

DEPARTAMENT D'ANATOMIA PATOLÒGICA, FARMACOLOGIA I MICROBIOLOGIA  
FACULTAT DE MEDICINA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

# **EXPRESSIÓ DE KIT I PDGFR EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS**

**“DISCUSSIÓ DEL SEU PAPER COM A POSSIBLES DIANES TERAPÈUTIQUES”**

Tesi presentada per Anna Petit Montserrat

Per optar al grau de Doctora en Medicina

Directora de la tesi: Dra.Carme Mallofré Gómez

Barcelona, 30 de Juny del 2008



La Doctora Carme Mallofré Gómez, Professora Associada d'Anatomia Patològica del Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia de la Universitat de Barcelona, Doctora en Medicina i Cirurgia i Consultora del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona, certifica que la tesi: **“EXPRESSIÓ DE KIT I PDGFR EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS: discussió del seu paper com a possibles dianes terapèutiques”** de la que és autora Anna Petit Montserrat, Llicenciada en Medicina i Cirurgia, ha estat realitzada sota la seva direcció i es troba en condicions de ser defensada davant del tribunal corresponent.

Per a que així consti, signo la següent certificació a Barcelona, 30 de Juny del 2008

Dra. Carme Mallofré Gómez

Els estudis que s'han dut a terme en aquesta tesi han estat parcialment finançats per les següents beques i ajuts:

- BECA FINAL DE RESIDÈNCIA DE L'HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA 2005
- BECA FISS PI 020519 (2002-2005)

Aquests estudis han generat les següents publicacions a revistes de l'especialitat:

1. M.Castillo, A.Petit, B.Mellado, A.Palacín, J.B.Alcover, C.Mallofré  
**"C-KIT Expression in Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma: Potential therapy with Imatinib"**  
 Journal of Urology 2004; 171: 2176-2180
2. A.Petit, M.Castillo, M.Santos, B.Mellado, J.B. Alcover, C.Mallofré  
**"KIT expression in Chromophobe Renal Cell Carcinoma: Comparative Immunohistochemical Analysis of KIT Expression in Different Renal Cell Neoplasms."**  
 American Journal of Surgical Pathology 2004; 28: 676-678
3. A.Petit, M. Castillo, B. Mellado, C. Mallofré.  
**"c-KIT overexpression in Chromophobe Renal Cell Carcinoma is not associated with c-KIT mutation of exons 9 and 11"**. Letter to the editor  
 American Journal of Surgical Pathology 2005, 29:1544-1545

Està en curs l'enviament per publicació d'un quart treball :

4. A. Petit, M. Castillo, A. Gaspa, D. Colome, X. Garcia de Albéniz, C. Moreno, M. Camós, B. Mellado, C. Mallofré  
**"Expression and mutational analyses of KIT and PDGFR- $\alpha$  in Sarcomatoid renal cell carcinoma"**

## AGRAÏMENTS:

Al finalitzar aquesta tesi, voldria agrair a totes aquelles persones que l'han fet possible.

A tots els patòlegs i patòlogues del servei, que m'han ensenyat a entendre, apreciar i valorar els fonaments de l'Anatomia Patològica i els seus reptes futurs.

A la Marga i l'Elena per la seva disponibilitat, alegria i per ensenyar-me el secret de les olles i el valor de la immunohistoquímica ben feta.

A la Ira, la Laura Pla, la Laura Gilabert i l'Eva per fer possible els arrays de teixit i per la seva professionalitat i dedicació.

A la Olga Luna i Judith Vela per ajudar-me amb la tècnica de PCR i aconseguir el millor DNA possible.

Al Dr. Palacín i al Dr. Pedro Fernández pel seu temps i per ensenyar-me a interpretar i a ser crítica amb els resultats immunohistoquímics obtinguts.

A la Dolors Colomé i l'equip hematopatologia pel temps, disponibilitat i acollida per realitzar l'estudi mutacional.

A la Begoña Mellado per les seves aportacions clíniques com a oncòloga en aquest treball.

Al Xabi pel temps, l'esforç i l'ajuda en l'estudi estadístic i en la interpretació dels resultats.

Al Dr. Bombí i a tots aquells (Rami, Llúcia, Elies,...) que han insistit persistentment per a combatre el meu afany d'eternització d'aquest treball.

A l'Alfons pel suport, consell i visió crítica.

A la Fuencisla, Teresa, Roser, Mercè i Cristina pels ànims, la seva autenticitat i per tenir sempre la porta oberta.

Als Residents (Susana, Adriana, Flavia, Eva, Àngels, Alba, Vicky i Dani) per l'estímul i ànims durant aquest temps pre-tesi.

A la Rosana per la companyia en moments de dubte i de treball extra-horari (que espero que en el futur sigui intra-horari) i pel seu sentit de responsabilitat professional.

A l'Anna Mo pels moments de servei grupal compartit i per ser sempre un contrapunt crític. A l'Albert per compartir el feixug estudi de PDGFR i per les seves aportacions com a coautor i persona.

A la Mònica i a la Marta per ser un estímul constant com a Rpetites i un referent com a Rgrans tant com a patòlogues com a sers únics i irrepetibles.

Al Joaquim per l'amistat, l'ajuda i les rialles durant els moments difícils de la residència i l'any de beca.

A les amigues (Asun, Zuriñe, Lia, Irene, Leire, Lucia, Stefania, Claudia, Gertru, ...) que han comprès els dies d'ordenador i d'aïllament i sempre m'han animat a acabar aquest treball. A la Mercè per ajudar-me a definir prioritats en el treball i com a persona.

A la Mireia Castillo, sense la qual aquest treball no s'hagués encetat ni acabat. Per ser sempre la meva Rgran, per l'ajuda, la implicació, i l'esperit lluitador i de sentit de grup que sempre m'ha transmès.

A la Carme per ser la tutora d'aquesta tesi, l'acompanyament i ànims per poder concloure aquest treball.

A la meva família,  
 papa, per la seva sinceritat, coherència i per ser un referent en el sentit de la responsabilitat  
 mama, per la comprensió en moments difícils  
 Núria, per l'esperit crític, per ser exemple d'integritat personal i creure que puc intentar ser més persona  
 padrí, per seu esforç i esperit de treball  
 padrina, per la gran sensibilitat i dedicació  
 tieta Ramona, per les moltes converses i l'estimació en el dia a dia  
 tieta Ramoneta, pels ànims i creure en aquesta professió  
 Jaume i Josep Maria per ser els cosins de sempre  
 Gràcies a tots ells per posar molt de dins i estar sempre presents en el recorregut d'aquesta etapa.

# 1. ÍNDEX

INTRODUCCIÓ

<b>1. ÍNDEX.....</b>	<b>6-8</b>
<b>2. ABREVIATURES I CONCEPTES.....</b>	<b>9-12</b>
<b>3. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>12-58</b>
<b>3.1. ENFOC TRANSLACIONAL EN L'ABORDATGE DEL CÀNCER</b>	
<b>3.2. PROTEÏNES AMB ACTIVITAT QUINASA: definició i paper en oncogènesi</b>	
<b>3.3. KIT I PDGFR: exemples de proteïnes amb activitat quinasa</b>	
3.3.1. Característiques generals	
3.3.2. Funcions de KIT i PDGFR	
3.3.3. Participació en oncogènesi de KIT i PDGFR	
<b>3.4. LA TERÀPIA BIOLÒGICA EN EL TRACTAMENT DEL CÀNCER</b>	
3.4.1. Generalitats	
3.4.2. Receptors tirosina-quinasa: dianes de la Teràpia Biològica	
3.4.3. Receptors tirosina-quinasa i teràpia antiangiogènesi.	
3.4.4. Exemples d'abordatge translacional i tractament exitós amb Inhibidors tirosina-quinasa: Leucèmia Mieloide Crònica i Tumor de l'Estroma Gastrointestinal.	
<b>3.5. TUMORS DE CÈL·LULES RENALS</b>	
3.5.1. Generalitats	
3.5.2. Subtipus histològics i patogènia	
3.5.2.1. Carcinoma renal de cèl·lula clara	
3.5.2.2. Carcinoma de cèl·lules renals quístic i multilocular	
3.5.2.3. Carcinoma renal papil·lar	
3.5.2.4. Carcinoma renal associat a translocacions Xp11.2	
3.5.2.5. Carcinoma renal cromòfob	
3.5.2.6. Oncocitoma renal	
3.5.2.7. Carcinoma de conductes col·lectors o de Bellini	
3.5.2.8. Carcinoma renal medul·lar	
3.5.2.9. Carcinoma mucinos tubular amb cèl·lules fusiformes	
3.5.2.10. Carcinoma renal no-classificable	
3.5.2.11. La diferenciació sarcomatoide en els carcinomes renals	
3.5.3. Factors pronòstics	
<b>3.6. ABORDATGE TRASLACIONAL DEL CARCINOMA RENAL DE CÈL·LULA CLARA : coneixement de la seva biologia i implementació de noves teràpies biològiques</b>	
<b>3.7. INTERÈS I VALOR DE L'EXPRESSIÓ IMMUNOHISTOQUÍMICA DE DIANES MOLECULARS EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS.</b>	
<b>4. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS.....</b>	<b>59-63</b>

<b>5. MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>64-77</b>
<b>5.1. ESTUDI DE L'EXPRESSION DE KIT EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS AMB ESPECIAL ATENCIÓ AL CARCINOMA RENAL AMB DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE</b>	
5.1.1. Selecció de la sèrie de Tumors de cèl·lules renals per estudi de KIT	
5.1.2. Selecció de la sèrie de Carcinomes renals amb diferenciació sarcomatoide per estudi de KIT	
5.1.3. Condicions de la tècnica immunohistoquímica per KIT	
5.1.4. Condicions d'avaluació de l'expressió de KIT	
<b>5.2. ESTUDI DE L'EXPRESSION DE PDGFR EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS AMB ESPECIAL ATENCIÓ AL CARCINOMA RENAL AMB DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE</b>	
5.2.1. Selecció de la sèrie de Tumors de cèl·lules renals per estudi de PDGFR i elaboració d'arrays de teixit.	
5.2.2. Selecció de la sèrie de Carcinomes renals amb diferenciació sarcomatoide per estudi de PDGFR	
5.2.3. Condicions de la tècnica immunohistoquímica per PDGFR	
5.2.4. Condicions d'avaluació de l'expressió de PDGFR	
<b>5.3. ESTUDI MUTACIONAL DE KIT I PDGFRA EN CARCINOMA RENAL AMB DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE.</b>	
<b>6. RESULTATS.....</b>	<b>78-125</b>
<b>7. DISCUSSIÓ.....</b>	<b>126-140</b>
<b>7.1. EXPRESSION DE KIT EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS</b>	
<b>7.2. EXPRESSION DE PDGFR EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS</b>	
7.2.1. Valor diagnòstic de PDGFR en Tumors de Cèl·lules renals	
7.2.2. Significat biològic de l'expressió de PDGFR en Tumors de cèl·lules renals amb especial atenció al Carcinoma Renal de Cèl·lula Clara	
7.2.3. Valor terapèutic de PDGFR en Carcinoma Renal de Cèl·lula Clara	
7.2.4. Valor pronòstic de PDGFR en Carcinoma Renal de Cèl·lula Clara	
<b>7.3. EXPRESSION I ESTUDI MUTACIONAL DE KIT I PDGFR EN CARCINOMA RENAL AMB DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE</b>	
<b>7.4. ESTUDIS D'EXPRESSION PROTEICA DE DIANES MOLECULARS EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS</b>	
7.4.1. Situació actual	
7.4.2. La nostra experiència	
7.4.3. Reptes de futur	
<b>8. CONCLUSIONS.....</b>	<b>141-143</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>144-152</b>



## **2. ABREVIATURES I CONCEPTES**

## 2.- ABREVIATURES I CONCEPTES

### **FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA)**

Aquest és un organisme del govern federal dels Estats Units que té com a missió protegir la salut pública i garantir que els medicaments, productes cosmètics i suplementes nutricionals compleixin tots els requisits pel seu consum. Aquesta institució també assegura que els dispositius i equips mèdics siguin segurs i eficaços i que la sang per les transfusions i el teixit pels trasplantaments compleixin totes les normatives.

### **AGENCIA EUROPEA DEL MEDICAMENTO (EMA)**

L'Agència Europea del Medicament és un organisme de la Unió Europea que té com a principal responsabilitat la protecció i promoció de la salut pública i animal, mitjançant la supervisió dels medicaments d'ús humà i veterinari.

L'EMA és responsable de l'avaluació científica i autorització de les sol·licituds europees per comercialització de medicaments.

La seguretat dels medicaments es controla constantment per l'Agència a través d'una xarxa de farmacovigilància. L'EMA adopta les mesures oportunes quan s'informa sobre efectes adversos de medicaments. L'Agència també participa activament en la promoció de la innovació i la investigació en l'indústria farmacèutica.

### **SUPERVIVÈNCIA LLIURE DE MALALTIA (PROGRESSION-FREE SURVIVAL)**

Indica el temps durant el qual el pacient és viu sense recaiguda o empitjorament de la malaltia. Aquest paràmetre s'utilitza en els estudis o assajos clínics per determinar l'efectivitat d'un nou tractament.

### **MITJANA DE SUPERVIVÈNCIA**

Indica el temps mitjana de vida dels pacients. Aquest temps es calcula des del moment del diagnòstic o el principi del tractament.

### **TEMPS A LA PROGRESSIÓ**

Mesura de temps que transcorre des del diagnòstic o tractament d'una malaltia fins que la seva recaiguda o empitjorament.

### **AVALUACIÓ DE LA RESPOSTA AL TRACTAMENT QUIMIOTERÀPIC**

Existeixen dos sistemes per avaluar la resposta a un tractament quimioteràpic.

L'establert per l'Organització mundial de la salut (WHO) i l'anomenat "RESPONSE EVALUATION CRITERIA IN SOLID TUMORS" (RECIST).

Mentre que la WHO utilitza com a referència de mida tumoral la suma de les dues dimensions d'un tumor, el RECIST fa servir la suma unidimensional del tumor.

S'han definit diferents tipus de resposta del tumor a un tractament quimioteràpic:

#### Resposta completa

Tant la WHO com el RECIST la defineixen com la desaparició del tumor (valorada a les 4 setmanes del tractament)

#### Resposta parcial

La WHO la defineix com una disminució del 50% de la suma bidimensional de la tumoració a les 4 setmanes del tractament

La RECIST la defineix com una disminució del 30% de la mida unidimensional de la tumoració a les 4 setmanes del tractament

### Estabilització de la malaltia

Tant la WHO com RECIST la defineixen com un estat intermig en el que la tumorció no compleix criteris de Resposta parcial ni de Progressió de la malaltia

### Progressió de la malaltia

La WHO i la RECIST la defineixen com un increment del 25% o 20% de la mida tumoral respectivament

### **DOSI MÀXIMA TOLERADA (MTD)**

Es defineix com la dosi diària més alta d'un fàrmac que no causa toxicitat en un estudi de 9 dies en models animals. L'establiment d'aquesta dosi permet realitzar una avaluació de la seguretat a llarg termini en els mateixos models animals que dura 2 anys.

### **DOSI ÒPTIMA BIOLÒGICA (OBD)**

Es la dosi mínima d'un fàrmac que produeix el màxim efecte biològic.

### **PERFORMANCE STATUS**

És una mesura que pretén quantificar l'estat general dels pacients amb càncer.

Hi ha diferents sistemes de valoració. El més utilitzat és la valoració de Karnofsky i la de Zubrod.

El sistema de Karnofsky va del 0 al 100% essent el 0 la mort i el 100% un estat sa del pacient.

El sistema de Zubrod implementat per Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) i la WHO va de 0 a 5 i es valora amb un 0 un estat sa del pacient i amb un 5 la seva mort.

# 3. INTRODUCCIÓ

### 3.-INTRODUCCIÓ

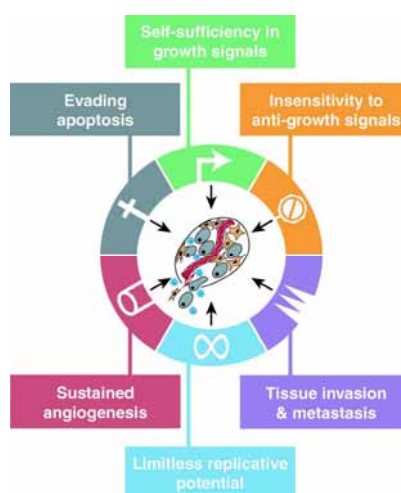
#### 3.1.- ENFOC TRANSLACIONAL EN L'ABORDATGE DEL CÀNCER

El càncer es considera el resultat d'un procés en que successives alteracions genètiques en la cèl·lula fan que aquesta adquireixi la capacitat de proliferar de forma autònoma i descontrolada, invair els teixits adjacents i metastatitzar.

El **progrés de la biologia molecular** ha permès identificar **mecanismes i molècules** que condueixen al desenvolupament del càncer. S'han definit sis alteracions essencials en la fisiologia cel·lular que acompanyen a la transformació maligna <sup>1</sup> (Figura 3.1.1):

- Autosuficiència respecte a factors de creixement
- Insensibilització davant els senyals d'inhibició del creixement
- Evasió de la mort cel·lular programada (apoptosi)
- Potencial replicatiu il·limitat
- Angiogènesi sostinguda
- Potencial d'invasió tissular i de metastasi.

En aquest sentit no sols es coneixen mecanismes **genèrics** d'oncogènesi si no que també s'han dilucidat events patogenètics **específics** de determinats tipus de tumors.



**Figura 3.1.1.** Esquema que il·lustra les capacitats funcionals adquirides per la cèl·lula durant la seva transformació neoplàstica.<sup>1</sup>

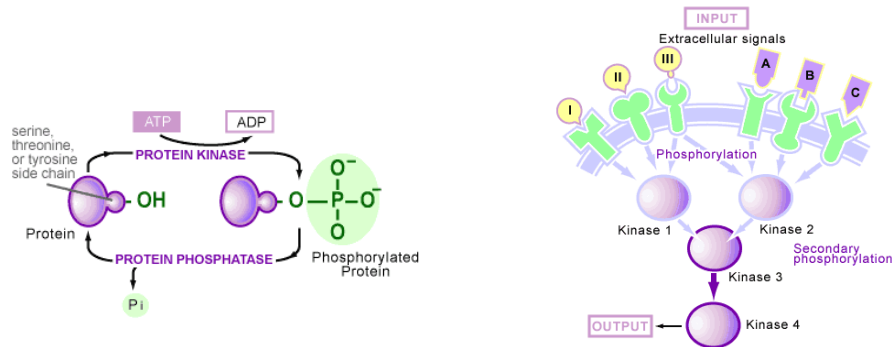
Actualment es segueix avançant en el camp de la recerca oncològica bàsica i clínica amb l'objectiu d'entendre el perquè de la transformació neoplàstica i així poder crear noves estratègies diagnòstiques, pronòstiques i sobretot terapèutiques encaminades a combatre el càncer.

Precisament l'**enfoq translacional** del càncer implica un treball interdisciplinari entre diferents professionals (bioquímics, biòlegs, farmacèutics, patòlegs, radiòlegs, oncòlegs, informàtics entre altres) i sobretot pretén el trasllat de les descobertes científiques a la pràctica clínica i així millorar l'esperança i qualitat de vida del malalt oncològic.

### 3.2.- PROTEÏNES AMB ACTIVITAT QUINASA: definició i paper en oncogènesi

Les proteïnes amb activitat quinasa constitueixen una família d'enzims **transmembrana** i **citòsòlics** que s'encarreguen de catalitzar la fosforilació de residus de **Tirosina, Serina o Treonina** de diverses proteïnes.

L'adició d'un grup fosfat (amb càrrega negativa) condueix a un canvi conformacional de la proteïna que la pot fer enzimàticament activa o inactiva. Aquesta reacció és reversible mitjançant la desfosforilació de la proteïna per les fosfatases. Així doncs, la fosforilació actua com un mecanisme d'activació-inactivació proteica (Figura 3.2.1).



