptide processing. En: *Proteases in the Brain*. Lendeckel NM y Hooper U (Eds.). Springer Science. Pp. 203-34.

Hammerich KH, Ayala GE, Wheeler TM. **2008**. Application of immunohistochemistry to the genitourinary system (prostate, urinary bladder, testis, and kidney). *Arch Pathol Lab Med* 132:432-40.

Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. **2004**. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS -7 pathogenesis. *J Pathol*. 203:631-7.

Hanahan D, Weinberg RA. **2000**. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70.

Hashimoto Y, Kondo Y, Kimura G, Matsuzawa I, Sato S, Ishizaki M, Imura N, Akimoto M, Hara S. **2004**. Cyclooxygenase-2 expression and relationship to tumour progression in human renal cell carcinoma. *Histopathology*. 44:353-9.

Heasley LE. **2001**. Autocrine and paracrine signalling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene*. 20:1563-69.

Heffelfinger SC. **2007**. The renin angiotensin system in the regulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des*. 13:1215-29.

Hii SI, Nicol, Gotley DC, Thompson LC, Green MK, Jonsson JR. **1998**. Captopril inhibits tumour growth in a xenograft model of human renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 77:880-3.

Holmquist B, Bünning P, Riordan JF. **1979**. A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Anal Biochem*. 95:540-8.

I

Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Kikkawa F, Mizutani S. **2004**. Regulatory role of membrane-bound peptidases in the progression of gynaecologic malignancies. *Biol Chem*. 358:683-90.

Ino K, Shibata K, Yamamoto E, Kajiyama H, Nawa A, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S, Tanizaki Y, Kobayashi A, Kikkawa F. **2011**. Role of the renin-angiotensin system in gynecologic cancers. *Curr Cancer Drug Targets*. 11:405-11.

Irazusta J, G. Larrinaga, J. González-Maeso, J. Gil, J.J. Meana, and L. Casis. **2002**. Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain. *Neurochem Int*. 40:337-345.

Irazusta J, Valdivia A, Fernández D, Agirregoitia E, Ochoa E, Ochoa C, Casis L. **2004**. Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *J Androl*. 25:733-739.

Ishii K, Usui S, Sugimura Y, Yoshida S, Hioki T, Tatematsu M, Yamamoto H, Hirano K. **2001a**. Aminopeptidase N regulated by zinc in human prostate participates in tumor cell invasion. *Int J Cancer*. 92:49-54.

Ishii K, Usui S, Yamamoto H, Sugimura Y, Tatematsu M, Hirano K. **2001b**. Decreases of metallothionein and aminopeptidase N in renal cancer tissues. *J Biochem*. 129:253-8.

Ito N, Nomura S, Iwase A, Ito T, Kikkawa F, Tsujimoto M, Ishiura S, Mizutani S. **2004b**. ADAMs, a disintegrin and metalloproteinases, mediate shedding of oxytocinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 314:1008-13.

J

Juillerat-Jeanneret L. 2007. The renin-angiotensin system and its inhibitors in human cancers. En: *Frontiers in research of the renin-angiotensin system on human disease*. Leung PS (Eds.) Springer. Holanda. Pp.197-220.

K

Kallakury BV, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. 2001. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 7:3113-9.

Kasinath BS, Mariappan MM, Sataranatarajan K, Lee MJ, Feliers D. 2006. mRNA translation: unexplored territory in renal science. *J Am Soc Nephrol.* 17:3281-92.

Kawata N, Nagane Y, Igarashi T, Hirakata H, Ichinose T, Hachiya T, Takimoto Y, Takahashi S. 2006. Strong significant correlation between MMP-9 and systemic symptoms in patients with localized renal cell carcinoma. *Urology.* 68:523-7.

Keizman D, Huang P, Eisenberger MA, Pili R, Kim JJ, Antonarakis ES, Hammers H, Carducci MA. 2011. Angiotensin system inhibitors and outcome of sunitinib treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: a retrospective examination. *Eur J Cancer.* 47:1955-61.

Khoo SK, Giraud S, Kahnoski K, Chen J, Motorna O, Nickolov R, Binet O, Lambert D, Friedel J, Lévy R, Ferlicot S, Wolkenstein P, Hammel P, Bergerheim U, Hedblad MA, Bradley M, Teh BT, Nordenskjöld M, Richard S. 2002. Clinical and genetic studies of Birt-Hogg-Dube syndrome. *J Med Genet.* 39:393-400.

Khoo SK, Kahnoski K, Sugimura J, Petillo D, Chen J, Shockley K, Ludlow J, Knapp R, Giraud S, Richard S, Nordenskjöld M, Teh BT. 2003. Inactivation of BHD in sporadic renal tumors. *Cancer Res.* 63:4583-87.

Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. 2007. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hipertensión and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 59:251-87.

Kovacs G, Soudah B, Hoene E. 1988. Binucleated cells in a human renal cell carcinoma with 34 chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet.* 31:211-15.

Kumar R, Singh VP, Baker KM. **2007**. The intracellular rennin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab.* 18:208-14.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. **2008**. Riñón y Vía Urinaria. En: Robbins Patología Humana. Kumar V, Abbas AK, Fausto N y Mitchell RN (Eds.). 8ª Edición. Elsevier Saunders. Pp. 587-90.