**Figura 3.2.1.** Aquests esquemes representen l'activitat enzimàtica de les proteïnes quinasa i fosfatasa (esquerra) i el mecanisme de fosforilació en cascada de les proteïnes quinasa i en el que es fonamenten les vies de transducció de senyal (dreta). <http://www.scq.ubc.ca/protein-phosphorylation-a-global-regulator-of-cellular-activity/>

Les proteïnes quinasa participen en vies de transducció de senyal. L'arribada d'una senyal (factor de creixement) a la superfície cel·lular desencadena la fosforilació d'una primera proteïna quinasa (generalment un receptor transmembrana) la qual esdevé enzimàticament activa i capaç de fosforilar una altra proteïna quinasa i així de forma consecutiva. D'aquesta manera la via de transducció roman activada fins que les fosfatases defosforilen les proteïnes anul·lant la seva acció quinasa (Figura 3.2.1.)

La cèl·lula utilitza aquest mecanisme de cascades de fosforilació-defosforilació per regular processos tant essencials com són el creixement, la diferenciació i la supervivència cel·lular.

Així doncs les proteïnes amb activitat quinasa són unes de les molècules que participen de forma crítica en la regulació de l'equilibri entre creixement i mort cel·lular programada (apoptosi). Per tant, un desajust de la seva funció pot conduir a una proliferació descontrolada de la cèl·lula i contribuir a la transformació neoplàstica de la mateixa.<sup>2 3</sup>

En aquest sentit, s'ha documentat l'alteració o expressió aberrant de proteïnes quinasa en nombrosos tumors. Alhora s'han descrit diferents **mecanismes que poden conduir a la seva desregulació i transformació oncogènica**: les mutacions puntuals amb guany de funció, les translocacions amb formació de proteïnes quimèriques, les amplificacions genètiques, l'alteració de la maquinària transcripcional entre altres.

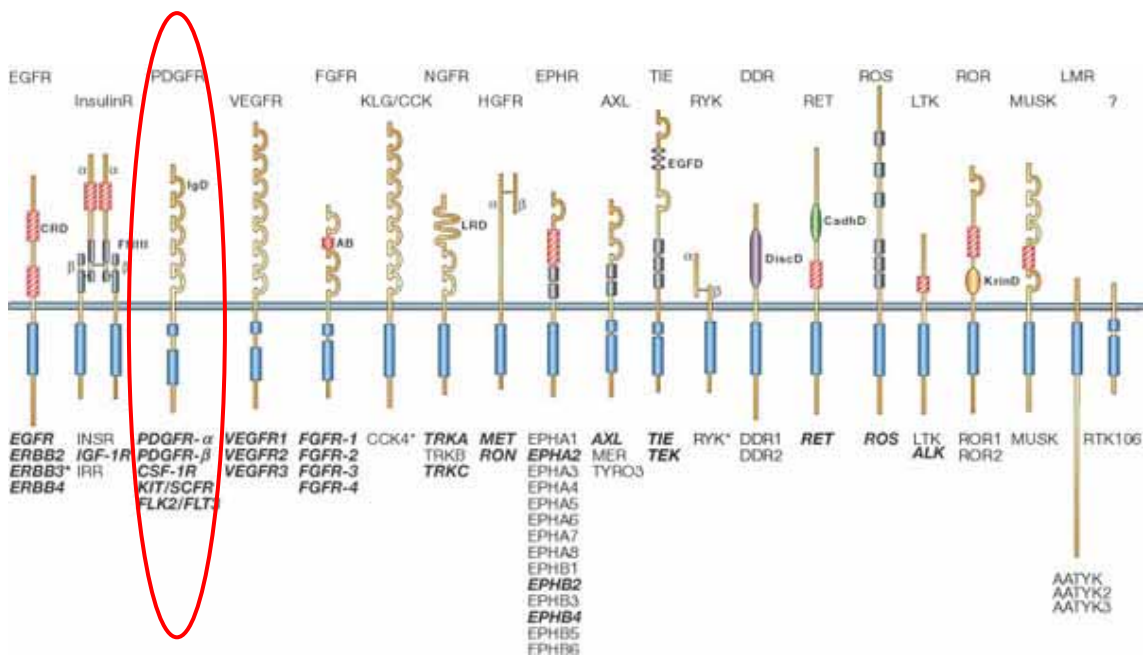
En general aquests mecanismes comporten un increment de funció o una activació constitutiva de l'activitat quinasa d'aquestes proteïnes que escapa als sistemes de control cel·lular.<sup>4</sup>

### 3.3.- KIT I PDGFR: exemples de proteïnes amb activitat quinasa

#### 3.3.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

KIT i el Receptor del factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGFR-Platelet-derived growth factor Receptor) són proteïnes **transmembrana** amb activitat quinasa situades en la superfície cel·lular. Totes dues pertanyen a la **família de receptors tirosina-quinasa subclasse III** i comparteixen la mateixa estructura:

Un **domini extracel·lular** d'unió específica al seu lligand, un únic domini **transmembrana** hidrofòbic, un **juxtamembrana** de gran importància per la regulació de la dimerització d'aquests receptors i un domini **tirosina-quinasa (catalític)** intracitoplasmàtic amb una inserció central (Figura 3.3.1).



**Figura 3.3.1.** Aquest esquema representa les 20 subfamílies de receptors tirosina-quinasa descrites. El KIT, PDGFR es troben dins la subclasse III. En la part de dalt de l'esquema està indicat el receptor prototípic de cada família i en la part de baix els seus membres.<sup>2</sup>

Significat de les abreviatures: EGFR, epidermal growth factor receptor, InR, insulin receptor, PDGFR platelet,-derived growth factor receptor, VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor, FGFR, fibroblast growth factor receptor, KNG/CCK, colon carcinoma kinase, NFR, nerve growth factor receptor, HGFR, hepatocyte growth factor receptor, EphR ephrin receptor, TIE tyrosine kinase receptor in endothelial cells, RYK receptor related to tyrosine kinases, DDR discoidin domain receptro, Ret, rearranged during transfection, LTK leukocyte tyrosine kinase, ROR, receptor orphan, MuSK muscle-specific kinase, LMR lemur. IgD immunoglobulin-like domain, CRD cysteine-rich domain, DisD discoidin-like domain, EGFR epidermal growth factor-like domain, FNI fibronectin type III-like domain, IgD immunoglobulin-like domain, KrinD kringle-like domain, LRD leucine rich domain. Els receptors assenyalats amb cursiva i amb negreta estan implicats en l'oncogènesi de diferents tumors. L'asterisc indica que la proteïna no té activitat quinasa intrínseca.

Aquests receptors s'encarreguen de transduir senyals extracel·lulars cap al citoplasma. La **unió del lligand** amb el receptor fa que aquest es dimeritzi, s'autofosforili i adquireixi activitat tirosina-quinasa. Així és capaç de fosforilar residus tirosina d'altres proteïnes activant-se així vies de transducció de senyal com la de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT i la del Ras/mitogen-activat proteïna quinasa (MAPK) ambdós crucials en la proliferació i diferenciació cel·lular.<sup>5</sup>

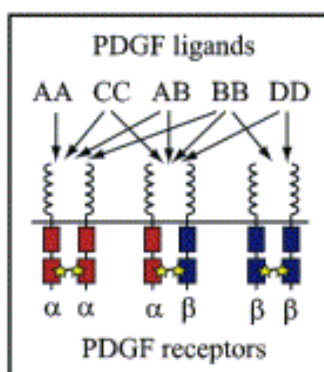
### 3.3.2. FUNCIONS DE KIT I PDGFR

En l'organisme el **KIT** i el seu factor de creixement conegut com a "Factor de la cèl.lula mare" o pel seu nom en anglès de "stem cell factor" (**SCF**) tenen un paper crític en la proliferació, la diferenciació i l'adhesió cel·lular i són essencials pel desenvolupament de melanòcits, cèl·lules hematopoiètiques mare, cèl·lules germinals, mastòcits i cèl·lules intersticials de Cajal. A més a més s'ha demostrat que l'activació de KIT El KIT es troba **codificat** al braç llarg del cromosoma 4 (4q11-12) <sup>6 7 6,8</sup>

El **PDGFR** és el receptor d'un dels factors de creixement més estudiats; el factor de creixement de les plaquetes (**PDGF**).

El PDGF es presenta en forma de dímers de dos cadenes polipeptídiques unides per ponts disulfur en diverses combinacions AA, AB, BB, CC i DD.

Per altra banda, el PDGFR té dos isoformes l'alfa i la beta. L'isoforma alfa (PDGFRA) s'uneix a les cadenes A-, B- i C- mentre que la isoforma beta (PDGFRB) s'uneix a les cadenes B- i D- del lligand. Les cadenes CC i DD de PDGF es poden unir tant a la forma alfa com beta del receptor (Figura 3.3.2). <sup>9</sup>



**Figura 3.3.2.** En aquest esquema es representen les diferents isoformes del receptor PDGFR (l'alfa i la beta) i del lligand PDGF (AA,AB,BB,CC,DD) així com les diferents combinacions que poden esdevenir-se entre ells. <sup>10</sup>

A continuació es detalla el **locus** de les diferents isoformes de PDGF i de PDGFR.

proteïna	locus
PDGFRA	4q 11-12
PDGFRB	5q 31-32
PDGFA	7p22
PDGFB	22 q 12.3-13.1
PDGFC	4 q 32
PDGFD	11 q 22.3

El tandem PDGF/PDGFR té importants funcions durant l'**embriogènesis**.

El PDGFRA juga un paper important en el desenvolupament de les cèl·lules neurals i del fol·licle pilós. La forma beta participa en la formació de la paret vascular i de les cèl·lules mesangials al ronyó. En l'**adult** la senyalització mitjançada per PDGF contribueix a la cicatrització de les ferides mitjançant l'estimulació de fibroblasts, de cèl·lules musculars llises i de diferents cèl·lules inflamatòries. De fet, el PDGF es considera un important mitogen pel teixit connectiu. <sup>9 10</sup>

L'expressió de PDGF/PDGFR i la seva sobreexpressió s'associa a moltes condicions patològiques com malalties fibròtiques, vasculoproliferatives així com al càncer <sup>11 12</sup>



### 3.3.3. PARTICIPACIÓ EN ONCOGÈNESI DE KIT I PDGFR

El KIT i PDGFR són proteïnes transmembrana amb activitat tirosina-quinasa que juguen un paper primordial en la transducció de **senyals de proliferació** de l'exterior a l'interior cel·lular.

Es considera que aquests dos receptors tenen potencial oncogènic (proto-oncogens) ja que s'ha vist que la seva activació desmesurada pot conduir a la transformació neoplàstica de la cèl·lula a través de les següents accions (Figura 3.3.3.):

#### - . ESTIMULACIÓ AUTOCRINA DE LES CÈL·LULES. (KIT i PDGFR)

La unió d'aquests receptors al seus corresponents factors de creixement desencadena tot un seguit de vies de transducció de senyal encaminades a promoure la divisió cel·lular.

La sobreactivació de PDGFR i KIT en les **cèl·lules tumorals** (per la sobreexpressió dels seus lligands o per mutacions en els seus gens) provoca que la cèl·lula estigui subjecta a una senyal contínua de proliferació.

#### - . MANTENIMENT DE L'ESTROMA TUMORAL (PDGFRB)

El PDGFR-beta participa en el reclutament de fibroblasts a través de l'acció del PDGF. L'estroma ric amb fibroblasts s'observa en una gran part dels tumors sòlids.

Estudis immunohistoquímics han demostrat expressió de PDGFR-beta (PDGFRB) en les **cèl·lules estromals del càncer** de mama, colon, pulmó, ovari i pàncrees. S'hipotetitzava que el PDGFR podria tenir un paper important en el manteniment de l'estroma tumoral i indirectament de la cel·lularitat neoplàstica.

#### - . PROMOCIÓ DE L'ANGIOGÈNESI (PDGFRB)

El "loop" PDGF-PDGFR beta té un paper fonamental en el reclutament dels perícits i el recobriments de les cèl·lules endotelials pels mateixos. Aquest fet permet el desenvolupament de capil·lars funcionals.

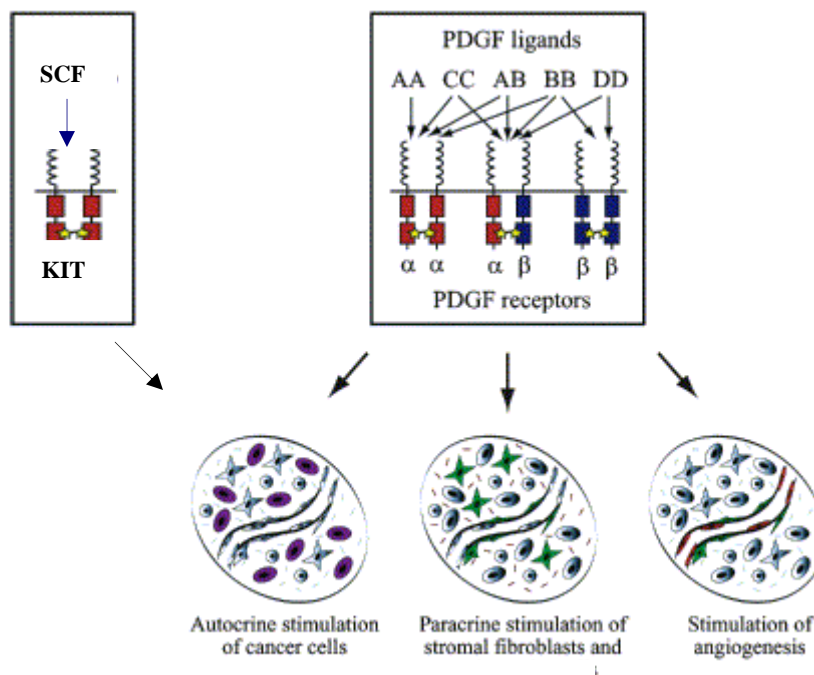
En diferents estudis s'ha demostrat que la sobreproducció de PDGF per **cèl·lules tumorals** s'associa a un augment en el nombre de perícits i com aquest fet promou l'angiogènesi i el creixement tumoral.<sup>11</sup>

#### - . MANTENIMENT DE LA PRESSIÓ INTERSTICIAL (PDGFRB)

L'expressió de PDGFR-beta en les cèl·lules de l'estroma també contribueix a la pressió intersticial dels teixits. Aquesta pressió controla l'alliberament de substàncies cap a l'interstici a través de la paret dels capil·lars.

Molts **tumors** sòlids tenen una elevada pressió intersticial per un augment en l'expressió de PDGFRB en les **cèl·lules de l'estroma**. En models animals s'ha documentat que la inhibició de PDGFR disminueix la pressió intersticial i augmenta l'alliberament de fàrmacs quimioteràpics des dels capil·lars al teixit.

Per aquest motiu s'ha proposat l'ús de fàrmacs inhibidors selectius de PDGFR com una bona estratègia per millorar l'eficàcia de les drogues quimioteràpiques.



**Figura 3.3.3.** En aquest esquema s'il·lustren les formes en les que SCF/KIT i PDGF/PDGR poden participar en l'oncògenesi: estimulant el creixement de les cèl·lules tumorals (KIT, PDGR), dels fibroblasts, pericits i cèl·lules endotelials (PDGR) .<sup>10</sup>

S'han descrit diferents **mecanismes oncogènics** que condueixen a la **funció anòmala** d'aquestes proteïnes tirosina-quinasa:

- 1.- Sobreestimulació paracrina i/o autocrina del receptor pel seu lligand.
- 2.- Mutacions amb activació constitutiva de la proteïna tirosina-quinasa.
- 3.- Translocacions que formen proteïnes quimèriques amb activitat tirosina-quinasa constitutiva.
- 4.- Amplificació gènica

KIT i PDGR s'han relacionat amb la **patogènia de les neoplàsies que es detallen a continuació**. El mecanisme pel qual aquestes proteïnes es desregulen i s'activen en cadascun d'aquests tumors s'indica en la taula següent (Figura 3.3.4.):

Proteïna	Neoplasia	Mecanisme patogènètic d'activació
KIT	GIST	Mutacions puntuals
PDGFRA	GIST	Mutacions puntuals
KIT	Mastocitosi	Mutacions puntuals
KIT	Subgrup Seminomes	Mutacions puntuals
PDGFRA	Síndrome Hipereosinofílica	Deleció intracromosòmica amb formació d'una proteïna quimèrica FIP1L1-PDGFRA
PDGFRB	Subgrup de leucèmies mieloides cròniques BCR-ABL negatives	Translocació cromosòmica amb formació d'una proteïna quimèrica t(5;12):EVT6-PDGFRB
PDGFB	Dermatofibrosarcoma protuberans	Translocació cromosòmica t(17;22): Col1A1-PDGFB amb sobreexpressió de PDGFB
PDGFRA	En un subgrup de gliomes d'alt grau	Amplificació de PDGFRA

En els Tumors de l'èstoma gastrointestinal (GIST) mutacions en KIT o PDGFRA condueixen a l'activació constitutiva d'aquests receptors precipitant la transformació neoplàstica de la cèl·lula. La majoria de mutacions en KIT es troben en els dominis jxtamembrana 11 (70-85%) i 9 (5-13%).<sup>13 14 15</sup>

Un altra malaltia causada per mutacions en KIT (en aquest cas que afecten al seu domini quinasa) és la Mastocitosi sistèmica. La mutació més freqüent consisteix en la substitució d'Àcid aspàrtic (ASP) per Valina (VAL) en el codó 816 que resulta en l'activació constitutiva de KIT.

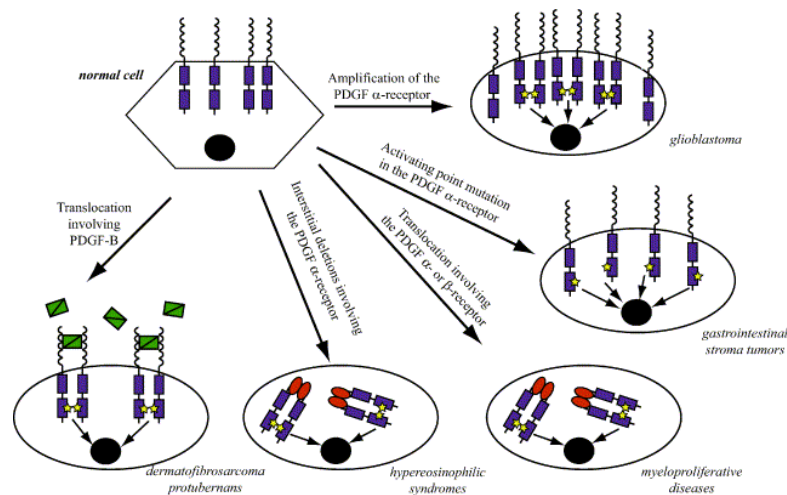
En la Síndrome hipereosinofílica es troba una deleció intracromosòmica en el cromosoma 4 que dona lloc a la fusió entre un gen de funció desconeguda el FIP1L1 i una forma truncada de PDGFRA. La proteïna de fusió FIP1L1-PDGFR4 és una tirosina-quinasa amb activitat constitutiva.

En un subgrup de malalts amb Leucèmia crònica mielomonocítica s'ha trobat la translocació t(5;12)(q33;p13) que condueix a la fusió dels gens EVT6 i PDGFRB donant lloc també a una proteïna quimèrica amb activitat constitutiva.

En el cas del Dermatofibrosarcoma protuberans s'esdevé una translocació cromosòmica que situa a l'exó 2 amb el gen PDGF B sota el control del promotor del gen COL1A1. En aquesta situació es sobreexpressa el gen PDGF B donant lloc a una estimulació autocrina i paracrina de les cèl·lules tumorals per aquest factor de creixement.

En un subgrup de gliomes d'alt grau s'ha trobat amplificació del gen pel PDGFRA que també condueix a la transformació neoplàstica.

10



**Figura 3.3.4.** En aquest esquema es representen els diferents mecanismes mutacionals que condueixen a activació de PDGF o PDGFR i la implicació patogenètica d'aquests mecanismes en diferents neoplàsies.<sup>11</sup>

### 3.4.- LA TERÀPIA BIOLÒGICA EN EL TRACTAMENT DEL CÀNCER

#### 3.4.1. GENERALITATS

El poder identificar proteïnes i vies de transducció de senyal oncogèniques ha donat peu a plantejar la seva inhibició farmacològica com una nova estratègia terapèutica per lluitar contra el càncer d'una forma més racional i dirigida.

En aquest sentit s'han desenvolupat els fàrmacs inhibidors de dianes moleculars o "target therapy". Aquests són una nova generació de drogues dissenyades per inhibir específicament una diana molecular (proteïna, mRNA) que tingui un paper crític en el creixement i la progressió tumoral.

Unes de les drogues que més s'han desenvolupat en aquest àmbit han estat els fàrmacs inhibidors de proteïnes amb activitat quinasa, especialment dels receptors tirosina-quinasa pel fet de ser aquests uns de les principals protagonistes de la transformació neoplàstica en molts tipus tumorals com ja hem esmentat.<sup>4 16 17</sup>

Aquesta aproximació de la "target therapy" basada en una comprensió detallada dels canvis moleculars que condueixen al càncer contrasta amb la filosofia de la quimioteràpia citotòxica clàssica i la inhibició més genèrica de mecanismes de proliferació cel·lular. En la taula adjunta s'exposen algunes de les diferències entre aquests dos abordatges terapèutics.

Quimioteràpia citotòxica clàssica	Teràpia biològica("Target therapy")
No implica el coneixement de la biologia tumoral Si implica la <b>valoració de la cinètica</b> del creixement tumoral	Si implica el <b>coneixement de la biologia tumoral</b>
<b>No és selectiva</b> i actua sobre qualssevol cèl·lula en proliferació	<b>Selectiva</b> actuant sobre les cèl·lules tumorals
Efectes secundaris greus sobre moll d'ós, mucoses i altres teixits amb alt recanvi cel·lular.	Menys efectes secundaris
Irreversible - efecte <b>citotòxic</b> sobre la cèl·lula	Reversible - efecte <b>citostàtic</b> sobre la cèl·lula aturant la proliferació
<b>MTD màxima dosi tolerada</b> Definida per la toxicitat	<b>OBD dosi amb efecte biològic òptim</b> Definida per la inhibició proteica
<b>Pauta dosi: (cicle+descans)</b>	<b>Pauta dosi: tractament crònic</b> perllongat
La resposta al tractament evaluada per: <b>Índex de regressió tumoral</b> (Tumor regression rate)	La resposta al tractament evaluada per: <b>Temps a la progressió</b> (Time to progression)

L'aparició d'aquests nous tractaments inhibidors proteics i el seu ús pel tractament de malalts oncològics és molt recent. El **Trastuzumab (Herceptin®)** (anticòs monoclonal humanitzat que inhibeix el ERB2/HER2.) va ser aprovat a Estats Units per la "Food and Drug Administration"(FDA) l'any 1998 pel tractament de pacients amb càncer de mama amb ampliació del gen HER-2-neu i l'**Imatinib (Gleevec®)** (inhibidor de BCR-ABL, KIT i PDGFR) va ser validat per aquest mateix organisme pel tractament de pacients amb **Leucèmia Mieloide Crònica (LMC)** i amb **GIST** els anys 2001 i 2002 respectivament.<sup>4</sup>

### 3.4.2. RECEPTORS TIROSINA-QUINASA: dianes de la Teràpia biològica

Els receptors amb activitat tirosina-quinasa són unes de les dianes moleculars més atractives per les noves Teràpies biològiques pel seu potencial oncogènic i per haver-se implicat en la patogènia de diferents tumors. Aquest fet permet plantejar la seva inhibició farmacològica amb l'objectiu d'aturar la progressió tumoral i combatre el càncer.

En els últims anys s'han desenvolupat molts fàrmacs inhibidors dels receptors tirosina-quinasa i dels seus lligands com es representa en la taula adjunta.<sup>18</sup>

Table 2   Cancer therapies targeted to receptor tyrosine kinases				
Names	Targets	Status	Description	Company
Trastuzumab, Herceptin	HER2	Approved for metastatic breast cancer	Humanized anti-HER2 IgG1c	Genentech
Imatinib, Glivec, ST1571	BCR-ABL, KIT, PDGFR	Approved for CML and GIST	2-Phenylaminopyrimidine	Novartis
Gefitinib, Iressa, ZD1839	EGFR	Approved for NSCLC	Quinazoline	AstraZeneca
Cetuximab, Erbitux	EGFR	Approved for colorectal cancer	Chimeric anti-EGFR IgG1	ImClone/Merck
Bevacizumab, Avastin	VEGF	Approved for colorectal cancer	Humanized anti-VEGF (hu mAb-VEGF)	Genentech
OSI-774, Tarceva	EGFR	Clinical development	Quinazoline	Genentech/Roche/CGI
CI-1033	EGFR, HER2	Clinical development	4-Anilinoquinazoline, irreversible inhibitor	Pfizer
AG05569	EGFR, HER2	Clinical development	4-Anilinoquinoline-3-carbonitrile, irreversible inhibitor	Wyeth
CGP590	PDGFR	Clinical development	Anti-PDGFR-receptor antibody fragment	Caltech
Perituzumab, Omnitarg, 2C4	HER2	Clinical development	Humanized anti-HER2 (heterodimerization inhibitor)	Genentech
SU6668	VEGFR2, PDGFR, FGFR	Clinical development	Indoline-2-one	Sugen/Pfizer
SU11248	VEGFR2, KIT, PDGFR, FLT3	Clinical development	Indoline-2-one	Sugen/Pfizer
ZD6474	VEGFR2	Clinical development	Quinazoline	AstraZeneca
PTK-787/ZK222584	VEGFR1/2, PDGFR	Clinical development	Anilinothalazine	Novartis/Schering
AG013736	VEGFR2, PDGFR	Clinical development	-	Pfizer
CP549, 632	VEGFR2, FGFR1, TIE2	Clinical development	-	Pfizer
PNC-112, midostaurin	PKC, VEGFR2, PDGFR, FLT3, KIT	Clinical development	N-Benzoylstaurosporine	Novartis
CEP-701	FLT3, TKK kinases	Clinical development	Indolocarbazole alkaloid	Ciplaton
MLN-518, CT520518	PDGFR, KIT, FLT3	Clinical development	Quinazoline	Millenium

CML, chronic myelogenous leukemia; EGFR, epidermal growth factor receptor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; FLT, FMS-related tyrosine kinase; GIST, gastrointestinal stromal tumor; HER, human EGFR-related Ig immunoglobulin; NSCLC, non-small-cell lung carcinoma; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; PKC, protein kinase C; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, VEGF receptor.

Aquests fàrmacs es poden classificar segons el seu mecanisme d'acció en dos grups (Figura 3.4.2):

els inhibidors selectius de l'activitat quinasa (small-molecule tyrosine-kinase inhibitors) i els anticossos monoclonals humanitzats.

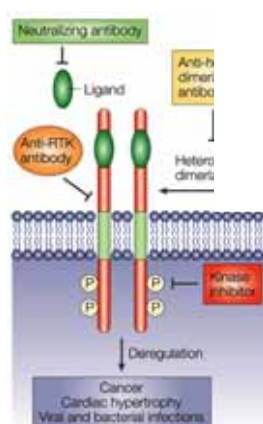
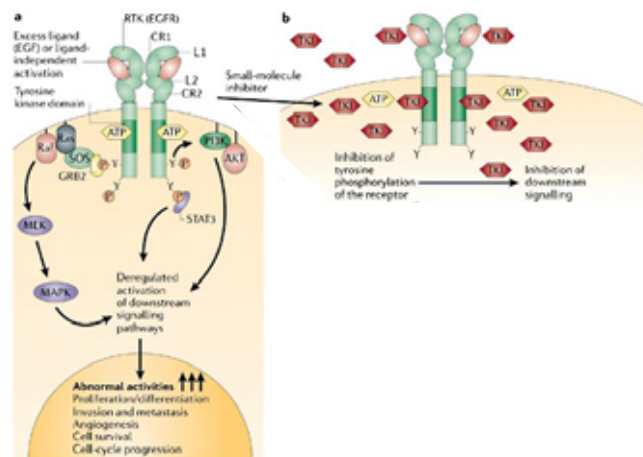


Figura 3.4.2. En aquest esquema es representen de forma esquemàtica les formes de bloquejar farmacològicament un receptor tirosina-quinasa en forma d' Inhibidors del domini i l'activitat quinasa i Anticossos que neutralitzen el receptor o el seu lligand. Nature Reviews.<sup>18</sup>

1. Els anomenats inhibidors selectius de l'activitat quinasa (small-molecule tyrosine-kinase inhibitors) competeixen amb l'ATP per la unió al domini catalític de la proteïna. D'aquesta manera aquests fàrmacs eviten l'accés de l'ATP a la proteïna bloquejant així la seva activitat quinasa tal i com s'il·lustra en la figura adjunta 3.4.3.a.<sup>19</sup>



**Figura 3.4.3.a** Esquema que representa el mecanisme d'acció dels fàrmacs inhibidors del domini quinasa de les proteïnes.<sup>19</sup>

A finals de la dècada dels 80 aquests tipus de fàrmacs inhibidors quinasa van demostrar el seu ús potencial com agents antiproliferatius. Al 1987 Honegger i col·laboradors van descobrir que les mutacions en el domini catalític de l'EGFR (on s'uneix l'ATP) eren les responsables de l'activació constitutiva d'aquest receptor.

A l'any 1994 es va descriure l'activitat de les quinazolines que actuen evitant que l'ATP s'uneixi al domini catalític de les proteïnes quinasa. Dos anys després Wakeling i col·laboradors van dissenyar el **Gefitinib** un potent i selectiu inhibidor de l'activitat tirosina-quinasa de l'EGFR, capaç de competir amb l'ATP i bloquejar la unió del mateix al receptor.

Al 2003 el Gefitinib es va aprovar pel tractament del Carcinoma pulmonar de cèl·lula no petita inoperable o metastàtic.

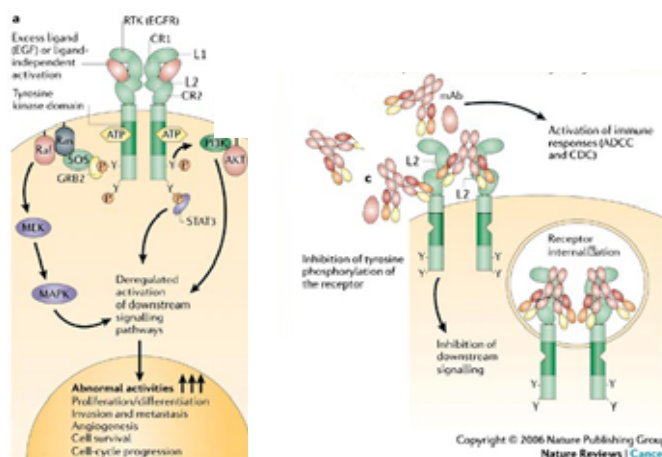
Un altre exemple d'inhibidor de l'activitat quinasa és l'**Imatinib**, descrit el 1996 per Druker i col·laboradors com a fàrmac amb una activitat potent contra la proteïna quimèrica BCR-ABL, constitutivament expressada en la Leucèmia Mieloide Crònica (LMC). Posteriorment també es va demostrar la seva acció inhibidora sobre PDGFR i KIT, aquests últims implicats en la patogènesi del GIST.

L'Imatinib fou aprovat per la FDA pel tractament de la LMC al 2001 i per GIST avançat al 2002.

A diferència dels anticossos monoclonals, aquests agents no activen el sistema immune ni la citotoxicitat contra les cèl·lules tumorals. Tot i així tenen la capacitat de creuar les membranes cel·lulars i interaccionar amb el domini citoplasmàtic catalític de receptors transmembrana així com de proteïnes quinasa citosòliques (mTOR, MAP-kinasa...) <sup>20</sup>

Alguns d'aquests inhibidors actuen selectivament sobre una proteïna per exemple **Erlotinib** que inhibeix l'**EGFR**; mentre que altres actuen sobre moltes proteïnes alhora. Aquests s'anomenen "multi-target tyrosine kinase inhibitors". El **SU11248** (**Sutent**, **Sunitinib**) és un d'ells i actua sobre **VEGFR-2**, **PDGFR-beta**, **FLT3** i **KIT**.

2. Els anticossos monoclonals humanitzats tenen una acció directa i indirecta. L'acció directa consisteix en bloquejar el lligand o el receptor el qual es pot internalitzar i deixar d'exercir la seva acció. L'acció indirecta es troba mediada pel sistema immune (activació del sistema del complement, limfòcits citotòxics i macròfags) i contribueix a la destrucció de la cèl·lula tumoral tal com es representa en la figura annexa 3.4.3.b.<sup>19</sup>



**Figura 3.4.3.b** Esquema que representa el mecanisme d'acció dels Anticossos monoclonals dirigits contra proteïnes transmembrana.<sup>19</sup>

Al 1979 es va sintetitzar el primer anticòs inhibidor proteic contra el receptor de HER2 i es va demostrar la seva activitat antioncogènica en cultius cel·lulars i en models animals. Posteriorment (1991) es va obtenir la forma humanitzada d'aquest anticòs amb finalitat terapèutica: **Trastuzumab** (Herceptin, Genentech, Inc). Aquest fàrmac es va aprovar el 1998 per la FDA (Food and Drug Administration) pel tractament de pacients amb càncer de mama metastàtic amb sobreexpressió de **HER2**.

El Trastuzumab s'uneix al receptor HER2 en la superfície de les cèl·lules tumorals provocant la seva internalització i inhibint-se la progressió del cycle cel·lular.

Un altre exemple d'anticòs monoclonal, en aquest cas que bloqueja el lligand és el **Bevacizumab**. Aquest s'uneix a **VEGF** i evita així la seva unió al seu receptor, el VEGFR.



### 3.4.3. RECEPTORS TIROSINA-QUINASA I TERÀPIA ANTIANGIÒGENESI

En els últims anys s'està consolidant el paper actiu de les cèl·lules de l'estroma (fibroblasts, cèl·lules de la paret vascular, cèl·lules inflamatòries...) en la tumorigènesi.<sup>1</sup>

En aquest aspecte, els vasos participen d'una forma crucial en l'oncogènesi mantenint l'aport de nutrients al tumor i afavorint el seu creixement i progressió.

El bloqueig de l'angiogènesi s'ha plantejat com una aproximació a la teràpia contra el càncer.

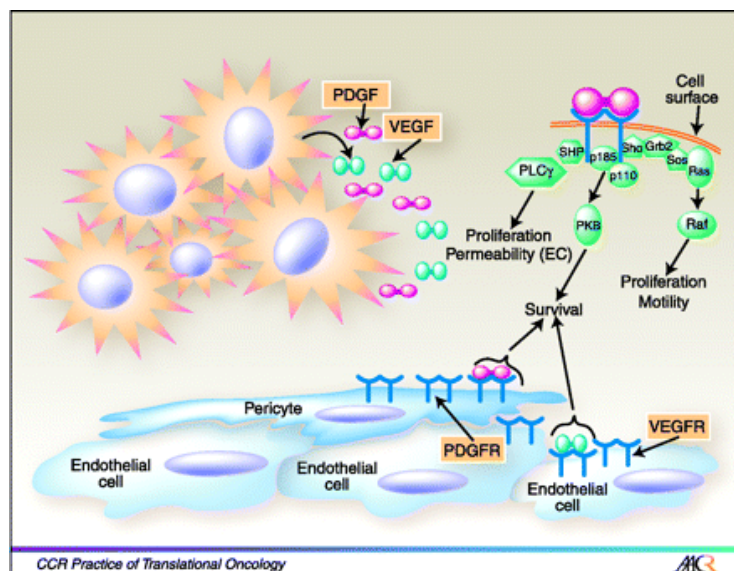
Són nombroses les molècules implicades en l'angiogènesi fisiològica i tumoral. Unes de les més destacades són els factors de creixement vascular endotelial (VEGF-vascular endothelial growth factor) i el derivat de les plaquetes (PDGF-platelet derived growth factor) i els seus respectius receptors tirosina-quinasa VEGFR i PDGFR.

Mentres que el VEGFR promou el creixement de les cèl·lules endotelials, el PDGFR promou la supervivència dels pericits que envolten els vasos i assegura un manteniment i maduració de la vasculatura (Figura 3.4.4.)

Per tant, inhibidors proteics contra VEGFR o PDGFR o els seus lligands poden actuar com a fàrmacs antiangiogènics. De fet, models preclínic han validat l'efecte antitumoral d'aquests agents.

En base a aquests coneixements, VEGF i VEGFR així com PDGF i PDGFR han esdevingut dianes importants per les noves teràpies biològiques. Per exemple el Bevacizumab (Avastin, Genentech) és un anticòs humanitzat contra el VEGF i que s'utilitza pel tractament del càncer colorectal millorant la supervivència global en pacients metastàtics. Aquest fou el primer fàrmac antiangiogènic aprovat per la FDA.

Un altre exemple és el SU 11248, fàrmac inhibidor proteic de PDGFR i VEGFR2 entre altres receptors i que ha estat aprovat per la FDA el gener del 2006 pel tractament del Càncer renal metastàtic.<sup>18</sup>



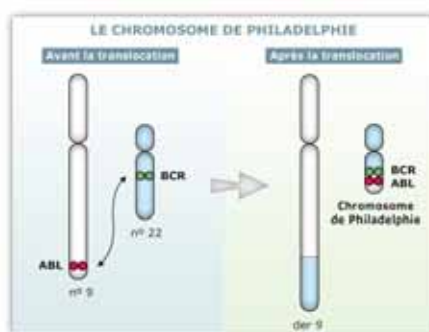
**Figura 3.4.4.** En aquest esquema s'il·lustra com les cèl·lules tumorals secreten factors proangiogènics com el VEGF i el PDGF. Els receptors d'aquests factors de creixement són Receptors tirosina-quinasa. El VEGFR es troba en la membrana de les cèl·lules endotelials i el PDGFR en la dels pericits. La unió d'aquests lligands amb els seus respectius receptors promou l'angiogènesi a través de l'activació de cascades de senyal intracel·lular que comporten el creixement cel·lular, la inhibició de l'apoptosi, l'increment de la motilitat i de la permeabilitat vascular.<sup>21</sup>



### 3.4.4. EXEMPLES D'ABORDATGE TRANSLACIONAL I TRACTAMENT EXITÓS AMB INHIBIDORS TIROSINA-QUINASA: Leucèmia Mieloide Crònica i Tumor de l'Estroma Gastrointestinal

L'ús de l'**Imatinib** en el tractament dels malalts amb Leucèmia Mieloide Crònica (LMC) és un dels **exemples paradigmàtics** de com el coneixement de la patogènesis d'un tipus tumoral s'ha traslladat a la pràctica clínica de forma exitosa.<sup>22</sup>

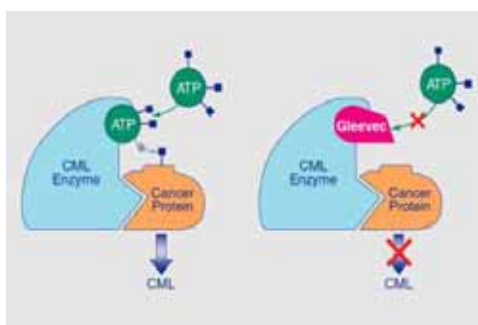
Nombrosos estudis moleculars van permetre identificar l'**oncogen BCR-ABL** com un element crític en la patogènesis de la Leucèmia Mieloide Crònica. Aquesta és una **proteïna quimèrica amb activitat tirosina-quinasa de forma constitutiva** que s'origina per la translocació 9:22 (Cromosoma Filadelfia) (Figura 3.4.5.).



**Figura 3.4.5.** Esquema que il·lustra la translocació 9:22 característica de la Leucèmia Mieloide Crònica. [www.hai-bin.net/CMLinfomation.htm](http://www.hai-bin.net/CMLinfomation.htm)

L'**Imatinib mesylate** (Gleevec®) va ser dissenyat específicament per inhibir l'activitat tirosina-quinasa de BCR-ABL. El mecanisme d'acció d'aquest fàrmac consisteix en ocupar el lloc d'unió de l'ATP a la proteïna inhibint així la seva activitat quinasa. D'aquesta manera s'evita l'accés de l'ATP al substracte i es bloqueja competitivament la fosforilació de molècules efectores "downstream". (Figura 3.4.6.)