Kuroda N, Toi M, Hiroi M, Enzan H. **2003**. Review of chromophobe renal cell carcinoma with focus on clinical and pathobiological aspects. *Histol Histopathol.* 18:165-71.

L

Ladanyi M, Lui MY, Antonescu CR, Krause-Boehm A, Meindl A, Argani P, Healey JH, Ueda T, Yoshikawa H, Meloni-Ehrig A, Sorensen PH, Mertens F, Mandahl N, van den Berghe H, Sciot R, Dal Cin P, Bridge J. **2001**. The der(17)t(X;17)(p11;q25) of human alveolar soft part sarcoma fuses the TFE3 transcription factor gene to ASPL, a novel gene at 17q25. *Oncogene.* 20:48-57.

Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrum AS. **2005**. Renal cell carcinoma 2005: New frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J Urol.* 173:1853-62.

Lam JS, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrum AS. **2005**. Role of molecular markers in the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma. *Urology.* 66:1-9.

Lam JS, Pantuck AJ, Belldegrum AS, Figlin RA. **2007**. Protein expression profiles in renal cell carcinoma: Staging, prognosis, and patient selection for clinical trials. *Clin Cancer Res.* 13:703-8.

Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ. **2008**. Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin-angiotensin system. *Biochem Pharmacol.* 75:781-6.

Lambert DW, Clarke NE, Turner AJ. **2010**. Not just angiotensinases: new roles of the angiotensin-converting enzymes. *Cell Mol Life Sci.* 67:89-98.

Larrinaga G, Callado LF, Agirregoitia N, Varona A, Gil J. **2005**. Subcellular distribution of membrane-bound aminopeptidases in the human and rat brain. *Neurosci Lett.* 383:136-40.

Larrinaga G, López JI, Casis L, Gil J, Blanco L, Agirregoitia E, Varona A. **2007**. Cystinyl aminopeptidase activity is decreased in renal cell carcinomas. *Regul Pept.* 144:56-61.

-
- Larrinaga G**, Perez I, Blanco L, López JI, Andrés L, Etxezarraga C, Santaolalla F, Zabala A, Varona A, Irazusta J. **2010**. Increased prolyl endopeptidase activity in human neoplasia. *Regul Pept.* 163:102-6.
- Larrinaga G**, Blanco L, Sanz B, Perez I, Gil J, Unda M, Andrés L, Casis L, López JI. **2012**. The impact of peptidase activity on clear cell renal cell carcinoma survival. *Am J Physiol Renal Physiol.* 303:1584-91.
- Latham B**, Dickersin R, Oliva E. **1999**. Subtypes of chromophobe renal cell carcinoma: An ultrastructural and histochemical study of 13 cases. *Am J Surg Pathol.* 23:530-5.
- Launonen V**, Vierimaa O, Kiuru M, Isola J, Roth S, Pukkala E, Sistonen P, Herva R, Aaltonen LA. **2001**. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 98:3387-94.
- La Vecchia C**, Negri E, D'Avanzo B, Franceschi S. **1990**. Smoking and renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 50:5231-3.
- Lee LD**, Mafura B, Lauscher JC, Seeliger H, Kreis ME, Gröne J. **2014**. Antiproliferative and apoptotic effects of telmisartan in human colon cancer cells. *Oncol Lett.* 8:2681-86.
- Lely AT**, Hamming I, van Goor H, Navis GJ. **2004**. Renal ACE2 expression in human kidney disease. *J Pathol.* 204:586-93.
- Lever AF**, Hole DJ, Gillis CR. **1998**. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer?. *Lancet.* 352:179-84.
- Li L**, Wu Q, Wang J, Bucy RP, Cooper MD. **1993**. Widespread tissue distribution of aminopeptidase A, an evolutionary conserved ectoenzyme recognized by the BP-1 antibody. *Tissue antigens.* 42:488-96.
- Linehan WM**. **2003**. Molecular targeting of VHL gene pathway in clear cell kidney cancer. *J Urol.* 170:593-4.
- Linehan WM**, Walther MM, Zbar B. **2003**. The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol.* 170:2163-72.
- Liu L**, Qian J, Singh H, Meiers I, Zhou X, Bostwick DG. **2007**. Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma: an optimal and practical panel for differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 131:1290-7.
- Ljungberg B**. **2007**. Prognostic markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol.* 17:303-8.

López JI. 2007. Carcinomas renales de células claras, papilar e híbridos. Criterios morfológicos, genéticos y dificultades diagnósticas en la práctica diaria. *Rev Esp Patol.* 40:161-70.

López JI. 2013. Renal tumors with clear cells. A review. *Pathol Res Pract.* 209:137-46.

López JI, Ugalde A, Ortega FJ, Vilanova JR. 2008. Neoplasias oncocíticas renales. Revisión crítica de un problema diagnóstico no resuelto. *Rev Esp Patol.* 41:249-59.

López JI, Velasco V, Ortega FJ. 2009. Expresión de MLH1, MSH2 y MSH6 en oncocitomas y carcinomas de células cromóforas renales. *Rev Esp Patol.* 42:31-7.

López JI, Muñiz G, Guarch R, Camarasa N, Cáceres M, Moreno V, García-Prats L, Orozco R. 2012. Histological heterogeneity of clear cell renal cell carcinoma (CCRCC). A complete morphological analysis of 47 tumors. *Mod Pathol.* 25:225.

López JI, Guarch R, Camarasa N, Cáceres M, Moreno V, Muñiz G, García-Prats MD, Orozco R. 2013. Grade heterogeneity in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int.* doi: 10.1002/BJUIw-2012-091-web.

López JI, Guarch R, Larrinaga G, Corominas-Cishek A, Orozco R. 2013. Cell heterogeneity in clear cell renal cell carcinoma. *APMIS.* 121:1187-91.

Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z. 2006. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur Urol.* 49:798-805.

Lubensky IA, Schmidt L, Zhuang Z, Weirich G, Pack S, Zambrano N, Walther MM, Choyke P, Linehan WM, Zbar B. 1999. Hereditary and sporadic papillary renal carcinomas with c-MET mutations share a distinct morphological phenotype. *Am J Pathol.* 155:517-26.

M

Maclure M, Willett W. 1990. A case-control study of diet and risk of renal adenocarcinoma. *Epidemiology.* 1:430-40.

Maher ER, Yates JR, Harries R, Benjamin C, Harris R, Moore AT, Ferguson-Smith MA. 1990. Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Q J Med.* 77:1151-63.

Makar GA, Holmes JH, Yang YX. 2014. Angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 106:374.

-
- Mantle D. 1992.** Comparison of soluble aminopeptidases in human cerebral cortex, skeletal muscle and kidney tissues. *Clin Chim.* 207:107-118.
- Marchiò S,** Lahdenranta J, Schlingemann RO, Valdembri D, Wesseling P, Arap MA, Hajitou A, Ozawa MG, Trepel M, Giordano RJ, Nanus DM, Dijkman HB, Oosterwijk E, Sidman RL, Cooper MD, Bussolino F, Pasqualini R, Arap W. **2004.** Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels. *Cancer Cell.* 5:151-62.
- Marks N,** Datta RK, Lajtha A. **1968a.** The relationship of aminotripeptidase and arylamidase to protein breakdown in the brain. En: *Macromolecules and Function of the neurone.* Lodin Z (Eds.). Excerpta Medica.
- Marks N,** Datta RK, Lajtha A. **1968b.** Partial resolution of brain arylamidases and aminopeptidases. *J Biol Chem.* 243:2882-9.
- Marks N,** Estern F, Lajtha A. **1974.** Changes of proteolytic enzymes and proteins during maturation of the brain. *Brain Res.* 86:307-22.
- Martínez JM,** Prieto I, Ramírez MJ, Cueva C, Alba F, Ramírez M. **1999.** Aminopeptidase activities in Breast Cancer tissue. *Clin Chem.* 45:1797-802.
- Matson MA, Cohen EP. 1990.** Acquired cystic kidney disease: occurrence, prevalence, and renal cancers. *Medicine.* 69:217-26.
- Mc Menamin UC,** Murray LJ, Cantwell MM, Hughes CM. **2012.** Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in cancer progression and survival: a systematic review. *Cancer Causes Control.* 23:221-30.
- Mead GO,** Thomas LR Jr, Jackson JG. **1990.** Renal oncocytoma: report of a case with bilateral multifocal oncocytomas. *Clin Imaging.* 14:231-4.
- Metzger R,** Bohle RM, Pauls K, Eichner G, Alhenc-Gelas F, Danilov SM, Folker EF. **1999.** Angiotensin-converting enzyme in non-neoplastic kidney diseases. *Kidney Int.* 56:1442-54.
- Minardi D,** Lucarini G, Mazzucchelli R, Milanese G, Natali D, Galosi AB, Montironi R, Biagini G, Muzzonigro G. **2005.** Prognostic role of Fuhrman grade and vascular endothelial growth factor in pT1a clear cell carcinoma in partial nephrectomy specimens. *J Urol.* 174: 1208-12.

Miyata Y, Iwata T, Maruta S, Kanda S, Nishikido M, Koga S, Kanetake H. **2007**. Expression of matrix metalloproteinase-10 in renal cell carcinoma and its prognostic role. *Eur Urol.* 52:791-7.

Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. **1996**. Renal cell-carcinoma. *N Engl J Med.* 335:865-75.

Motzer RJ, Bacik J, Mariani T. **2002**. Treatment outcome and survival associated with metastatic renal cell carcinoma of non-clear-cell histology. *J Clin Oncol.* 20:2376-81.

Murakami H, Yokoyama A, Kondo K, Nakanishi S, Kohno N, Miyake M. **2005**. Circulating aminopeptidase N/CD13 is an independent prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 11:8674-9.

N

Nakai Y, Isayama H, Sasaki T, Takahara N, Saito K, Ishigaki K, Hamada T, Mizuno S, Miyabayashi K, Yamamoto K, Mohri D, Kogure H, Yamamoto N, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Koike K. **2014** The inhibition of renin-angiotensin system in advanced pancreatic cancer: an exploratory analysis in 349 patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* [Epub ahead of print].

Nanus DM, Engelstein D, Gastl GA, Gluck L, Vidal MJ, Morrison M, Finstad C, Bander NH, Albino AP. **1993**. Molecular cloning of the human kidney differentiation antigen gp160: Human aminopeptidase A. *Proc Natl Acad Sci.* 90:7069-73.