L'Imatinib també va demostrar la seva capacitat per inhibir dos proteïnes més amb activitat quinasa, KIT i PDGFR.

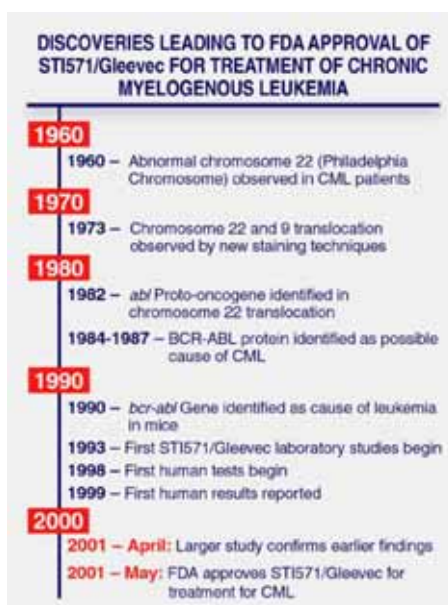


**Figura 3.4.6.** En aquest esquema s'exemplifica el mecanisme d'acció de l'Imatinib (Gleevec®) sobre la proteïna BCR-ABL. En la LMC aquesta proteïna quimèrica (BCR-ABL) es troba constitutivament activa fosforilant altres proteïnes que participen en vies de transducció de senyal intracel·lulars que condueixen a la transformació neoplàstica. L'activitat d'aquesta proteïna oncogènica s'inhibeix per la unió competitiva del fàrmac al lloc d'unió de l'ATP bloquejant la seva activitat tirosina-quinasa. [www.hai-bin.net/CMLinfomation.htm](http://www.hai-bin.net/CMLinfomation.htm)

Posteriorment, Druker i col·laboradors van demostrar que l'Imatinib **inhibia la proliferació "in vitro"** de línies cel·lulars de LMC amb la proteïna BCR-ABL. Aquest estudi preclínic va donar peu a **assajos clínics** amb Imatinib amb pacients amb LMC aconseguint-se respostes excel·lents. Aquest fet va precipitar l'aprovació d'aquesta droga per la FDA l'any 2001.

Actualment l'Imatinib Mesylate és un dels tractaments **de primera línia** en els malalts amb LMC que expressen la proteïna de fusió BCR-ABL amb una efectivitat marcadament superior al tractament estàndard amb Interferó-alfa i Citarabina

El percentatge de pacients que aconsegueixen una **remissió completa hematològica i citològica** en la fase crònica de la LMC amb tractament amb Imatinib és de **>95%** i del **75%** respectivament amb una **supervivència mitja lliure de progressió als 12 mesos de >95%**.<sup>23</sup>  
24

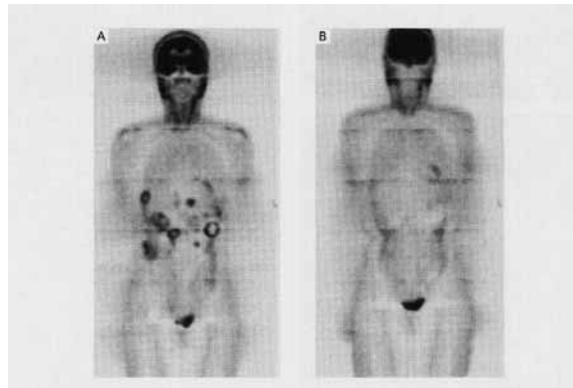


**Figura 3.4.7.** En aquest esquema es detalla de forma resumida i esquemàtica l'evolució en el coneixement de la patogènica de la Leucèmia Mieloide Crònica i de l'implementació de l'Imatinib pel seu tractament.[www.haibin.net/CMLinformation.htm](http://www.haibin.net/CMLinformation.htm)

L'**Imatinib** mesylate és també efectiu **en el tractament dels Tumors de l'Estroma Gastrointestinal (GIST)**. Aquest és un altre exemple paradigmàtic de la implementació exitosa de fàrmacs inhibidors proteïcs en el tractament de malalts oncològics.

Precisament, la **patogènica** del GIST està estretament lligada a mutacions en KIT (>90%) o PDGFRA (3%) que condueixen a una **activació de forma constitutiva** d'aquestes tirosina-quinases.<sup>13,15,25 26 14</sup>

Amb aquesta base patogenètica i davant l'absència d'una teràpia efectiva per aquests tumors en estadis avançats, al març del 2000 es va tractar amb Imatinib un pacient amb GIST metastàtic resistent a quimioteràpia responent de forma espectacular al tractament. El GIST d'aquest pacient tenia mutacions a l'exó 11 del KIT (Figura 3.4.8.).<sup>27</sup>



**Figura 3.4.8.** Aquestes són les imatges de PET (amb Fluorodesoxiglucosa com a traçador) del primer malalt amb GIST metastàtic que es va tractar amb Imatinib de forma exitosa. En la imatge de l'esquerra (A) s'il·lustra el PET previ al tractament en el que es veuen múltiples metastasis hepàtiques i peritoneals que capten contrast. La imatge de la dreta (B) correspon al PET del pacient 4 setmanes després del tractament en el que s'observa la desaparició de les lesions metastàtiques amb absència de senyal de contrast a fetge i abdomen. <sup>27</sup>

Esperonats per la reducció sorprenent de massa tumoral en aquest malalt, es van endegar assajos clínics que demostraren respostes objectives a l'Imatinib en un 53-65% de pacients amb GIST metastàtic i estabilització de la malaltia en el 19-36% d'ells. En assajos clínics en fase 3, es va obtenir una **supervivència lliure de progressió als 12 mesos del 70%** i una **supervivència total del 85%**.<sup>28</sup>

Aquests dos èxits terapèutics, fonamentats en una implementació racional i amb base biològica dels nous fàrmacs inhibidors proteics, han **revolucionat la teràpia oncològica**. En l'actualitat amb aquest enfocament **translacional** s'està fent un gran esforç per conèixer la biologia dels diferents tipus de tumors. Un dels objectius és definir proteïnes oncogèniques per dissenyar fàrmacs inhibidors selectius dirigits contra elles i així d'oferir noves esperances terapèutiques pels malalts amb càncer.

## 3.5.- TUMORS DE CÈL·LULES RENALS

### 3.5.1. GENERALITATS

El nostre treball es centra en els tumors renals. Aquests representen un 3% de tots els tumors de l'economia. A Espanya el nombre de casos nous estimats a l'any és de 4000, amb una incidència de 14 i 6 casos nous per cada 100 000 homes i dones respectivament i una taxa bruta de mortalitat de 8,3 per cada 100 000 habitants<sup>29</sup>

Dins dels tumors renals, el carcinoma de cèl·lules renals es considera el **tumor urològic més letal ja que el 20-50% dels pacients, desenvolupen malaltia metastàtica** ja sigui en el moment del diagnòstic o temps després de la nefrectomia.

En estadis avançats, el **pronòstic és molt poc favorable**, amb un temps de supervivència mig de sols 6-12 mesos i una taxa de supervivència als 2 anys del 10-20%.<sup>30 31</sup>

Fins fa poc el tractament dels malalts amb carcinoma renal disseminat es restringia a la immunoteràpia (ús d'interferó-alfa o interleuquina-2) amb unes taxes de resposta baixes inferiors al 20% i amb un percentatge de respostes complertes d'entre 2-8%.<sup>32</sup>

Actualment, la implementació de les noves teràpies biològiques en el camp dels tumors renals està revolucionant l'abordatge terapèutic d'aquests malalts i està obrint noves i esperançadores perspectives.

Actualment es reconeixen diferents categories dins dels tumors renals tal com s'indica en la última classificació de la OMS que es detalla a continuació. Els tumors de cèl·lules renals són el grup més freqüent i on trobem més del 90% de tots els tumors de ronyó.

## Classificació histològica dels tumors renals (OMS, 2004) <sup>33</sup>

### Tumors de cèl·lules renals

- Carcinoma de cèl·lula clara (convencional)
- Carcinoma de cèl·lules renals quíctic i multilocular
- Carcinoma papil·lar
- Carcinoma cromòfob
- Carcinoma de conductes col·lectores de Bellini
- Carcinoma medul·lar renal
- Carcinoma amb translocació Xp11
- Carcinoma associat a neuroblastoma
- Carcinoma mucinós tubular y de cèl·lules fusiformes
- Carcinoma de cèl·lules renals no-classificable
- Adenoma papil·lar
- Oncocitoma

### Tumors metanèfrics

- Adenoma metanèfric
- Adenofibroma metanèfric
- Tumor estromal metanèfric

### Tumors nefrobàstics

- Restes nefrogènics
- Nefroblastoma (i nefroblastoma quíctic parcialment diferenciat)

### Tumors mesenquimals

- *principalment pediàtrics*
- Sarcoma de cèl·lules clares
- Tumor rabdoide
- Nefroma mesoblàstic congènit
- Tumor renal ossificant de la infància
- *Principalment d'adults*
- Liomiosarcoma
- Angiosarcoma - Rabdomiosarcoma - Histiocitoma fibrós maligne
- Hemangiopericitoma - Osteosarcoma - Liomioma - Hemangioma
- Angiomiolipoma i angiomiolipoma epitelioides - Limfangioma
- Tumor renomedular de cèl·lules intersticials (fibroma medul·lar)
- Tumor fibrós solitari

### Tumors mixtes epitelials i mesenquimals

- Nefroma quíctic
- Tumor mixt epitelial i estromal
- Sarcoma sinovial

### Tumors neuroendocrins

- Carcinoide
- Carcinoma neuroendocri
- Tumor neuroectodèrmic primitiu
- Neuroblastoma
- Feocromocitoma

### Tumors hematopoètics i limfoides

- Limfoma
- Leucèmia
- Plasmocitoma

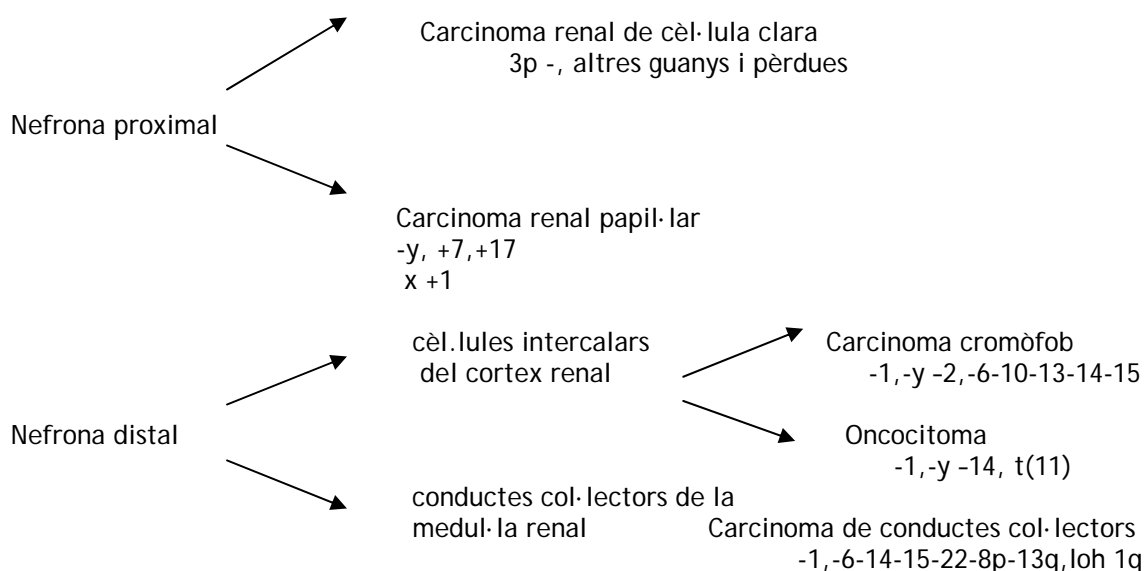
### Tumors de cèl·lules germinals

- Teratoma
- Coriocarcinoma

### Tumors metastàtics a ronyó.

Els estudis de biologia molecular han contribuït a la subclassificació dels Tumors de cèl·lules renals. Actualment es considera que aquesta categoria agrupa a un conjunt de diferents entitats anatomopatològiques (Carcinoma renal de cèl·lula clara, Carcinoma Papil·lar, Carcinoma Cromòfob, Oncocitoma, Carcinoma de conductes col·lectors o de Bellini com a més destacades), cada una amb un perfil genètic, histològic i clínic característic.<sup>34,35 33</sup>

Histogenèticament els tumors de cèl·lules renals s'originen a partir dels túbuls renals: el Carcinoma renal de cèl·lula clara i el papil·lar del túbul proximal, el Carcinoma Cromòfob i Oncocitoma del túbul distal i el Carcinoma de Bellini dels conductes col·lectors. S'han identificat alteracions citogenètiques pròpies de cada subtipus com es representa en l'esquema adjunt.<sup>36</sup>



Cada subtipus tumoral es pot reconèixer també per característiques morfològiques, immunofenotípiques i ultraestructurals específiques.

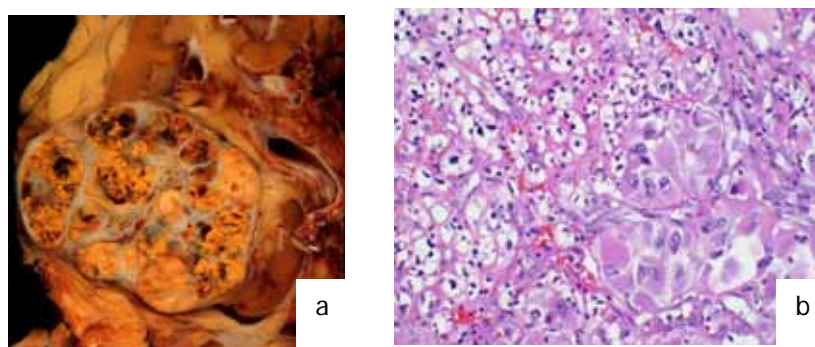
Alhora en alguns tipus de tumors renals s'ha pogut definir la seva patogènia gràcies en part a l'estudi de famílies amb carcinoma renal hereditari com comentarem més endavant.<sup>36,37</sup>

## 3.5.2. SUBTIPUS HISTOLÒGICS I PATOGÈNIA

### 3.5.2.1. CARCINOMA RENAL DE CÈL·LULA CLARA

Dins del grup de Tumors de cèl·lules renals, el Carcinoma renal de cèl·lula clara anomenat també Carcinoma renal convencional és el subtipus més freqüent, representant el 60-65% de tots ells.

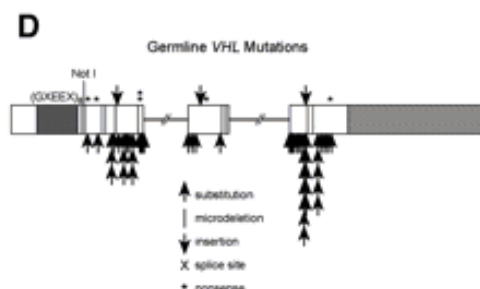
Aquests casos **macroscòpicament** presenten un color groguenc amb freqüents zones de necrosi i hemorràgia. **Histològicament** es caracteritzen per una xarxa vascular prominent i un patró arquitectural variat essent els més freqüents el sòlid, l'alveolar i l'acinar. Les cèl·lules tumorals tenen un citoplasma clar pel seu alt contingut en lípids i glicogen. Tot i així en lesions de més alt grau el citoplasma pot ser "granular" o eosinofílic (Figura 3.5.2.1.a). El 1981 Fuhrman va definir una gradació per aquests tumors en base a característiques nuclears amb valor pronòstic que es segueix utilitzant actualment.



**Figura 3.5.2.1.a.** Imatges macroscòpica (a) i microscòpica (b) d'un Carcinoma renal de cèl·lula clara. La fotografia de la dreta mostra les característiques histològiques típiques d'aquest tumor: el citoplasma clar de les cèl·lules i el patró acinar. S'observen cèl·lules amb citoplasma clar i un grau Fuhrman 1/4 i altres amb citoplasma granular i grau Fuhrman 4/4 i. <sup>34,36</sup>

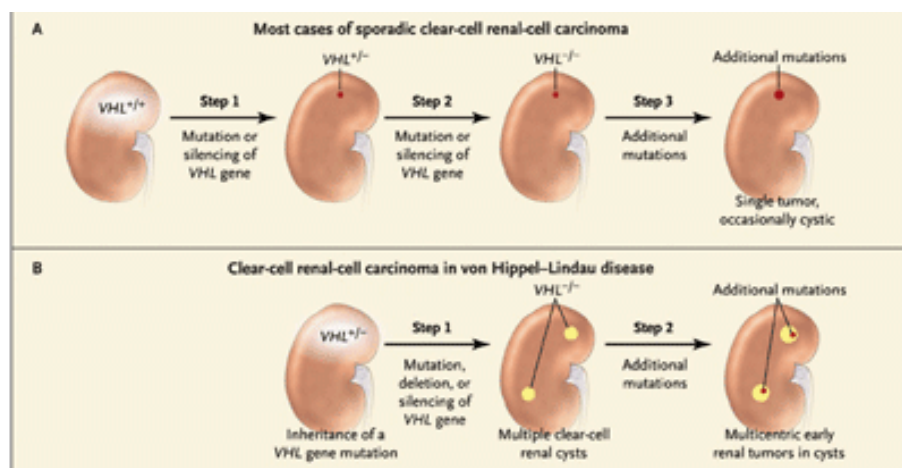
La **patogènia** d'aquest tumor s'ha dilucidat gràcies a l'estudi de malalts amb Carcinoma renal de cèl·lula clara hereditari en el marc de l'anomenat **Síndrome de Von Hippel-Lindau**. L'any 1993 es va identificar el gen responsable d'aquest síndrome localitzat al **locus 3p25-26** i que es va anomenar **gen de Von Hippel Lindau (VHL)**. <sup>36,38,39</sup>

Els pacients amb aquesta Síndrome tenen un alt risc de desenvolupar diferents tumors entre els que es troba el Carcinoma renal de cèl·lula clara, els hemangioblastomes del sistema nerviós central, els angiomes de retina i els feocromocitomes entre altres. Aquests pacients tenen **mutacions de línia germinal (VHL-/+)** en un dels al·lels del gen VHL (figura 3.5.2.1.b) La pèrdua de l'altre al·lel en el decurs de la vida (VHL-/-) condueix a la inactivació de la funció del gen i precipita en els òrgans diana el desenvolupament de tumors.



**Figura 3.5.2.1.b.** Aquest esquema representa el gen de VHL i els diferents punts on s'han descrit mutacions de línia germinal en malalts amb la Síndrome de Von Hippel Lindau. <sup>40</sup>

En el ronyó, la **pèrdua dels dos al·lells i consegüentment de funció del gen VHL** ja sigui per deleccions, mutacions o metilació, és un dels mecanismes inicials i determinants en la patogènia del Carcinoma renal de cèl·lula clara que tant es troba en casos familiars com ja s'ha comentat així com en casos esporàdics (40-70%)<sup>41,42</sup>.



**Figura 3.5.2.1.c.** En aquest esquema es representen els diferents passos que condueixen al desenvolupament del Carcinoma renal de cèl·lula clara en una situació de càncer esporàdic (A) i en una de càncer hereditari associat a la Síndrome de Von-Hippel Lindau (B): En una situació de **càncer esporàdic** (A) calen dos events mutacionals perquè s'esdevingui la pèrdua dels dos al·lells del gen VHL i es desenvolupi el Carcinoma renal de cèl·lula clara. En una situació de **càncer hereditari** (B) en canvi, es necessita solament un event mutacional ja que un dels al·lells està ja mutat en línia germinal.<sup>43</sup>

El gen Von Hippel Lindau és un gen supressor de tumors que s'expressa pràcticament en tots els teixits, i codifica per la proteïna pVHL. Aquesta proteïna participa en la regulació de la resposta cel·lular a la falta d'oxigen i un dels seus papers primordials és el d'**ubiquitinitzar proteïnes per la seva destrucció**.