Nanus DM, Bogenrieder T, Papandreou CN, Finstad CL, Lee A, Vlamis V, Motzer RJ, Bander NH, Albino AP, Reuter VE. **1998**. Aminopeptidase A expression and enzymatic activity in primary human renal cancers. *Int J Oncol.* 13:261-267.

Nanus DM. **2003**. Of peptides and peptidases: the role of cell surface peptidases in cancer. *Clin Cancer Res.* 9:6307-9.

O

O'Cuinn G. **1998**. Peptide metabolism in cytoplasm of brain cells. *Biochem Soc Trans.* 26:279-292.

Okazaki M, Fushida S, Harada S, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, Tajima H, Ninomiya I, Fujimura T, Ohta T. **2014**. The Angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan suppresses proliferation and fibrosis in gastric cancer. *Cancer Lett.* 355:46-53.

Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. **1977**. Design of specific inhibitors of angiotensine-converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science*. 196:441-4.

P

Pan CC, Chen PC, Ho DM. **2004**. The diagnostic utility of MOC31, BerEP4, RCC marker and CD10 in the classification of renal cell carcinoma and renal oncocytoma: an immunohistochemical analysis of 328 cases. *Histopathology*. 45:452-9.

Pantuck AJ, Zeng G, Belldegrun AS, Figlin RA. **2003**. Pathobiology, prognosis and targeted therapy for renal cell carcinoma: Exploiting the hypoxia-induced pathway. *Clin Cancer Res*. 9:4641-52.

Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, and Ruoslahti E. **2000**. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res*. 60:722-727.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. **2006**. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 86:747-803.

Pavlovich CP, Walther MM, Eyer RA, Hewitt SM, Zbar B, Linehan WM, Merino MJ. **2002**. Renal tumors in the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Am J Surg Pathol*. 26:1542-52.

Pérez I, Varona A, Blanco L, Gil J, Santaolalla F, Zabala A, Ibarguen AM, Irazusta J, Larrinaga G. **2009**. Increased APN/CD13 and acid aminopeptidase activities in head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck*. 31:1335-40.

Pérez-Ordóñez B, Hamed G, Campbell S, Erlandson RA, Russo P, Gaudin PB, Reuter VE. **1997**. Renal oncocytoma: A clinicopathologic study of 70 cases. *Am J Surg Pathol*. 21:871-83.

Petrovic N, Schacke W, Shapiro LH. **2004**. CD13/Aminopeptidase N in tumor growth and angiogenesis. En: *Aminopeptidases in biology and disease*. Hooper NM y Lendeckel U (Eds.). Vol. 2. Kluwer Academic/Plenum Press. Pp. 179-200.

Petty WJ, Miller AA, McCoy TP, Gallagher PE, Tallant EA, Torti FM. **2009**. Phase I and pharmacokinetic study of angiotensin-(1-7), an endogenous antiangiogenic hormone. *Clin Cancer Res*. 15:7398-404.

Presti JC Jr, Rao PH, Chen Q, Reuter VE, Li FP, Fair WR, Jhanwar SC. 1991. Histopathological, cytogenetic and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Res.* 51:1544-52.

Pro B, Dang NH. 2004. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histol Histopathol.* 19:1345-51.

R

Ramírez M, Prieto M, Alba F, Vives F, Banegas I, de Gasparo M. 2008. Role of central and peripheral aminopeptidase activities in the control of blood pressure: a working hypothesis. *Heart Fail Rev.* 13:339-53.

Ramírez-Expósito MJ, Martínez JM, Prieto I, Alba F, Ramírez M. 2000. Comparative distribution of glutamyl and aspartyl aminopeptidase activities in mouse organs. *Horm Metab Res.* 32:161-3.

Rawlings ND, Barrett AJ. 1995. En: *Methods Enzymol.* 244: 19-61 y 461-86; 248: 105-20 y 183-228.

Rawlings ND, Barrett AJ. 1999. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research.* 27:325-31.

Renshaw AA, Hebske EP, Loughlin KR, Shapiro C, Weinberg DS. 1996. Aggressive variants of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer.* 78:1756-61.

Re RN. 2002. The origins of intracrine hormone action. *Am J Med Sci.* 323:43-48.

Re RN. 2003. The intracrine hypothesis and intracellular peptide hormone action. *Bioessays.* 25:401-409.

Re RN, Cook JL. 2006. An intracrine view of angiogenesis. *Bioessays.* 28:943-53.

Re RN, Cook JL. 2008. The basis of an intracrine pharmacology. *J Clin Pharmacol.* 48:344-50.

Re RN, Cook JL. 2011. Noncanonical intracrine action. *J Am Soc Hypertens.* 5:435-48.

Re RN, Cook JL. 2015. Studies of intracellular angiotensin II. *Methods Mol Biol.* 1234:1-8.

Reuter VE, Presti JC. 2000. Contemporary approach to the classification of renal epithelial tumors. *Semin Oncol.* 27:124-37.

Reuter VE. 2006. The pathology of renal epithelial neoplasms. *Semin. Oncol.* 33: 534-43.

Riemann D, Kehlen A, Langner J. 1999. CD13 –not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today.* 20:83-8.

Rosivall J. 2009. Intrarenal rennin-angiotensin system. *Mol Cell Endocrinol.* 302:185-92.

Ruiter R, Visser LE, Van Duijn BH, Stricker HC. 2011. The ACE Insertion/Deletion polymorphism and risk of cancer, a review and meta-analysis of the literature. *Curr Cancer Drug Targets.* 11:421-30.