La proteïna VHL forma un complex proteic amb les proteïnes elongin B, elongin C, Cullin 2 i RBX1 amb capacitat de dirigir la unió covalent d'ubiquitina a proteïnes de forma específica fet que les senyala per a què siguin degradades pel proteasoma. Una de les dianes de la pVHL és el HIF-1-alfa (HIF1a).

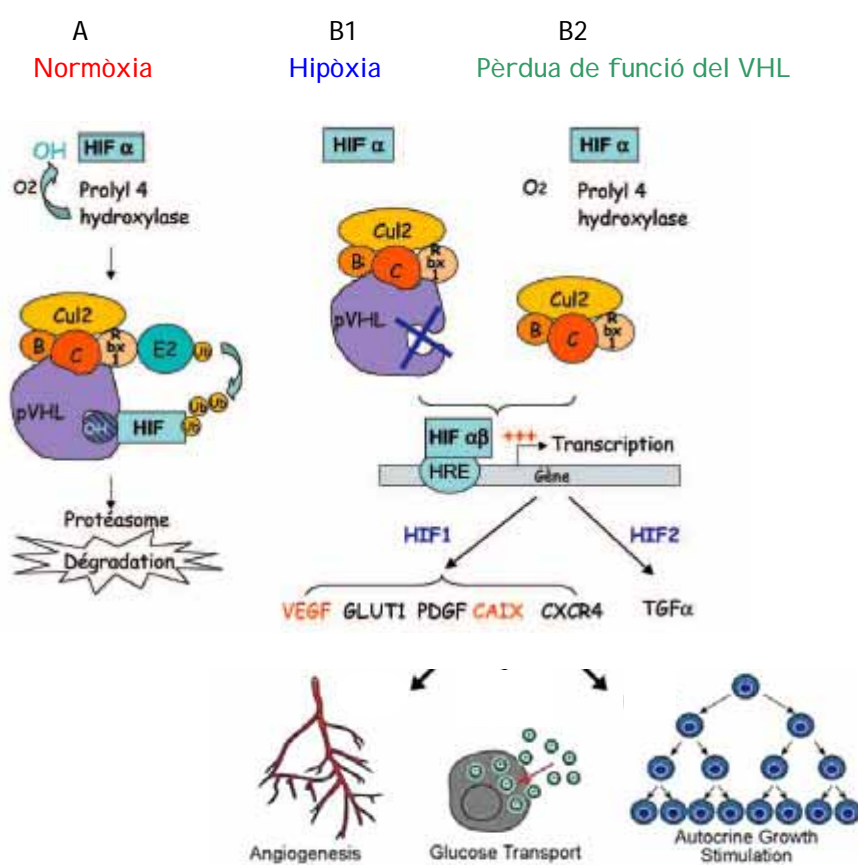
En condicions de **normòxia (A)** el factor de transcripció HIF1a s'hidroxila per l'acció de membres de la família de les Eglu-prolyl-hidroxilases (h.p.). Aquest fet fa que s'esdevingui la unió entre el HIF1a i el complex proteic pVHL. D'aquesta manera, l'HIF1a s'ubiquitina i es degrada pel proteasoma.

En condicions d'**hipòxia (B1)** el HIFa no s'hidroxila i no s'uneix a la pVHL. Això comporta la no degradació i acúmul de HIF1a. Llavors aquest s'uneix al HIFb i funciona com a Factor de transcripció activant l'expressió de diferents gens: el factor de creixement vascular endotelial (vascular endothelial growth factor o VEGF), el factor de creixement derivat de plaquetes (platelet-derived growth factor o PDGF), el factor de creixement transformant alfa (transforming growth factor alpha o TGF- $\alpha$ ) i el gen de l'anhidrasa carbònica IX (Carbonic anhydrase IX o CAIX) entre altres.

L'expressió d'aquests gens permet a la cèl·lula reaccionar davant l'hipòxia.



La pèrdua de funció del gen VHL és un fet patogenètic primordial en el desenvolupament del **carcinoma renal de cèl.lula clara (B2)**. La inactivació del gen VHL comporta la no degradació del HIF1a inclús en condicions de normoxia. El resultat és un acúmulo de HIF que afavoreix la transcripció dels gens VEGF, GLUT1, TGF- $\alpha$  i PDGF. Cadascun dels factors de creixement sobreexpressats participa en l'oncogènesi de forma diferent. El VEGF promou l'angiogènesi i contribueix al fenotip tant vascularitzat dels tumors renals de cèl.lula clara. El PDGF és un altre factor de creixement que participa també en l'angiogènesi a través del reclutament de perícits. El TGF- $\alpha$  actua com a promotor de la proliferació cel.lular mitjançant un loop autocrí sobre les cèl.lules tumorals. El GLUT-1 és una proteïna que intervé en el transport de glucosa cap a l'interior de la cèl.lula<sup>40,44</sup>

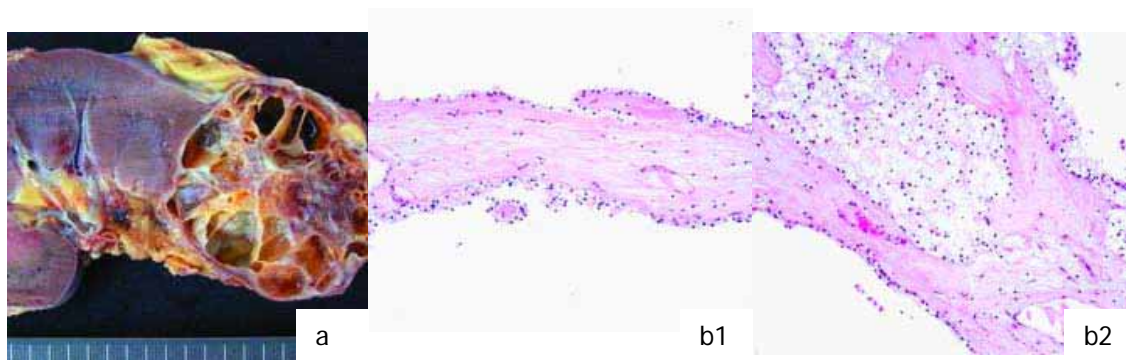


**Figura 3.5.2.1.d.** Aquest esquema il·lustra les funcions de la proteïna VHL en condicions de normoxia (A), d'hipòxia (B1), i les conseqüències de la pèrdua de la seva funció (B2)<sup>40,45</sup>

S'ha documentat que la pèrdua de funció de la proteïna de VHL és crucial en el desenvolupament inicial i manteniment del Carcinoma renal de cèl.lula clara. En línies cel.lulars de carcinoma renal amb pèrdua dels dos al·lels del gen VHL -/- la recuperació del gen és suficient per evitar el desenvolupament de tumors.<sup>46</sup>

### 3.5.2.2. CARCINOMA DE CÈL·LULES RENALS QUÍSTIC I MULTILOCULAR

Aquest és un tumor molt poc freqüent i representa 1-2% de tots els tumors renals. S'ha considerat en la nova classificació com una entitat diferent (tot i que representa una variant del carcinoma renal de cèl·lula clara) pel seu bon pronòstic amb una supervivència mitja als 5 anys post-cirurgia del 100%. **Macroscòpicament** és un tumor quístic, ben circumscrit, envoltat per una càpsula fibrosa. **Histològicament** es troba constituït per quists sense evidència de necrosi revestits per un epitelí pla monoestratificat de cèl·lules clares de baix grau nuclear (Fuhrman 1-2/4) sense àrees de component sòlid tot que poden trobar-se petits níus en els septes interquístics (Figura 3.5.2.2.)



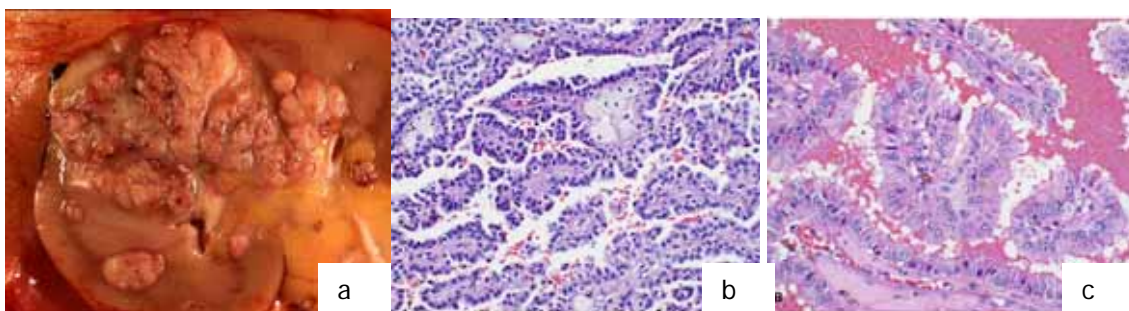
**Figura 3.5.2.2.** Aquestes imatges il·lustren l'aspecte macroscòpic d'aquest tumor (a) així com les seves característiques histològiques (b)<sup>47</sup>

### 3.5.2.3. CARCINOMA RENAL PAPIL·LAR

El Carcinoma renal papil·lar representa el 13-15% dels tumors de cèl·lules renals. **Macroscòpicament** solen ser ben definits, freqüentment friables, amb àrees hemorràgiques i amb necrosis. També és el subtipus que amb més freqüència pot presentar-se de forma bilateral (6-7%) i multifocal (30%). En l'actualitat es consideren benignes (adenomes) les lesions papil·lars menors de 0,5 cm.

**Histològicament** el patró és de tipus tubulo-papil·lar. El citoplasma de les cèl·lules tumorals pot ser basòfil, eosinòfil o clar. Es poden veure sovint macrofags espumosos en l'interstici de l'eix fibrovascular (Figura 3.5.2.3.a.)

Delahunt i Eble han classificat aquests tumors en dos subtipus (1 i 2) en funció de característiques nuclears i patró de creixement amb rellevància pronòstica. El subtipus 2 es considera de pitjor pronòstic.<sup>48</sup>



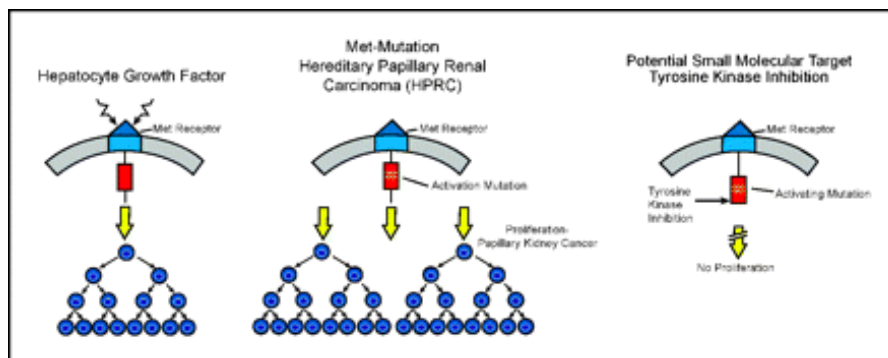
**Figura 3.5.2.3.a.** Imatge macroscòpica d'un Carcinoma renal papil·lar (a). Imatges histològiques que representen el carcinoma renal papil·lar subtipus 1 i 2. En el subtipus 1 (b) les papil·les es troben recobertes per cèl·lules cúbiques amb citoplasma més basòfil i escàs, nuclis situats de forma ordenada, petits, rodons, amb nuclèol poc aparent. En el subtipus 2 (c) les cèl·lules mostren major atípia i el seu citoplasma és més ampli i eosinòfil. Els nuclis es presenten de forma Pseudoestratificada<sup>34</sup> <http://path.upmc.edu/cases/case35/imatges/gross2.jpg>

A nivell ultraestructural no hi ha cap tret específic que permeti distingir aquests tumors.

Des del punt de vista **citogenètic** la majoria de carcinomes papil·lars renals esporàdics es caracteritzen per trisomia en els cromosomes 7 i 17 i pèrdua del cromosoma Y.

Recentment s'ha descrit una forma de **carcinoma renal papil·lar hereditari (HPRC)** en la que les persones que pateixen aquesta síndrome tenen alt risc de desenvolupar carcinoma renal papil·lar bilateral i multifocal tipus 1.

L'any 1997 es va identificar el proto-oncogen **MET** (localitzat al cromosoma 7) responsable d'aquest síndrome. Aquest gen codifica per un receptor de membrana amb activitat tirosina-quinasa el lligand del qual és el Factor de creixement hepatocitari (hepatocyte growth factor HGF). Mutacions amb guany de funció de la proteïna tenen capacitat oncogènica i podrien ser responsables de la transformació neoplàstica (Figura 3.5.2.3.b) Mutacions en el proto-oncogen MET es donen en el 100% dels casos de Carcinoma renal papil·lar hereditari i en un 10% dels casos esporàdics.<sup>37</sup>



**Figura 3.5.2.3.b.** En aquest esquema es representa la proteïna MET (receptor transmembrana amb activitat quinasa) participant en la transducció de senyals de proliferació cel·lular. Els individus amb Carcinoma papil·lar hereditari tenen mutacions en línia germinal del MET que condueixen a una activació constitutiva del receptor i a un increment de la seva funció.<sup>37</sup>

Alhora recentment s'ha descrit una altra síndrome en el que els individus tenen alt risc de desenvolupar liomioma cutanis i uterins i carcinomes renals de tipus papil·lar 2 (**HLRCC**, **hereditary leiomyomatosis renal cell carcinoma**). En aquestes famílies s'han trobat mutacions en el gen de la **Fumarat Hidratasa** que codifica per un enzim del cicle de Krebs. Encara no es coneix amb exactitud els mecanismes patogenètics que condicionen la transformació neoplàstica.

L'**Adenoma papil·lar** es considera un tumor benigne amb arquitectura papil·lar o tubular i baix grau nuclear que es defineix per tenir una mida menor o igual a 0,5 cm. Citogenèticament aquests tumors presenten pèrdua del cromosoma Y i trisomia del cromosoma 7 i 17 com els carcinomes renals papil·lars. S'ha hipotetitzat que l'adenoma papil·lar podria ser el precursor del carcinoma papil·lar, el qual presenta alteracions genètiques addicionals.

### 3.5.2.4. CARCINOMA DE CÈL.RENALS ASSOCIAT A TRANSLOCACIONS Xp11.2

Recentment s'ha descrit un grup de carcinomes de cèl.lules renals que es caracteritzen per **translocacions cromosòmiques** que impliquen el **punt de trencament Xp11.2** i que resulten amb **fusions del gen TFE3** que es troba en aquest locus amb altres gens.

S'han descrit sis translocacions diferents les quals es detallen a continuació:<sup>49</sup>

Gen de fusió	translocació cromosòmica
ASPL-TFE3	t(X ;17)(p11.2 ;q25)
PRCC-TFE3	t(X ;1)(p11.2 ;q21)
PSF-TFE3	t(X ;1)(p11.2 ;p34)
NonO-TFE3	inv(X)(p11 ;q12)
CLTC-TFE3	t(X ;17)(p11.2 ;q23)

Comentar que el sarcoma alveolar de parts toves, i el carcinoma renal amb t (X;17) comparteixen la mateixa proteïna de fusió ASPL-TFE3. Tot i això, la translocació és balancejada en el carcinoma renal t(X;17)(p11.2;q25) i no balancejada en el sarcoma alveolar. der(17)t(X;17)(p11.2;q25)

El TFE3 és un factor de transcripció. Quan s'esdevé una d'aquestes translocacions, el TFE3 passa a ser regulat transcripcionalment per la proteïna amb la que es fusiona. Com a resultat el TFE3 es sobreexpressa a nivell nuclear i actua com un factor de transcripció aberrant. S'hipotetitza que la sobrerregulació del TFE3 es podria relacionar amb la patogènia d'aquesta entitat fins el moment no aclarida.

L'expressió de TFE3 és indetectable immunohistoquímicament en la majoria de cèl.lules neoplàstiques i en diferents tumors. De forma característica es detecta positivitats immunohistoquímica nuclear moderada-intensa per TFE3. en els tumors renals associats amb translocació Xp11.2 així com en el Sarcoma alveolar.

Aquest fet, fa que aquest marcador sigui excel·lent pel diagnòstic d'aquestes entitats.<sup>50</sup>

**Clínicament** aquests tumors es donen en nens i adults joves on aquest tipus tumoral es creu que representa un terç dels tumors pediàtrics.<sup>51</sup>

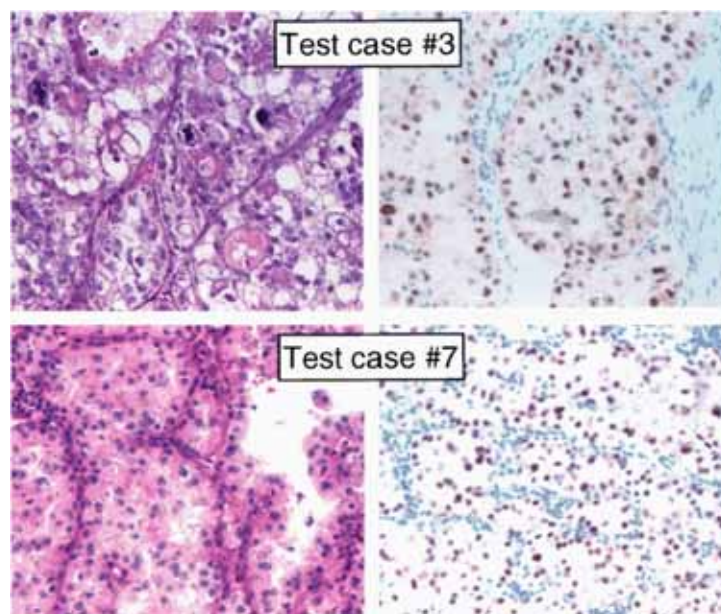
Tot i això recentment també s'han reportat alguns casos en adults, tot i que aquest subtipus tumoral és rar en pacients de més de 30 anys.<sup>52</sup>

**Macroscòpicament** solen ser tumors necròtics i hemorràgics.

**Histològicament** presenten una morfologia variada. Poden tenir un patró papil·lar o de tipus alveolar i les cèl.lules poden tenir un citoplasma clar o granular eosinòfilic.

Generalment els tumors amb translocació t (X;17)(p11.2;q21) ASPL-TFE3 presenten una arquitectura pseudopapil·lar amb abundants cossos de psammoma i nòduls hialins. Les cèl.lules neoplàstiques solen tenir un citoplasma voluminós clar o eosinòfil, una cromatina vesiculosa i un nuclèol prominent. Els tumors amb translocació t(X;1) (p11.2,q21) PRCC-TFE3 tenen una arquitectura més compacta i de tipus alveolar. Els cossos de psammoma i els nòduls hialins no són troballes freqüents. Les cèl.lules neoplàstiques tenen un citoplasma menys abundant, clar o eosinòfil amb nuclis irregulars, cromatina vesiculosa i nuclèol poc evident (Figura 3.5.2.4.).





**Figura 3.5.2.4.** En aquestes imatges s'illustra un cas (3) que demostra les característiques clàssiques d'un tumor renal amb la t(X;17) (ASPL-TFE3) : arquitectura alveolar, citoplasma voluminós i clar o eosinòfil amb alguns nòduls hialins i calcificacions psammomatoses L'altre cas (7) demostra les característiques típiques d'un carcinoma t (X;1): citoplasma clar però menys voluminós i una arquitectura alveolar. En tots dos casos les cèl·lules van mostrar positivitats nuclear difusa e intensa per TFE3 característica d'aquest tipus tumoral.<sup>50</sup>

Com ja hem comentat **Imunohistoquímicament** es caracteritzen per la positivitats nuclear per TFE3. La majoria presenten expressió per CD10 i sols un 50% expressen marcadors epitelials com la citoqueratina i l'EMA generalment de forma focal.

**Ultraestructuralment** els tumors amb fusió ASPL-TFE3 poden presentar grànuls citoplasmàtics o cristalls romboïdals units a la membrana idèntics als que es veuen en el sarcoma alveolar de parts toves. Ocasionalment els carcinomes amb fusió PRCC-TFE3 tenen microtúbuls idèntics als que es veuen en el condrosarcoma mixoide extraesquelètic.