S

Sachdeva K, Bagi RP, Jana, Mansoor Javeed, Issam Makhoul, Brendan Curti. 2009. Renal Cell Carcinoma. Perry M, Talavera F, Hu W, McKenna R, Harris JE (Eds.). *eMedicine*. <http://emedicine.medscape.com/article/281340-overview>.

Santos RAS, Ferreira AJ, Simoes e Silva AC. 2008. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2- angiotensin (1-7) –Mas axis. *Exp. Physiol.* 93:519-27.

Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, Allikmets R, Chidambaram A, Bergerheim UR, Feltis JT, Casadevall C, Zamarron A, Bernues M, Richard S, Lips CJ, Walther MM, Tsui LC, Geil L, Orcutt ML, Stackhouse T, Lipan J, Slife L, Brauch H, Decker J, Niehans G, Hughson MD, Moch H, Storkel S, Lerman MI, Linehan WM, Zbar B. 1997. Germline and somatic mutations in the tyrosin kinase domain of the c-MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet.* 16:68-73.

Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, Kinjerski T, Weirich G, Miller M, Lubensky I, Neumann HP, Brauch H, Decker J, Vocke C, Brown JA, Jenkins R, Richard S, Bergerheim U, Gerrard B, Dean M, Linehan WM, Zbar B. 1999. Novel mutations of the MET proto-oncogen in papillary renal carcinomas. *Oncogene.* 18:2343-50.

Schöffski P, Dumez H, Clement P, Hoeben A, Prenen H, Wolter P, Joniau S, Roskams T, Van Poppel H. 2006. Emerging role of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of advanced renal cell cancer : a review. *Ann Oncol.* 17:1185-96.

Schwerdtle RF, Störkel S, Neuhaus C, Brauch H, Weidt E, Brenner W, Hohenfellner R, Huber C, Decker HJ. 1996. Allelic losses at chromosomes 1p, 2p, 6p, 10p, 13p, 17p and

21q significantly correlate with the chromophobe subtype of renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 56:2927-30.

Sharpe CR, Rochon JE, Adam JM, Suissa S. **1989**. Case-control study of hydrocarbon exposures in patients with renal cell carcinoma. *Can Med Assoc J.* 140:1309-18.

Shen SS, Krishna B, Chirala R, Amato RJ, Truong LD. **2005**. Kidney-specific cadherin, a specific marker for the distal portion of the nephron and related renal neoplasms. *Mod Pathol.* 18:933-40.

Shibata K, Kikkawa F, Suzuki Y, Mizokami Y, Kajiyama H, Ino K, Nomura S, Nagasaka T, Mizutani S. **2004**. Expression of placental leucine aminopeptidase is associated with a poor outcome in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Oncology.* 66:288-95.

Shrimpton CN, Smith AI, Lew RA. **2002**. Soluble metallopeptidases and neuroendocrine signalling. *Endocrine Rev.* 23:647-64.

Shuin T, Kondo K, Sakai N, Kaneko S, Yao M, Nagashima Y, Kitamura H, Yoshida MA. **1996**. A case of chromophobe renal cell carcinoma associated with low chromosome number and microsatellite instability. *Cancer genet cytogenet.* 86:69-71.

Sidhar SK, Clark J, Gill S, Hamoudi R, Crew AJ, Gwilliam R, Ross M, Linehan WM, Birdsall S, Shipley J, Cooper CS. **1996**. The t(X,1)(p11,2; q21,2) translocation in papillary renal cell carcinoma fuses a novel gene PRCC to the TFE 3 transcription factor gene. *Hum Mol Genet.* 5:1333-8.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. **2015**. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 65:5-29.

Singh I, Nabi G. **2002**. Bellini duct carcinoma: Review of diagnosis and management. *Int Urol Nephrol.* 34:91-5.

Stevens A, Lowe J. **2006**. Aparato Urinario. En: *Histología Humana*. Stevens A y Lowe J (Eds.). 3ª Edición. Elsevier Mosby. Pp. 294-325.

Störkel S, Steart PV, Dreckhahn D, Thoenes W. **1989**. The human chromophobe cell renal carcinoma: its probable relation to the intercalated cells of the collecting duct. *Virchows Archiv.* 56:237-45.

Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K. **1997**. Classification of renal cell carcinoma. Workgroup 1. *Cancer.* 80:987-9.

Sumitomo M, Ruoquian S, Nanus DM. **2005**. Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. *Biochim Biophys Acta*. 1751:52-59.

Swartz MA, Karth J, Schneider DT, Rodriguez R, Beckwith JB, Perlman EJ. **2002**. Renal medullary carcinoma: Clinical, pathologic, immunohistochemical, and genetic analysis with pathogenic implications. *Urology*. 60:1083-9.

T

Takada Y, Hiwada K, Yokohama M, Ochi K, Takeuchi M, Kokubu T. **1985**. A possible histologic indicator for human renal cell carcinoma. *Cancer*. 56:130-3.

Takahashi M, Kahnoski R, Gross D, Nicol D, Teh BT. **2002**. Familial adult renal neoplasia. *J Med Genet*. 39:1-5.

Taki A, Nakatani Y, Misugi K, Yao M, Nagashima Y. **1999**. Chromophobe renal cell carcinoma: An immunohistochemical study of 21 Japanese cases. *Mod Pathol*. 12:310-7.