El **pronòstic** d'aquesta entitat és molt heterogeni .

Al 2001 es va descriure una altra variant de Carcinoma de cèl·lules renals associada amb la translocació t(6;11)(p21;q12) que dona lloc a la fusió del gen TFEB i el gen alfa. Aquesta entitat encara no ha estat reconeguda ni incorporada en la última classificació de la OMS.

Aquestes neoplàsies tenen una arquitectura alveolar i una doble població cel·lular amb cèl·lules de mida més gran i altres de més petites. Aquestes últimes es presenten entorn de material tipus membrana basal hialinitzat.

El gen TFEB és també un factor de transcripció de la família de factors de transcripció MITF/TFE a la qual també pertany TFE3.

Els membres d'aquesta família compareixen un domini d'unió al DNA que s'uneix a les mateixes seqüències DNA i activa la transcripció de gens diana similars.

La conseqüència de la fusió alpha-TFEB és una expressió desregulada de la proteïna TFEB.

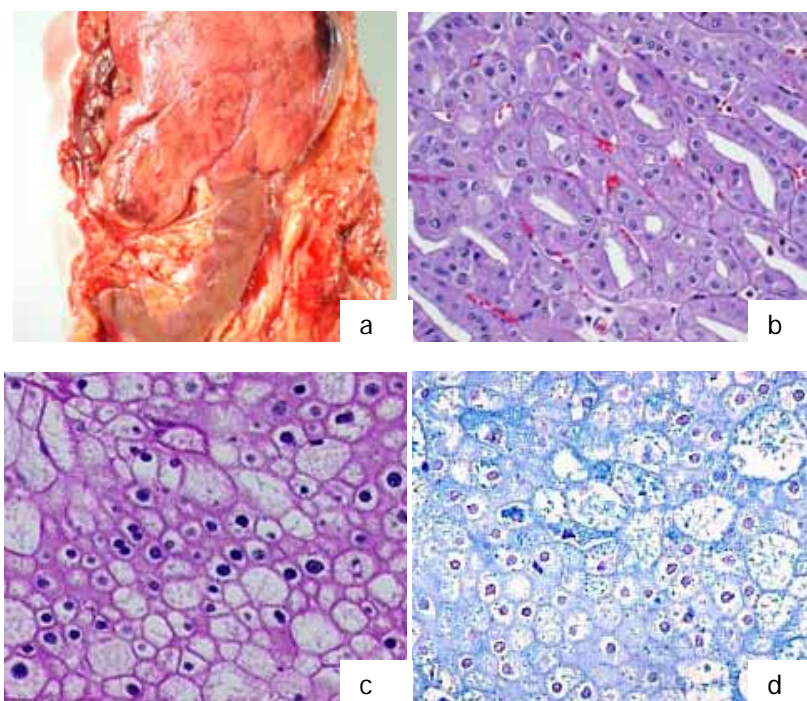
De forma anàloga que els carcinomes renals amb translocacions Xp11.2, aquests carcinomes renals amb translocació t(6;11) ,mostren expressió immunohistoquímica nuclear per la proteïna TFEB.<sup>53</sup>

Pel fet que els Carcinomes renals amb translocació Xp11 i t(6;11) comparteixen característiques morfològiques, immunohistoquímiques i genètiques; recentment s'ha proposat el considerar aquestes neoplàsies dins d'un mateix grup anomenat "Carcinomes renals amb translocacions en la família MITF/TFE".<sup>49</sup>

### 3.5.2.5. CARCINOMA RENAL CROMÒFOB

Aquest subtipus de tumor de cèl·lules renals fou descrit l'any 1985 per Thoenes et al i representa un 6% dels tumors de cèl·lules renals. **Macroscòpicament** són tumors circumscrits, d'aspecte homogeni, amb una coloració marronosa característica. **Morfològicament** tenen una arquitectura sòlida. Les cèl·lules mostren un nucli vesicular, angulat, irregular, amb un característic halo clar perinuclear i ocasionalment binucleacions. El citoplasma pot presentar diferents graus d'eosinofilia i ser més o menys ampli; fet que permet distingir la variant eosinòfila on les cèl·lules que predominen són amb citoplasma escàs i eosinòfil i la variant clàssica on les cèl·lules que predominen tenen un citoplasma ampli i lleugerament granular (Figura 3.5.2.5.) **Ultraestructuralment** les cèl·lules neoplàstiques presenten unes vesícules característiques situades al voltant del nucli que són responsables de l'halo perinuclear observat en hematoxilina-eosina amb microscopia òptica. La naturalesa d'aquestes vesícules no està clara però alguns autors pensen que poden representar mitocondries aberrants o reticle endoplàsmic alterat. El reste d'òrganel·les citoplasmàtiques es situen en la perifèria donant el reforç de membrana eosinòfil. En la variant eosinòfila trobem també abundants mitocondries citoplasmàtiques. Des del punt de vista **citogenètic** aquests tumors es caracteritzen per pèrdues cromosòmiques afectant als cromosomes 1, Y, 6, 10, 13, 17 i 21.

Recentment s'ha descrit la Síndrome **de Birt Hogg Dube (BHD)** en el que els individus afectes tenen un elevat risc de desenvolupar fibrofol·liculomes cutanis, quists pulmonars i tumors renals. Precisament els tumors renals associats a aquesta síndrome són el Carcinoma renal cromòfob 33%, el Carcinoma renal híbrid amb zones de tipus cromòfob i altres de tipus oncocitoma 50%, el Carcinoma renal de cèl·lula clara 5% i l'Oncocitoma 5%. El gen responsable d'aquest síndrome s'anomena de **BHD**, es localitza al braç curt del cromosoma 17 i té característiques d'un gen supressor de tumors. Actualment s'està fent esforços per caracteritzar la funció d'aquest gen i esbrinar perquè les seves mutacions poden desencadenar la transformació neoplàstica.



**Figura 3.5.2.5.** Es representa una imatge macroscòpica d'un Carcinoma renal Cromòfob amb el seu aspecte homogeni i marronós (a). En les següents imatges histològiques es representa un carcinoma renal cromòfob variant eosinòfila on les cèl·lules que predominen tenen un citoplasma més escàs i eosinòfil (b) i un carcinoma renal cromòfob variant clàssica(c) on les cèl·lules tenen un citoplasma ampli, granular i pàl·lid i membranes ben definides, amb un aspecte de cèl·lules vegetals. (HE,X400). En la tercera imatge (d) es representa un cas de Carcinoma cromòfob clàssic amb positivitat citoplasmàtica intensa i difusa per la tinció histoquímica de Ferro col·loidal.

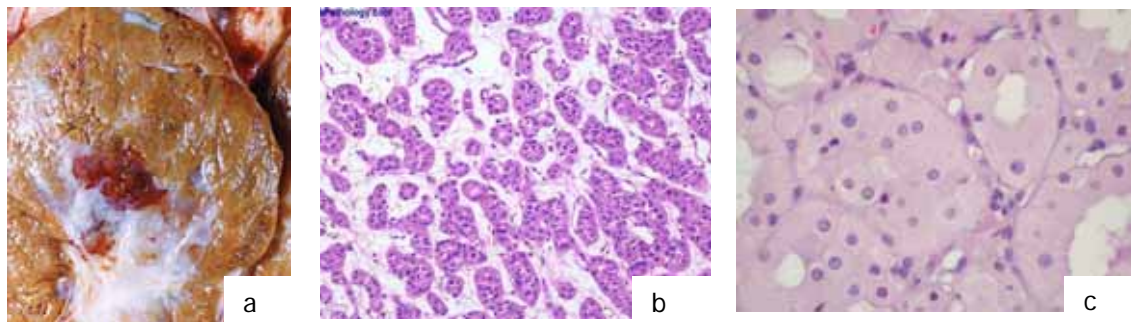
### 3.5.2.6. ONCOCITOMA RENAL

Aquest subtipus representa un 5% dels tumors de cèl·lules renals . Es considera que té un comportament benigne i planteja el diagnòstic diferencial amb altres neoplàsies epitelials amb citoplasma eosinòfil com el carcinoma Cromòfob. **Macroscòpicament** són tumors ben circumscrits, marronosos i en un 33% presenten una cicatriu central característica. El patró **histològic** és cordonal, en petits grups o formant túbuls. El citoplasma és eosinòfil i el nucli rodó i vesicular amb cromatina finament granular i amb un nucleol prominent (Figura 3.5.2.6)

La **microscopia electrònica** revela un citoplasma ple de mitocondries. Que és responsable de la eosinofília i el color macroscòpic marró.

Genèticament els oncocitomes presenten pèrdua dels cromosomes Y i 1 i en pocs casos translocacions implicant al cromosoma 11.

S'hipotetitza que els Carcinomes cromòfobs representen una progressió genètica i morfològica dels Oncocitomes. Tot i això aquesta idea està encara en discussió.



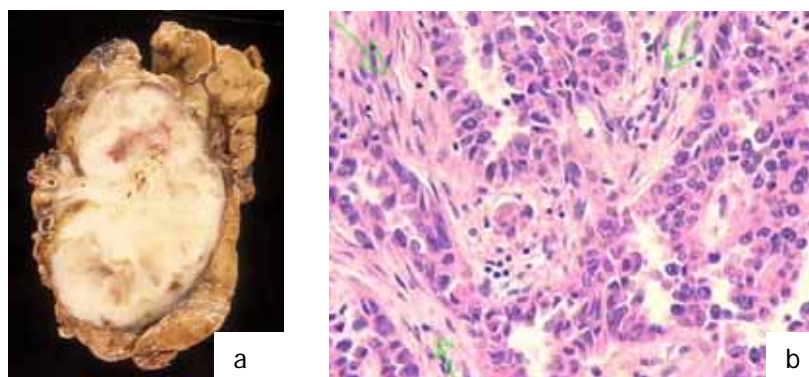
**Figura 3.5.2.6.** Es representa una imatge macroscòpica d'un oncocitoma amb la característica cicatriu central (a) En les imatges microscòpiques s'il·lustren les característiques histològiques de l'Oncocitoma: un patró sòlid o en petits nus separats per un estroma lax (b). Les cèl·lules són monomorfes amb nuclis rodons i cromatina fina amb nuclèol (c). De forma ocasional es pot identificar algun nucli atípic <http://webpathology.com/image.asp?case=64&n=3>



### 3.5.2.7. CARCINOMA DE CONDUCTES COL·LECTORS O DE BELLINI

El Carcinoma de conductes col·lectors o Bellini és un tumor poc freqüent (<1%) i encara no ben caracteritzat. S'hipotetitza que aquest tumor s'origina en els conductes col·lectors com el seu nom indica. **Macroscòpicament** es localitza en la zona central de la medul·la mostrant unes bores irregulars i una coloració blanquinosa. **Histològicament** té un patró de creixement característic tubular o tubulopapil·lar amb un estroma desmoplàstic (Figura 3.5.2.7). Els seus límits són mal definits infiltrant el parènquima renal i els túbuls adjacents a la tumoració presenten displàsia. Per la seva poca freqüència s'han publicat molt pocs estudis que tractin sobre les seves característiques **citogenètiques**.

Aquests tumors tenen un pronòstic molt poc favorable presentant-se freqüentment de forma metastàtica<sup>54</sup>.



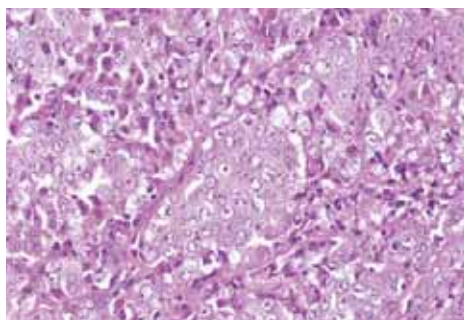
**Figura 3.5.2.7.** En aquestes imatges es representa l'aspecte macroscòpic (a) d'un Carcinoma renal de Bellini (creixent des de la part central de la medul·lar renal i infiltrant el parènquima). La fotografia de la dreta (b) representa les característiques histològiques d'aquest tumor: l'arquitectura tubular amb atípicitat citològica marcada i estroma desmoplàstic acompanyant. [www.kidney pathology.com/Neoplasias.html](http://www.kidney pathology.com/Neoplasias.html)

### 3.5.2.8. CARCINOMA RENAL MEDUL·LAR

El Carcinoma medul·lar és un tumor molt rar que es troba associat amb pacients amb anèmia falciforme.

Són tumors que s'originen com el seu nom indica en la medul·lar del ronyó i són pobrament circumscrits. **Histològicament** tenen un patró reticular, i sòlid. Les cèl·lules són eosinòfiles amb nucli clar i amb nuclèol prominent. Es poden identificar neutròfils dins del tumor i limfòcits en la seva part perifèrica (Figura 3.6.2.8).

Aquests són tumors molt agressius amb una mortalitat gairebé del 100% a l'any del diagnòstic.



**Figura 3.5.2.8.** Com il·lustra aquesta imatge histològica, els carcinomes medul·lars mostren un patró sòlid pobrament diferenciat. Les cèl·lules són eosinòfiles amb un nucli vesiculós amb nuclèol prominent. S'observen algunes cèl·lules inflamatòries limfocitàries en el si de la lesió. [www.kidney pathology.com/Neoplasias.html](http://www.kidney pathology.com/Neoplasias.html)

### 3.5.2.9. CARCINOMA MUCINÓS TUBULAR I DE CÈL·LULES FUSIFORMES

Aquest subtipus de tumor renal ha estat reconegut com a entitat en l'última classificació de la OMS publicada al 2004.<sup>55</sup>

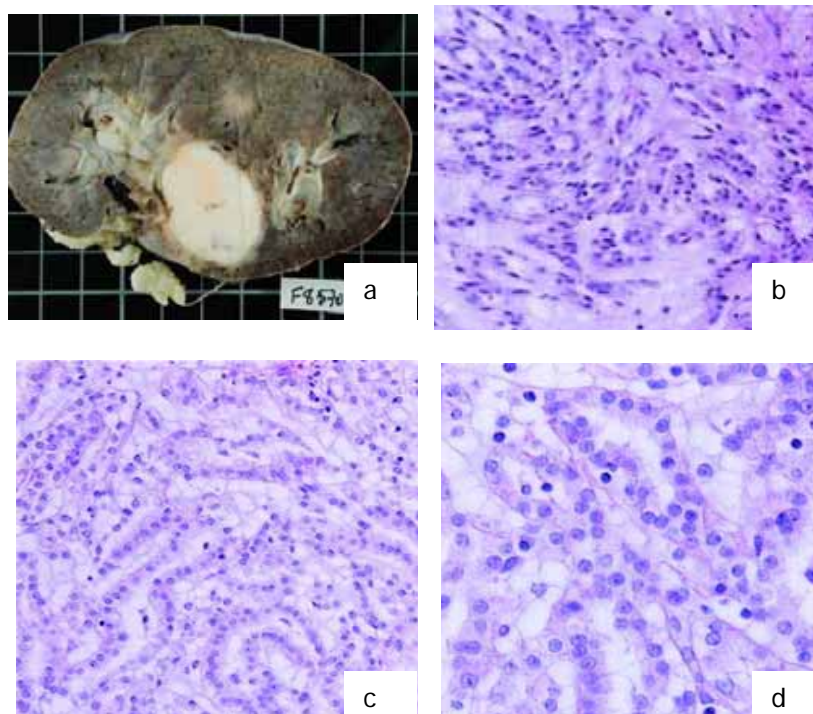
**Macroscòpicament** es troba ben circumscrit i **histològicament** està constituït per cèl·lules cuboidals amb nucli central i rodó sense atípia nuclear que es disposen formant túbuls. També s'evidencien àrees de creixement sòlid on les cèl·lules adopten una aparença fusiforme sense presentar atípia rellevant. Ultraestructuralment aquestes cèl·lules tenen característiques epitelials. S'observa també algun focus amb substància extracel·lular de tipus mucinós. Ocasionalment es poden presentar alguns macròfags espumosos.<sup>56</sup>

Aquesta entitat planteja el diagnòstic diferencial entre el carcinoma papil·lar amb patró sòlid, l'adenoma metanèfric i el carcinoma amb diferenciació sarcomatoide.

No es coneixen encara amb precisió les seves característiques citogenètiques. En alguns casos estudiats en la literatura s'ha reportat pèrdues dels cromosomes 1, 4, 6, 11, 8, 13, 14, 15, 18 i 22.<sup>57</sup>

Les característiques immunofenotípiques d'aquestes neoplàsies EMA(+), AE1/AE3(+), CK7(+), CK19(+), E-cadherin(+), AMACR(+), and CD10(-). afavoreixen un origen en els túbuls distals. Alhora aquest subtipus tumoral comparteix marcadors amb el Carcinoma papil·lar (positivitat en ambdós per Citoqueratina 7 i Racemasa) fet que dificulta en alguns casos el diagnòstic diferencial<sup>58</sup>

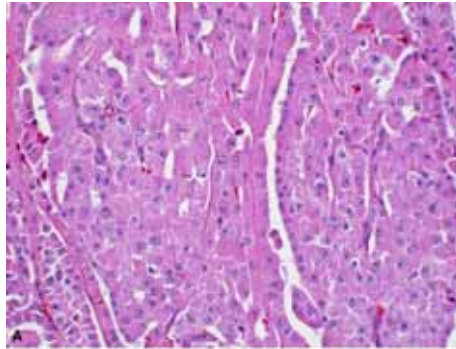
El pronòstic en aquests casos és favorable havent-se descrit sols un cas amb malaltia metastàtica



**Figura 3.5.2.9.** En aquestes imatges s'il·lustra l'aspecte macroscòpic (a) i histològic característic d'aquests tumors amb les àrees d'arquitectura tubular (c i d) i les de patró fusiforme (b). També s'observa l'abundant substància extracel·lular de tipus mucinós (b i c)<sup>59 55</sup>

### 3.5.2.10. CARCINOMA DE CÈL·LULES RENALS NO CLASSIFICABLE

En aquest grup es consideren carcinomes que no es poden classificar en cap de les anteriors categories. Representen 4-5% de tots els tumors renals epitelials i són un grup heterogeni tant morfològicament com immunofenotípicament. En general aquests tumors presenten un alt grau nuclear (un 38,8% un grau Fuhrman 3/4 i un 41,2% un grau Fuhrman 4/4), un estadi elevat (un 50,6% es presenten com a T3 i un 20% com a T4) i un pronòstic desfavorable (la taxa de supervivència als 5 anys és del 33%)<sup>60</sup>

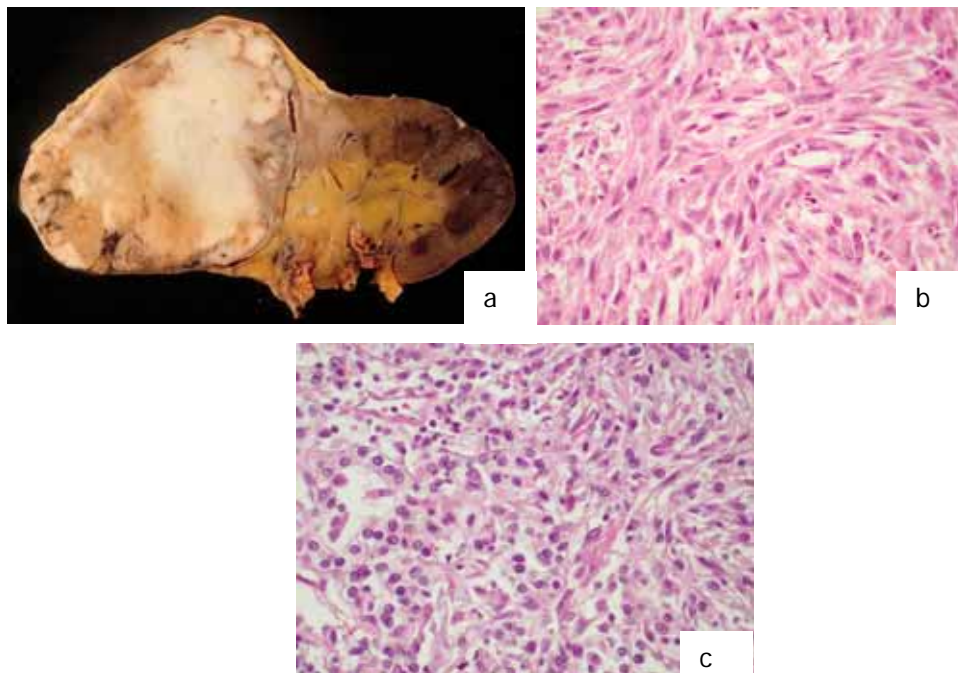


**Figura 3.5.2.10.** En aquesta imatge histològica es presenta un carcinoma renal no classificable amb un patró sòlid i tubular . Les cèl·lules mostren un citoplasma eosinòfil i un nucli rodó central amb nuclèol prominent. Aquest cas planteja el diagnòstic diferencial entre un Carcinoma renal cromòfob i un oncocitoma.<sup>34</sup>

### 3.5.2.11. LA DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE EN ELS CARCINOMES RENALS

El carcinoma renal sarcomatoide va ser descrit per Farrow per primer cop el 1968 i actualment, la classificació de la OMS (2002) **no el considera com una entitat tumoral independent** sino com una transformació d'alt grau que pot ocórrer en qualssevol dels carcinomes de cèl.lules renals i que s'associa a un estadiatge elevat i a un pronòstic molt dolent.