Tallant EA, Menon J, Soto-Pantoja DR, Gallagher PE. **2006**. Angiotensin peptides and cancer. En: *Handbook of biologically active peptides*. Kastin AJ (Eds.). Elsevier Academic Press. Pp. 459-66.

Tatokoro M, Fujii Y, Kawakami S, Saito K, Koga F, Matsuoka Y, Limura Y, Masuda H, Kihara K. **2011**. Phase-II trial of combination treatment of interferon- α , cimetidine, cyclooxygenase-2 inhibitors and rennin-angiotensin-system inhibitor (I-CCA therapy) for advanced renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 102:137-43.

Taylor A. **1993**. Aminopeptidases: towards a mechanism of action. *Trends Biochem Sci*. 18:167-71.

Teh BT, Blennow E, Giraud S, Sahlén S, Hii SI, Brookwell R, Brauch H, Nordenskjöld M, Larsson C, Nicol D. **1998**. Bilateral multiple renal oncocytomas and cysts associated with a constitutional translocation (8;9)(q24.1;q34.3) and a rera constitutional VHL missense substitution. *Genes Chromosomes Cancer*. 21:260-4.

Thibodeau GA, Patton KT. **2007**. Sistema Urinario. En: *Anatomía y Fisiología*. Thibodeau GA y Patton KT (Eds.). 6ª Edición. Elsevier Mosby. Pp. 1033-56.

Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ. **1985**. Human chromophobe cell renal carcinoma. *Virchows Arch*. 48:207-17.

Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ, Moll R, Baum HP, Werner S. **1988**. Chromophobe cell renal carcinoma and its variants: A report of 32 cases. *J Pathol.* 155:277-87.

Tickoo SK, Amin MB. 1998. Discriminant nuclear features of renal oncocytoma and chromophobe renal cell carcinoma: Analysis of their potential utility in the differential diagnosis. *Am J Clin Pathol.* 110:782-7.

Tickoo SK, Amin MB, Linden MD, Lee MW, Zarbo RJ. **1998**. Colloidal iron staining in renalepithelial neoplasms, including chromophobe renal cell carcinoma. Emphasis on technique and patterns of staining. *Am J Surg Pathol.* 22:419-24.

Tickoo SK, Reuter VE, Amin MB, Srigley JR, Epstein JI, Min KW, Rubin MA, Ro JY. **1999**. Renal oncocytosis: a morphologic study of fourteen cases. *Am J Surg Pathol.* 23:1094-101.

Tickoo SK, Lee MW, Eble JN, Amin M, Christopherson T, Zarbo RJ, Amin MB. **2000**. Ultrastructural observations on mitochondria and microvesicles I renal oncocytoma, chromophobe renal cell carcinoma and eosinophilic variant of conventional (clear cell) renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 24:1247-56.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. **2000**. A human homolog of angiotensin converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 275:33238-43.

Tobe H, Kojima F, Aoyagi T, Umezawa H. **1980**. Purification using amastatin and properties of aminopeptidase A from pig kidney. *Biochim Biophys Acta.* 613:459-68.

Tokuhara T, Hattori N, Ishida H, Hirai T, Higashiyama M, Kodama K, Miyake M. **2006**. Clinical significance of aminopeptidase N in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12:3971-8.

Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D, Leigh I, Gorman P, Lamlum H, Rahman S, Roylance RR, Olpin S, Bevan S, Barker K, Hearle N, Houlston RS, Kiuru M, Lehtonen R, Karhu A, Vilkki S, Laiho P, Eklund C, Vierimaa O, Aittomäki K, Hietala M, Sistonen P, Paetau A, Salovaara R, Herva R, Launonen V, Aaltonen LA. **2002**. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet.* 30:406-13.

Truong LD, Shen SS. 2011. Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med.* 135:92-109.

Turner AJ. 1986. Processing and metabolism of neuropeptides. *Essays Biochem.* 22:69-119.

Turner AJ. 1987. Endopeptidase-24.11 and neuropeptide metabolism. En: *Neuropeptides and their peptidases.* Turner AJ (Eds.). Ellis Horwood Ltd.

U

Uemura H, Hasumi H, Kawahara T, Sugiura S, Miyoshi Y, Nakaigawa N, Teranishi J, Noguchi K, Ishiguro H, Kubota Y. **2005.** Pilot study of angiotensin II receptor blocker in advanced hormone-refractory prostate cancer. *Int J Clin Oncol.* 10:405-10.

Usmani BA, Janeczko M, Shen R, Mazumdar M, Papandreou CN, Nanus DM. **2000.** Analysis of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme (ACE) gene in patients with renal cancer. *Br J Cancer.* 82:550-2.

UICC. 2002. TNM Classification of Malignant Tumors. 6ª Edición. Wiley y Sons.

V

Valdivia A, Irazusta J, Fernández D, Múgica J, Ochoa C, Casis L. **2004.** Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia. *Regul Pept.* 122:79-84.

van den Berg E, van der Hout AH, Oosterhuis JW, Störkel S, Dijkhuizen T, Dam A, Zweers HM, Mensink HJ, Buys CH, de Jong B. **1993.** Cytogenetic analysis of epithelial renal cell tumors: Relationship with a new histopathological classification. *Int J Cancer.* 55:223-7.