La incidència de la diferenciació sarcomatoide varia segons el tipus de Carcinoma de cèl.lules renals i és del 8% en els Carcinomes renals de cèl.lula clara, del 3% en els carcinomes renals papil.lars, del 9% en el carcinoma renal cromòfob, del 29% en el carcinoma de conductes col.lectors i del 11% en el carcinoma renal no classificable <sup>61</sup>



**Figura 3.5.2.11.** En aquestes imatges es representa l'aspecte macroscòpic (a) i microscòpic (b i c) d'un Carcinoma renal de cèl.lula clara amb diferenciació sarcomatoide. Aquest cas mostra extenses arees sarcomatoides que macroscòpicament tenen un aspecte blanquinós i homogeni i histològicament es caracteritzen per cèl.lules d'hàbit fusiforme amb atípia cel.lular franca i algunes figures de mitosi que es disposen en forma de feixos. En la part perifèrica de la lesió s'observen algunes zones groguenques que varen correspondre histològicament a un carcinoma renal de cèl.lula clara. En la imatge (c) veiem una zona amb transició entre el component epitelial de cèl.lula clara i el sarcomatoide a la part dreta de la imatge.

Per fer el diagnòstic de Carcinoma renal amb diferenciació sarcomatoide és necessari demostrar la naturalesa epitelial del component fusocel.lular ja sigui mitjançant estudi immunohistoquímic o bé de microscòpia electrònica, sobretot en aquells casos on el component epitelial és absent i es troba substituït pel component sarcomatoide.

La diferenciació sarcomatoide es caracteritza histològicament per la presència de cèl.lules fusiformes amb atípia, figures de mitosi i disposició en forma de feixos.

Tot i aquestes característiques genèriques cal tenir en compte que els patrons de la diferenciació sarcomatoide en els carcinomes renals són molt variats, i poden assemblar-se al patró de l'histiocitoma fibrós maligne (43%), al del fibrosarcoma (53%) o a un patró sarcomatós indiferenciat (4%).

Tot i que en l'actualitat es reconeix l'**origen epitelial del component fusocel.lular** d'aquests tumors, la patogènia de la transformació sarcomatoide del Carcinoma renal encara no és coneguda i els pocs treballs fets amb aquest propòsit posen sobre la taula la complexitat i l'heterogeneïtat genètica d'aquests tumors.

L'edat mitja de presentació del Carcinoma renal amb diferenciació sarcomatoide és de 60 anys amb una incidència lleugerament superior en homes que en dones (1,6:1).

Aquesta diferenciació s'associa a una alta agressivitat local (presentant-se en un 86% dels casos en un Estadi III-IV) i també a un alt índex de metàstasis (en el 66% dels casos). La taxa de supervivència específica per aquests tumors als 5 anys varia entre el 14,5% i el 22% amb una **supervivència mitja d'entre 6 i 19 mesos** segons les series.

El mal pronòstic associat a la transformació sarcomatoide dels Carcinomes renals, obliga a reportar aquesta diferenciació en l'informe anatomopatològic tot i que aquesta representi un petit percentatge del tumor.

Altres factors que accentuen el mal pronòstic d'aquests tumors són la presentació en un estadiatge alt, el fet de què la part sarcomatoide representi >50% del tumor, la presència de metàstasis en el moment del diagnòstic, l'existència de necrosi tumoral i l'invasió angiolimfàtica.<sup>62 63</sup>

Actualment el Carcinoma Renal amb diferenciació sarcomatoide representa un **repte** no sols des del punt de vista patogenètic si no sobretot **terapèutic** ja que els règims de quimioteràpia assajats en els últims anys pel tractament d'aquests pacients no demostren una millora significativa en la seva supervivència. En aquest sentit aquest subtipus tumoral és un dels candidats ideals per valorar l'ús dels nous fàrmacs inhibidors proteics amb l'esperança de què poguessin oferir noves opcions terapèutiques per aquests malalts.<sup>64 65,66</sup>



### 3.5.3. FACTORS PRONÒSTICS

Actualment estan descrits i validats tot un seguit de paràmetres anatòmics, histològics i clínics amb valor pronòstic en casos de carcinoma de cèl·lules renals.  
Seminars in Oncology 33: 563-575 2006 BM Shuch et al

**Factors anatòmics** amb valor pronòstic són la mida tumoral, la infiltració neoplàstica del greix perirenal/de la pelvis renal, de la glàndula suprarenal i de la vena renal i cava, (pT), l'afectació neoplàstica ganglionar (pN) i l'existència o no de malaltia metastàtica (pM). Aquests paràmetres són la base del sistema TNM i de l'estadiatge tumoral del carcinoma renal que té es considera el més important indicador pronòstic en aquests casos. A continuació es detalla el sistema **TNM** pel carcinoma de cèl·lules renals.

TNM del Carcinoma renal American Joint Committee on cancer (AJCC) i International Union against Cancer (UICC)	
<b>Tumor primari (T)</b>	
TX:	No es pot valorar el tumor primari.
T0:	No hi ha evidència de tumor primari.
T1:	Tumor de 7 cm o menys, limitat al ronyó
- T1a:	Tumor de 4 cm o menys, limitat al ronyó
- T1b:	Tumor de > 4 cm pero <de 7 cm, limitat al ronyó
T2:	Tumor de més de 7 cm, limitat al ronyó
T3:	Extensió a venes renals majors, glàndula suprarenal, o teixit perirenal sense sobrepassar la fascia de Gerota.
- T3a:	Invasió directa de la glàndula suprarenal o del teixit perirrenal, sense sobrepassar la fascia de Gerota.
- T3b:	Extensió macroscòpica a la vena renal o a la cava sota del diafragma.
- T3c:	Extensió macroscòpica a la vena cava sobre del diafragma o invasió de la seva paret.
T4:	Invasió més enllà de la fascia de Gerota
<b>Ganglis limfàtics regionals (N)*</b>	
NX:	Els ganglis limfàtics regionals no es poden valorar.
N0:	No hi ha metastasi a ganglis limfàtics regionals.
N1:	Metastasi en un únic gangli limfàtic regional
N2:	Metastasi en més d'un gangli limfàtic regional.
<b>Metastasi a distància (M)</b>	
MX:	No es pot valorar la presència de metastasi
M0:	No hi ha metastasi
M1:	Hi ha metastasi

Estadiatge del Carcinoma renal (AJCC i UICC)	
<b>Estadi I</b>	T1 - N0 - M0
<b>Estadi II</b>	T2 - N0 - M0
<b>Estadi III</b>	T1 - N1 - M0 T2 - N1 - M0 T3 (a, b ó c) - N0 - M0 T3 (a, b ó c) - N1 - M0
<b>Estadi IV</b>	T4 - N0 - M0 T4 - N1 - M0 Qualsevol T - N2 - M0 Qualsevol T - Qualsevol N - M1

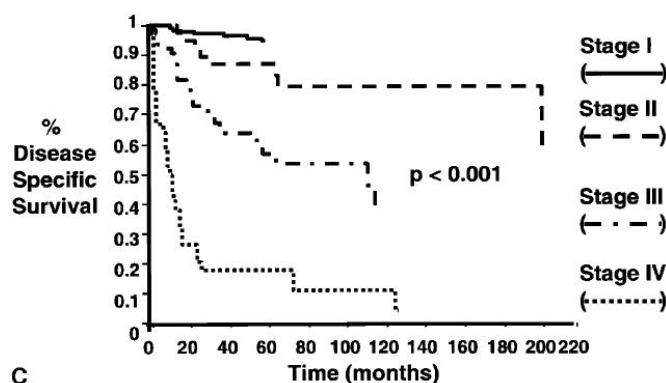
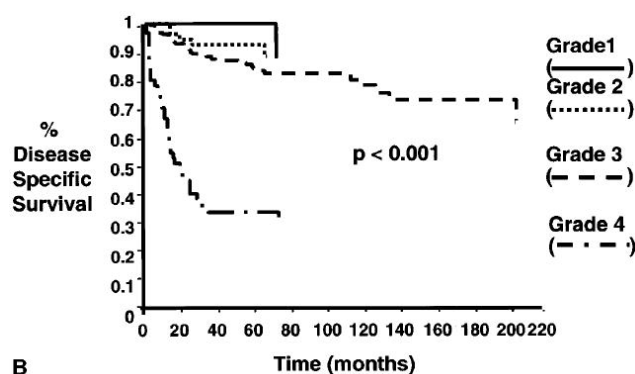


Figura 3.5.3.1. Corba de supervivència basada en l'estadiatge (1997 TNM) (anàlisi kaplan-Meier) que demostra la seva significació com a valor pronòstic<sup>67</sup>

**Factors histològics** amb valor pronòstic són: el grau nuclear de Fuhrman, el subtipus histològic, la presència de diferenciació sarcomatoide, la necrosi tumoral en el Carcinoma renal de cèl·lula clara, l'invasió microvascular, l'infiltració de la via urinària.

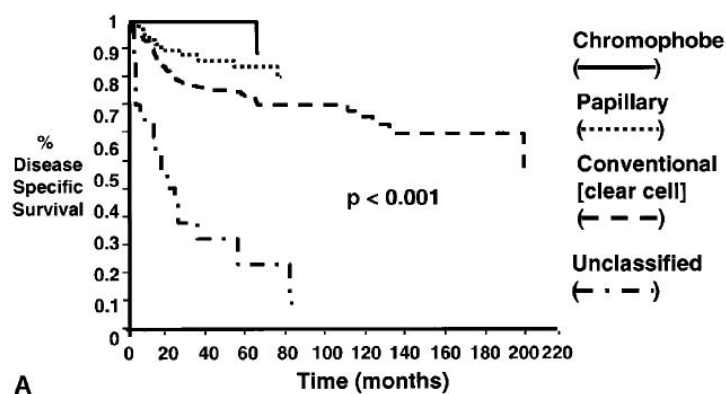
El **grau nuclear de Fuhrman** fou descrit el 1982. Actualment s'utilitza per graduar els Carcinomes renals de cèl·lula clara. El seu ús en altres subtipus tumorals és controvertit. Els criteris per determinar aquest paràmetre es detallen en la taula següent.

Grau nuclear de Fuhrman	
<b>Grau 1.</b> Nuclis rodons, uniformes (aprox. 10 micres). Nuclèols no visibles o poc evidents a 400X	
<b>Grau 2.</b> Nuclis més grans (aprox. 15 micres) de bores irregulars. Nuclèols visibles a 400X	
<b>Grau 3.</b> Nuclis més grans (aprox. 20 micres) de bores més irregulars. Nuclèols visibles a 100X	
<b>Grau 4.</b> Característiques del grau 3 amb nuclis més pleomòrfics o multilobulats	



**Figura 3.5.3.2.** Corba de supervivència basada en el grau Fuhrman (anàlisi kaplan-Meier) que demostra la seva significació com a valor pronòstic <sup>67</sup>

S'han descrit diferències pel que fa al pronòstic segons el **subtipus histològic** de Carcinoma renal. Per exemple la taxa de supervivència als 5 anys és distinta : pel Carcinoma de cèl·lula clara oscil·la entre 76% - 63,8%, pel Carcinoma papil·lar varia entre 87,4% - 69,8%, pel Carcinoma cromòfob es situa entre 100% i el 83,9% i el Carcinoma renal no classificable és del 24% <sup>67 68</sup>



**Figura 3.5.3.3.** Corba de supervivència basada en el subtipus histològic (anàlisi kaplan-Meier) que demostra la seva significació com a valor pronòstic <sup>67</sup>

Tot i que s'han trobat diferències significatives pel que fa a supervivència entre aquests quatre subtipus histològics en l'anàlisi univariant, aquest grau de significació es perd en l'anàlisi multivariant.<sup>67,69</sup>

El Carcinoma cromòfob es considera de millor pronòstic que el carcinoma renal de cèl.lula clara amb una supervivència lliure de malaltia als 5 anys que en la majoria de les sèries és de més del 90%.<sup>67,68</sup>

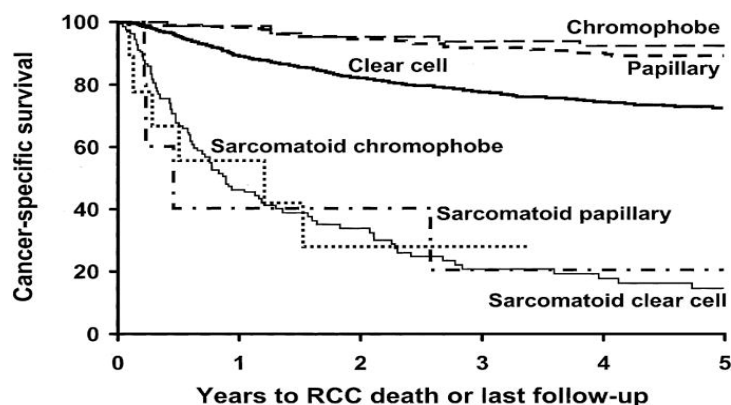
Per altra banda altres estudis han demostrat que aquest subtipus tumoral quan esdevé metastàtic progressa de forma més indolent que altres variants.<sup>70</sup>

Pel que fa a altres subtipus tumorals. El carcinoma de conductes col·lectors o de bellini es considera un subtipus agressiu. Un terç dels pacients presenta metàstasi al moment del diagnòstic i dos terços dels malalts moren en el decurs dels 2 anys després del diagnòstic.

El carcinoma medul·lar també té un pronòstic molt dolent amb una vida mitja de 15 setmanes després de la cirurgia

El carcinoma mucinos tubular amb cèl·lules fusiformes es considera un carcinoma de baix grau i amb un pronòstic favorable.

La **necrosis tumoral** es considera un predictor de mal pronòstic en pacients amb Carcinoma renal de cèl.lula clara. La presència d'**invasió microvascular** així com àrees amb **diferenciació sarcomatoide** també són paràmetres associats a pronòstic desfavorable en els diferents tipus tumorals.



**Figura 3.5.3.4.** Corva de supervivència que representa els diferents tipus tumorals amb o sense focus amb diferenciació sarcomatoide i que il·lustra com aquest tret histològic condiciona un pitjor pronòstic.<sup>61</sup>



**Factors clínics** amb valor pronòstic i associats a una supervivència menor en anàlisi multivariant són: un baix “performance status ECOG-PS” (veure apartat 2), trombocitosis, valors sèrics LDH alts (amb un valor 1,5 vegades major que el normal), hipercalcèmia majors que 10 mg/dl, Hemoglobina en un valor inferior al normal.<sup>71</sup>

En l'actualitat es segueix treballant per descobrir i incorporar nous paràmetres pronòstics més acurats amb l'objectiu de millorar el seguiment i la selecció dels pacients amb càncer renal mereixedors de teràpia adjuvant.

En aquest sentit diferents grups han elaborat **models que integren diferents paràmetres** amb l'objectiu d'estratificar els pacients en diferents categories pronostiques i de risc de progressió. Aquests es detallen a continuació.

MODEL	MSKCC	CLEVELAND CLINIC	MAYO CLINIC (SSIGN)	UCLA (UISS)
Extensió de la malaltia	Metastàtica	Metastàtica	Localitzada o metastàtica	Localitzada o metastàtica
Histologia del tumor	Tots	Tots	Cèl·lula clara	Tots
Paràmetres considerats pel model	Karnofsky PS Hemoglobina Calci sèric corregit	Temps des del diagnòstic Lactat deshidrogenasa sèric Calci sèric corregit Hemoglobina Radioteràpia prèvia Nombre de localitzacions de les metàstasi	TNM estadi Mida tumoral Grau nuclear Necrosi tumoral	TNM estadi Grau Fuhrman ECOG-PS

**Figura 3.5.3.5.** Models de pronòstic integrats per Carcinoma renal localitzat i metastàtic. Abreviatures: MSKCC, memorial Sloan-Kettering Cancer Center; SSIGN, stage, size, grade and necrosis; UCLA, University of California Los Angeles; UISS, UCLA Integrated Staging System.<sup>72</sup>

Ahora els avenços en biologia molecular han permès identificar alteracions genètiques i proteïnes implicades en la patogènesi dels tumors de cèl·lules renals que s'estàn avaluant com a possibles factors pronòstics. D'aquesta manera s'obra una finestra a considerar els **marcadors tumorals** com una eina predictiva de gran potencial equiparable o complementable amb els paràmetres pronòstics utilitzats en l'actualitat.<sup>72-74</sup>

Alguns exemples de marcadors tumorals amb valor pronòstic recentment descrits són: L'expressió immunohistoquímica de **ki-67**, **p53**, **vimentina** i **gelsolina** (el seu increment es correlaciona amb una pitjor supervivència) i de **CA IX**, **PTEN**, **CA XII** i **EpCAM** (el seu increment s'associa amb una millor supervivència)<sup>75</sup>

L'expressió immunohistoquímica de l'**anhidrasa carbònica IX** enzim que regula el pH intra i extracel·lular durant l'hipoxia i es sobreexpressa en Carcinoma renal de cèl·lula clara a conseqüència de la pèrdua de funció de la pVHL i l'acumul del factor de transcripció HIF-1-a. S'ha objectivat que nivells baixos d'expressió d'aquest marcador s'associen de forma independent amb una supervivència pobra en carcinoma renal metastàtic.

### 3.6.- ABORDATGE TRANSLOCACIONAL DEL CARCINOMA RENAL DE CÈL·LULA CLARA: coneixement de la seva biologia i implementació de noves teràpies biològiques.

La integració d'estudis morfològics, ultraestructurals, citogenètics i clínics ha permès caracteritzar els diferents subtipus de Tumors de cèl·lules renals. Alhora, avenços en tècniques de biologia molecular i l'estudi de famílies amb càncer renal hereditari (Síndromes "de Von Hippel-Lindau", "de Carcinoma papil·lar hereditari", "de Birt-Hogg-Dubé" i de "Leiomiomatosis i càncer renal hereditari") han permès reconèixer gens i proteïnes implicades en la patogènesi d'algunes entitats tumorals com ja hem comentat. Aquests descobriments han estat molt importants no sols per entendre el perquè de la transformació neoplàstica sinó per identificar molècules diana amb potencial de ser inhibides per teràpies biològiques en desenvolupament (Figura 6.1.1).<sup>37 76</sup>

En concret, el Carcinoma renal de cèl·lula clara és un dels subtipus de càncer renal més freqüents i millor caracteritzat des del punt de vista patològic. La pèrdua de funció del gen VHL fa que HIF-1-alfa s'acumuli i desencadeni la transcripció de diferents proteïnes VEGF, PDGF, TGF-alfa, Anhidrasa carbònica IX, Glut-1, EPO entre altres. Aquestes proteïnes promouen el creixement cel·lular i l'angiogènesi i contribueixen al desenvolupament tumoral.