Van der Jagt MF, Wobbles T, Strobbe LJ, Sweep FC, Span PN. **2010.** Metalloproteinases and their regulators in colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 101:259-69.

Van der Knaap R, Siemes C, Coebergh JWW, Van Duijn CM, Hofman A, Stricker BH. **2008.** Renin-angiotensin system inhibitors, angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, and cancer. *Cancer.* 112:748-57.

Varona A, Blanco L, López JI, Gil J, Irazusta J, Larrinaga G. **2007.** Basic and Neutral Peptidase Activities are altered in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Am J Physiol-Renal Physiol.* 92:780-8.

Varona A, Blanco L, López JI, Gil J, Agirregoitia E, Irazusta J, Larrinaga G. **2007**. Altered levels of acid, basic, and neutral peptidase activity and expression in human clear cell renal cell carcinoma. *Am J Physiol-Renal Physiol*. 292:780-8.

Varona A, Blanco L, Pérez I, Gil J, Irazusta J, López JI, Cándenas L, Pinto FM, Larrinaga G. **2010**. Expression and activity profiles of DPPIV/CD26 and NEP/CD10 glycoproteins in human renal cancer are tumor-type dependent. *BMC Cancer*. 10:193.

Vezeux G, Wang J, Corvol P, Llorens-Cortés C. **1996**. Identification of glutamate residues essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A. *J Biol Chem*. 271:9069-74.

Vinson GP, Barker S, Puddefoot JR, Tahmasebi M. **2007**. The rennin-angiotensin system in the breast. En: Leung PS (Eds.). *Frontiers in research of the renin-angiotensin system on human disease*. Springer. Holanda. Pp. 135-53.

W

Wakahara S, Konoshita T, Mizuno S, Motomura M, Aoyama C, Makino Y, Kato N, Koni I, Miyamori I. **2007**. Sinergistic expression of angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 in human renal tissue and confounding effects of hypertension on the ACE to ACE2 ratio. *Endocrinology*. 148:2453-7.

Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Kwan CH, Li KT, Szeto CC. **2009**. Discrepancy between intrarenal messenger RNA and protein expression of ACE and ACE2 in human diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 29:524-31.

Wang J, Cooper MD. **2004**. Aminopeptidase A. En: *Handbook of proteolytic enzymes*. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. 2nd edition. Elsevier Academic Press. Pp. 299-303.

Wang KL, Liu CJ, Chao TF, Huang CM, Wu CH, Chen TJ, Chiang CE. **2013**. Long-term use of angiotensin II receptor blockers and risk of cancer: a population-based cohort analysis. *Int J Cardiol*. 167:2162-6.

Weiss LM, Gelb AB, Medeiros LJ. **1995**. Adult renal epithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 103:624-35.

Weterman MA, van Groningen JJ, Tertoolen L, van Kessel AG. **2001**. Impairment of MAD2B-PRCC interaction in mitotic checkpoint defective t (X,1)-positive renal cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:13808-13.

Williams RN, Parsons SL, Morris TM, Rowlands BJ, Watson SA. **2005**. Inhibition of matrix metalloproteinase activity and growth of gastric adenocarcinoma cells by an angiotensin converting enzyme inhibitor in in vitro and murine models. *Eur J Surg Oncol*. 31:1042-50.

Wolf G, Mentzel S, Assmann KJ. **1997**. Aminopeptidase A: a key enzyme in the intrarenal degradation of angiotensin II. *Exp Nephrol*. 5:364-9.

Wysocki J, Ye M, Soler MJ, Gurley SB, Xiao HD, Bernstein KE, Coffman TM, Chen S, Battle D. **2006**. ACE and ACE2 activity in diabetic mice. *Diabetes*. 55:2132-9.

Wysocki J, González-Pacheco FR, Battle D. **2008**. Angiotensin-converting enzyme 2: possible role in hypertension and kidney disease. *Curr Hypertens Rep*. 10:70-7.

Y

Yan ZH, Ren KJ, Wang Y, Chen S, Brock TA, Rege AA. **2003**. Development of intramolecularly quenched fluorescent peptides as substrates of angiotensin-converting enzyme 2. *Anal Biochem*. 312:141-7.

Z

Zagon IS, Verderame MF, McLaughlin PJ. **2002**. The biology of the opioid growth factor receptor (OGFr). *Brain Res Brain Res Rev*. 38:351-76.

Zbar B. **1995**. Von Hippel-Lindau disease and sporadic renal cell carcinoma. *Cancer Surv*. 25:219-32.

Zhou L, Zhang R, Yao W, Wang J, Qian A, Qiao M, Zhang Y, Yuan Y. **2009**. Decreased expression of Angiotensin-converting enzyme 2 in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with tumor progression. *Tohoku J Exp Med*. 217:123-31.

Zhou M, Roma A, Magi-Galluzzi C. **2005**. Usefulness of immunohistochemical markers in the differential diagnosis of renal neoplasms. *Clin Lab Med*. 25:247-57.

Zhuo JL, Li XC. **2011**. New insights and perspectives on intrarenal rennin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides*. 32:1551-65.

Zisman A, Chao DH, Pantuck AJ, Kim HJ, Wieder JA, Figlin RA, Said JW, Belldegrun AS. **2002**. Unclassified renal cell carcinoma: Clinical features and prognostic impact of a new histological subtype. *J Urol*. 168:950-5.

VIII. Anexos

ANEXO I:

Tabla 1: Actividad de ACE, ACE2 y APA en las fracciones unida a membrana (APAm) y soluble (APAs) en neoplasias renales y tejido no tumoral adyacente. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Se representan la media \pm error estándar (ES) y los valores estadísticamente significativos mediante el Test de Mann-Whitney (**p<0,001; *p<0,05).

1a.- Actividad ACE

	Tumor	No neoplásico	p
CCRCC	1.12 \pm 0.11	4.49 \pm 0.64	<0.001
ChRCC	1.22 \pm 0.26	4.07 \pm 0.9	<0.05
RO	1.21 \pm 0.6	7.09 \pm 1.58	<0.05

1b.- Actividad ACE2

	Tumor	No neoplásico	p
CCRCC	32.05 \pm 3.21	50.52 \pm 4.79	<0.01
ChRCC	16 \pm 2.79	66.48 \pm 6.26	<0.01
RO	29.89 \pm 3.72	73.53 \pm 5.54	<0.05

1c.- Actividad APAm

	Tumor	No neoplásico	p
CCRCC	4705 \pm 506	9266 \pm 1213	<0.001
ChRCC	645 \pm 74	10066 \pm 762	<0.01
RO	376 \pm 168	12759 \pm 1219	<0.01

1d.- Actividad APAs

	Tumor	No neoplásico	p
CCRCC	1541 \pm 151	3695 \pm 337	<0.001
ChRCC	525 \pm 58	4811 \pm 440	<0.001
RO	1123 \pm 108	3828 \pm 301	<0.01

Tabla 2: Niveles de mRNA de ACE, ACE2 y APA (ENPEP) en tumores renales y tejido no neoplásico adyacente. Los datos de qRT-PCR para cada muestra analizada se expresan en unidades relativas. Se representan la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos mediante el Test de Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

2a.- Niveles de mRNA ACE

	Tumor	No neoplásico	p
CCRCC	2.917 \pm 0.62	2.234 \pm 0.64	0.138
ChRCC	0.094 \pm 0.054	0.914 \pm 0.48	0.149
RO	1.19 \pm 0.86	1.184 \pm 0.67	0.564

2b.- Niveles de mRNA ACE2

	Tumor	No neoplásico	p
CCRCC	3.91 \pm 1.13	2.49 \pm 0.67	0.77
ChRCC	0.008 \pm 0.004	0.785 \pm 0.27	0.021
RO	0.35 \pm 0.28	1.3 \pm 0.8	0.149

2c.- Niveles de mRNA APA (ENPEP)

	Tumor	No neoplásico	p
CCRCC	7.496 \pm 1.819	3.45 \pm 0.93	0.039
ChRCC	0.011 \pm 0.005	0.779 \pm 0.287	0.083
RO	0.701 \pm 0.016	1.458 \pm 0.81	0.021

ANEXO II:

Tabla 3: Actividad de ACE, ACE2 y APA en las fracciones unida a membrana (APAm) y soluble (APAs) en CCRCC con grados y estadios bajos y altos. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por mg de proteína. Se representan la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos mediante el Test de Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

3a.- Actividad ACE y ACE2 por grados

	Grado bajo (G1-G2)	Grado alto (G3-G4)	p
ACE	0.879 \pm 0.08	1.365 \pm 0.18	<0.05
ACE2	28.75 \pm 4.09	33.24 \pm 4.55	ns

3b.- Actividad APAm y APAs por grados

	Grado bajo (G1-G2)	Grado alto (G3-G4)	p
APAm	6099 \pm 1689	6313 \pm 1105	ns
APAs	1193 \pm 231	1895 \pm 213	<0.05

3c.- Actividad ACE y ACE2 por estadios

	Estadio bajo (T1-T2)	Estadio alto (T3-T4)	p
ACE	1.152 \pm 0.14	1.03 \pm 0.10	ns
ACE2	30.69 \pm 3.62	31.88 \pm 5.90	ns

3d.- Actividad de APAm y APAs por estadios

	Estadio bajo (T1-T2)	Estadio alto (T3-T4)	p
APAm	6322 \pm 1169	5699 \pm 893	ns
APAs	1563 \pm 210	1693 \pm 310	ns

Tabla 4. Niveles de mRNA de ACE, ACE2 y APA (ENPEP) en CCRCC con grados y estadios bajos y altos. Los datos de qRT-PCR para cada muestra analizada se expresan en unidades relativas. Se representan la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos mediante el Test de Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

4a.- Niveles de mRNA de ACE, ACE2 y APA por grados

	Grado bajo (G1-G2)	Grado alto (G3-G4)	p
ACE	3.05 \pm 0.98	2.8 \pm 0.82	0.786
ACE2	4.69 \pm 1.32	3.39 \pm 1.92	0.328
APA	10.65 \pm 3.47	5.05 \pm 1.46	0.304

4b.- Niveles de mRNA de ACE, ACE2 y APA por estadios

	Estadio bajo (T1-T2)	Estadio alto (T3-T4)	p
ACE	2.26 \pm 0.63	3.16 \pm 1.19	0.739
ACE2	2.99 \pm 1.11	3.22 \pm 1.23	0.693
APA	7.44 \pm 1.94	8.18 \pm 3.83	0.833