En aquest sentit s'ha proposat ús de fàrmacs inhibidors selectius d'aquestes proteïnes oncogèniques pel tractament dels pacients amb Carcinoma renal metastàtic. Aquestes noves teràpies estan essent avaluades en assajos preclínics i clínics tal i com es detalla a continuació.

40 77 78 79 80 81 82

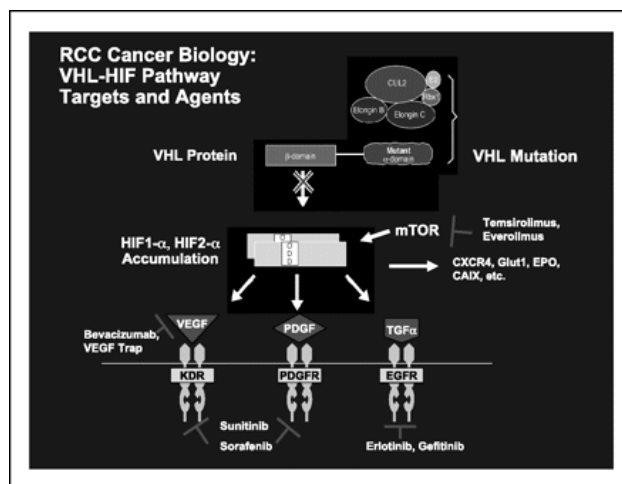


Figura 6.1.1. En aquest dibuix es representa la biologia del Carcinoma Renal de cèl·lula clara i algunes de les dianes terapèutiques proposades amb el seu corresponent fàrmac inhibidor proteic.<sup>83</sup>

### GELDENAMICINA (17-AAG)

La HSP90 (heat shock protein 90) és una ATPasa que té un paper molt important en el plegament de diferents proteïnes entre les quals es troba el HIF-1-alfa.

La Geldenamicina bloqueja l'activitat de la HSP90 i "down-regula" així els nivells de HIF1a.

Donat que el HIF-1-alfa participa en l'oncogènesi del carcinoma renal de cèl.lula clara es va pensar que la seva down-regulació farmacològica podria ser una estratègia per combatre aquest tumor.

Tot i aquest plantejament teòric, un estudi recentment publicat en **fase II** no va observar resposta en cap de 25 pacients amb càncer renal metastàtic tractats amb 17-AAG.<sup>84</sup>

### TEMSIROLIMUS (CCI-779)

Aquest fàrmac és un anàleg de la Rapamicina i **inhibeix l'activitat quinasa mTOR**. La via de transducció de senyal PI3-K / Akt / mTOR / p70S6K / S6 s'ha proposat com una possible diana terapèutica en el Carcinoma renal de cèl.lula clara metastàtic ja que és una de les vies que s'activa per la unió de factors de creixement al seu receptor. Alhora els inhibidors de mTOR poden down-regular el HIF i també així contribuir al bloqueig de la patogènesi del Carcinoma renal de cèl.lula clara.

En un assaig clínic en **fase II** en 110 pacients amb Carcinoma renal refractari un 7% dels malalts van presentar resposta objectiva i un 26% respostes menors. El temps mig de progressió fou de 9,1 mesos

### WX-G250

El WX-G-250 és un **anticòs inhibidor de l'anhidrasa carbònica**. L'expressió d'Anhidrasa Carbònica s'ha reportat en un 94% de casos de Carcinoma renal de cèl.lula clara però no en teixit renal normal. Aquest enzim participa en l'Oncogènesi d'aquest subtipus tumoral i té com a funcions la regulació del pH intra i extracel·lular durant períodes d'hipoxia. L'Anhidrasa Carbònica es sobreexpressa a conseqüència de la pèrdua de funció del VHL i l'acumul de HIF que actua com a factor de transcripció d'aquest enzim.

En un estudi en **fase II** amb 36 pacients amb Càncer renal metastàtic, **11 pacients van tenir estabilització de la seva malaltia, un resposta complerta i un altre resposta parcial**. Aquests resultats van portar a un estudi multicèntric fase III que encara està en marxa.<sup>81</sup>

### BEVACIZUMAB (AVASTIN)

És un **anticòs monoclonal humanitzat** que bloqueja el **VEGF** evitant la unió al seu receptor VEGFR i així inhibint l'angiogènesis.

El VEGF es troba sobreexpressat en el carcinoma renal de cèl.lula clara a conseqüència de la pèrdua de funció del gen VHL i l'activació de l'HIF-1-alfa. S'ha establert que el VEGF té un paper fonamental en promoure l'angiogènesis en aquest subtipus tumoral.

En un estudi de **fase II** fet en pacients amb carcinoma renal avançat resistent a tractament convencional amb immunoteràpia es van establir dos grups randomitzats a doble cec un tractat amb altes dosis de bevacizumab i l'altre amb placebo. Un 10% dels pacients tractats amb l'inhibidor proteic van tenir una resposta parcial. La probabilitat de no tenir progressió als 8 mesos fou del 30% pel grup d'altres dosis, i 5% pel grup placebo. En definitiva, es va perllongar significativament el temps a la progressió en els pacients tractats amb altes dosis de Bevacizumab comparat amb placebo (4.8 vs 2,5 mesos p<0.001)

Tot i això **no es van trobar diferències pel que fa a la supervivència total** entre els dos grups<sup>85 86</sup>

### ABX-EGF

ABX-EGF és un **anticòs** humanitzat monoclonal inhibidor de l'EGFR. Aquest bloqueja la unió de l'EGF i el TGF- $\alpha$  a l'EGFR i indueix una ràpida internalització del receptor eliminant les respostes cel·lulars dependents de l'EGFR relacionades amb angiogènesi i proliferació cel·lular. Aquest fàrmac ha obtingut poques respostes en assajos clínics.

En un assaig clínic fet sobre 88 pacients amb carcinoma renal metastàtic sense resposta prèvia a la immunoteràpia es va assolir una resposta relativa en el 6,6% dels pacients.

### CETUXIMAB (ERBITUX C-225)

És un altre **anticòs** monoclonal que s'uneix a l'EGFR amb una afinitat major que l'EGF o el TGF- $\alpha$  bloquejant la fosforilació de l'EGFR.

55 pacients amb càncer renal metastàtic foren tractats en un estudi multicèntric en fase II. Cap dels pacients tractats va tenir una resposta objectiva i el temps mig de resposta al tractament fou de 57 dies.

### GEFITINIB (IRESSA) I ERLOTINIB (TARACEVA)

Aquests dos fàrmacs són inhibidors de l'activitat tirosina quinasa de EGFR (ERBB1) i en els assajos clínics realitzats en pacients amb carcinoma renal han tingut resultats decebedors sense aconseguir-se resposta al tractament.

<sup>87 85</sup>

### SORAFENIB (BAY43-9006)

És també un **inhibidor multiquinasa** que actua sobre les proteïnes **VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-beta, Raf kinase, FLT3 i c-KIT**. Les dianes de BAY43-9006 també són importants en el creixement i la supervivència del Carcinoma renal

Estudis en models animals han demostrat un ampli espectre d'activitat antitumoral i efectes antiangiogènics amb aquest fàrmac <sup>88</sup>

Un estudi **en fase II** randomitzat i discontinu amb BAY43-9006 va analitzar 106 pacients amb càncer renal metastàtic. 89 de 106 pacients van tenir resposta després de 12 setmanes d'una fase d'inducció. 37 van tenir més del 25% de disminució tumoral i 13 van tenir una disminució de fins al 50%. 38 pacients van presentar estabilització de la malaltia.

Més recentment un assaig clínic **en fase III** randomitzat de BAY-43-9006 vs placebo en pacients amb càncer renal sense resposta a la teràpia sistèmica biològica (INF- $\alpha$  o interleuquina-2) ha demostrat que el Sorafenib **perllonga la supervivència lliure de malaltia 5,5 mesos comparat amb placebo 2,8 mesos**. ( $p < 0.00001$ )

La disminució tumoral es va observar en tots els pacients tractats amb Sorafenib. El tractament fou ben tolerat. L'estudi segueix en marxa per valorar la supervivència.

El Sorafenib es va aprovar el **Desembre del 2005 per la FDA** pel tractament del Carcinoma renal metastàtic. <sup>81 89 90,91</sup>

### SUNITINIB (SUTENT, SU11248)

Aquest és un **inhibidor multiquinasa selectiu** que bloqueja **VEGFR-2, PDGFR-beta, FLT3 i KIT**. Les dianes de SU11248 són importants en el creixement i la supervivència del Carcinoma renal

En un **estudi en fase II** amb 63 pacients amb Carcinoma renal metastàtic amb no resposta inicial a tractament amb citoquines tractats amb SU11248, el **ratio de benefici clínic va ser de gairebé el 70% dels pacients** (resposta objectiva+ malaltia estable)

Un 40% dels pacients tractats van tenir respostes parcials sense resposta completa. 17 pacients més (27%) van tenir estabilització de la seva malaltia que es va perllongar més de 3 mesos Un nombre significant de pacients va tenir una mínima resposta sense complir els criteris RECIST. Dels 25pacients que van respondre 14 van mantenir una resposta durant 4-12 mesos. El temps mig de progressió fou de 8,7mesos i la mitjana de supervivència de 16,4 mesos.<sup>92 93</sup>

En un assaig clínic en **fase III** internacional multicèntric que va reclutar 750 pacients, el Sunitinib comparat amb interferó alfa va aconseguir una **supervivència mitja lliure de progressió superior** i significativa (11 mesos) respecte l'interferó alfa (5 mesos) (P<0,001). El Sunitinib també es va associar amb una **major resposta objectiva** respecte l'interferó alfa 31% vs 6% (p<0,001) i a una millor qualitat de vida dels pacients. (P<0,001).<sup>92 93</sup>

Davant els resultats obtinguts en aquests assajos clínics, el **Gener del l'any 2006** la FDA i al **Gener del 2007** l'Agencia Europea del Medicament (EMA) van aprovar el Sunitinib pel tractament del Càncer renal metastàtic i<sup>94 95</sup>

### AGO12736.

Aquesta és una petita molècula d'ús oral que té efectes inhibidors potents contra **VEGFR-2, VEGFR-3 i PDGFR-beta** importants en el creixement i la supervivència del Carcinoma renal

Recentment un assaig clínic amb **fase II** es va dur a terme en 52 pacients amb Càncer Renal avançat sense resposta prèvia a la teràpia amb citoquines. La resposta valorada per criteris RECIST fou de 24 respostes parcials (46%) dels pacients.

El temps mig a la progressió encara no s'ha establert després de 12-18 mesos de seguiment.<sup>96</sup>

### PTK787/ZK222584 (PTK 787)

Aquest és un altre inhibidor tirosina-quinasa oral contra **VEGFR1, VEGFR2 i PDGFRbeta** en desenvolupament.

En un assaig clínic en **fase I-II** que incloïa un total de 42 pacients amb càncer renal metastàtic va aconseguir respostes parcials en 5% dels pacients, una estabilització de la malaltia en 15-60% dels malalts. El temps mig a la progressió fou de 5,3 mesos. La supervivència mitja estimada fou de 21,5 mesos i la supervivència a l'any del 67%.

### IMATINIB (STI-571)

Aquest inhibidor tirosina quinasa actua sobre les proteïnes **BCR-ABL, KIT i PDGFR**. Donat que el lligand del PDGFR, PDGF està implicat en la patogènesis del carcinoma renal de cèl.lula, la inhibició del receptor s'ha proposat com un possible tractament.

En un estudi en **fase II** combinant Imatinib amb Interferó-alfa no es van obtenir respostes en els pacients tractats amb un temps mig de progressió de 3 mesos.<sup>97</sup>

ALTRES)
---------

Existeixen altres inhibidors tirosina-quinasa que s'estan assajant en aquests moments en malalts amb Carcinoma renal metastàtic i dels quals no es tenen encara resultats.

Anomenar el LAPATINIB (GW572016) que és un inhibidor oral tirosina-quinasa potent contra **ErbB-1 i ErbB-2**. PAZOPANIB (GW786043) un altre inhibidor oral multi-target contra **VEGFR-1,-2,-3**, **PDGFR** i **c-KIT** que està essent evaluat en fase II en carcinoma renal metastàtic

Com hem vist, són molts els fàrmacs inhibidors proteics proposats i molts altres encara en desenvolupament per fer front al carcinoma renal metastàtic.

Els resultats dels assajos clínics amb aquestes teràpies biològiques obren una porta a l'esperança per aquests malalts oncològics però també plantegen moltes preguntes:<sup>98</sup>

- Quines són les dianes més importants?
- Perquè aquests agents donen lloc a estabilitzacions de la malaltia o regressions per un curt període de temps (3-24 mesos) i rarament produeixen remissions completes perllongades?
- De quina manera es poden combinar aquests fàrmacs diana per obtenir més eficàcia, una resposta de més temps o evitar el desenvolupament de resistències?
- Per quins mecanismes apareix resistència a aquests fàrmacs diana després d'un període llarg d'administració?

Actualment s'està proposant l'ús de **combinacions de fàrmacs inhibidors proteics** en estratègies anomenades "**horitzontals**" (inhibició de diferents vies de transducció de senyal simultàniament) o "**verticals**" (inhibició d'una via de transducció de senyal a diferents nivells) amb la intenció de fer front a aquests tumors de forma més efectiva.

Un exemple d'estratègia terapèutica horitzontal seria la combinació de Bevacizumab (anticòs contra VEGF) i Erlotinib (inhibidor de l'activitat quinasa de EGFR). Un exemple d'estratègia terapèutica vertical seria la combinació de CCI-779 (inhibidor de mTOR que downregularia HIF) i Bevacizumab (anticòs contra VEGF).

Un altre repte que sorgeix de la implementació d'aquestes noves teràpies biològiques és la necessitat de definir **marcadors moleculars capaços de predir la resposta del tumor a un determinat tractament**. Es creu que trets biològics propis de cada tumor podrien fer-lo més o menys susceptible a determinats fàrmacs inhibidors proteics.

En aquesta direcció queda encara un llarg camí per recórrer i en l'actualitat s'estan fent estudis en paral·lel amb assajos clínics per trobar marcadors de resposta a les teràpies biològiques.

En aquest quadre adjunt s'indiquen de forma resumida els fàrmacs inhibidors proteics que s'han comentat. S'anota la fase d'estudi, el nombre de pacients participants en l'assaig, els resultats més significatius i l'any de presentació dels mateixos.

També estan representades les respostes al tractament clàssic (Interferó-alfa, Interleukina 2) en els malalts amb carcinoma renal metastàtic com a referència

FÀRMAC	MEC. ACCIÓ	DIANA	FASE	No Pc.	Rta GLOB	Rta PAR	Rta COMP	Estab malal	Temps mig progr	Supervivència	Duració Resposta	Any publicació estudi
IL-2	Activa rta cel.lular	Immuno-teràpia	II	255	15%	8%	7%			16,3 m	54 m	1992
INF-alfa	Antiangiogen, antitumor	Immuno-teràpia	III		8-26%		2-7%			Avantatge superv vs placebo 6-8,5 m.		1986
Geldenamycin 17-AAG	Inhibidor Tirosina-quinasa	HSP-90	II	28	No rta							2006
Rapamicina/CCI-779 (temsirolimus)	Inhibidor Tirosina-quinasa	mTOR	II	110	7% (who)			30%	Temps mig progressio 5,8 m	15m		2004
WX-6250	Anticòs monoclonal	AC	II	36		2,7%	2,7%	30%				2006
Bevacizumab (Avastin)	Anticòs monoclonal	VEGF	II vs plac			10% (who)			Prob no progr a 8 m 30% tto vs 5% plac Temps mig progressió 4,9 m tto vs 2,5 m plac p<0.001	No difer sig		2003
Erlotinib (OSI- 774) Gefitinib (ZD1839)	Inhibidors Tirosina-quinasa	EGFR	II/III		No rta							2003,2004

ABX-EGF Cetuximab (C-225)	Anticòs Monoclonal	EGFR	II		No rta							2003
BAY 43-9006 (Sorafenib)	Inhibidor Tirosina- quinasa	VEGFR-2 VEGFR-3 PDGFR-B c-RAF FLT-3 KIT	III Vs plac		10% (recist)  25% (who)	2% placebo 10% sorafenib (p<0,001)			Temps mig progressió 5,5 m tto vs 2,8 m plac (p<0,01)	No difer sig		2006 F II 2007 F III  FDA Desembre '05  EMA Juliol '06
SU-11248 (Sutent) (Sunitinib)	Inhibidor Tirosina- quinasa	VEGFR-1,2 PDGFR-A i B Flt-3, KIT RET	II- III (INF-a)*	63- 750*	40% (recist)			27% *	Temps mig progressió 8,7m  Temps/superv lliure progressió mig (PFS) 11 m tto vs 5 m INF-a	16.4 m Superv a l'any 65%		2006 F II 2007 F III  FDA Gener '06  EMA Gener '07
AGO12736	Inhibidor Tirosina- quinasa	VEGFR-2, VEGFR-3 PDGFR-B	II	52	46% (recist)							2005
PTK787/ ZK222584	Inhibidor Tirosina- quinasa	VEGFR1 VEGFR2 PDGFR-B	II/III	42		19%		60%	5,3 m	21,5 m  superv a l'any 67%		2003
STI-571 (Imatinib)	Inhibidor Tirosina- quinasa	C- KIT, PDGFR, BCR-ABL	II + INF-a	25					Temps mig progressió 3 m (no sign)			2006

Abreviatures : AC= anhidrasa-carbònica, FASE= fase de l'assaig clínic últim publicat, No Pc= nombre de pacients inclosos en l'assaig clínic, Rta GLOB= resposta global, Rta PAR= resposta parcial, Rta COMP= resposta completa, Estab Malal= estabilització de la malaltia, Temps mig progr= Temps mig a la progressió.



### 3.7.- INTERÈS I VALOR DE L'EXPRESSION IMMUNOHISTOQUÍMICA DE DIANES MOLECULARS EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS.

Davant dels avanços en el coneixement de la patogènia dels tumors de cèl·lules renals i la implementació de noves teràpies biològiques pel seu tractament ha sorgit la **necessitat de definir marcadors moleculars amb valor pronòstics i terapèutic** que ajudin en seguiment i maneig farmacològic d'aquests malalts.

Una forma d'abordar la recerca de marcadors moleculars és l'**estudi d'expressió de proteïnes oncogèniques** i que són dianes terapèutiques mitjançant la tècnica d'**immunohistoquímica sobre mostres tissulars**.

En carcinoma renal s'han publicat nombrosos treballs en aquesta direcció. En la taula adjunta es representen algunes proteïnes oncogèniques que són dianes terapèutiques, els seus corresponents fàrmacs inhibidors selectius i el nombre d'articles on s'avalua la seva expressió immunohistoquímica en tumors renals, especialment en Carcinoma renal de cèl·lula clara on la majoria d'aquestes proteïnes participen en la seva patogènesi.

Aquests articles s'han buscat a través del PUBMED i fent la següent cerca:

"nom de la diana terapèutica " and "immunohistochemistry" and "renal carcinoma".

En la taula es posa de relleu com aquests treballs s'han publicat molt recentment, la majoria en els últims cinc anys. Com veiem l'expressió d'algunes dianes terapèutiques ha estat caracteritzada per pocs grups (PDGFR-alfa 2 treballs publicats, mTOR 3 treballs publicats) i la d'altres es troba pendent d'estudi (PDGFR-beta, c-RAF).

DIANA	Fàrmacs inhibidors selectius utilitzats en assajos clínics	Nº d' estudis	Any de publicació
HIF-1-alfa *	No	5-10	2003-2006
Hsp-90 *	GELDENAMICINA (17-AAG)	1	2007
mTOR	RAPAMICINA	3	2006-2007
VEGF	BEVACIZUMAB	10-20	2001-2007
VEGFR1 *	PTK 787/ ZD222584		
VEGFR2 *	PTK 787/ ZD222584 BAY 43-9006 SU 11248, AGO 12736		
VEGFR3 *	BAY 43-9006		
PDGF PDGFRA	STI-571	2	2003-2007
PDGFRB	SU 11248, BAY 43-9006 PTK 787/ ZD22258	0	
TGF-a EGFR	ERLOTINIB, GEFITINIB CETUXIMAB, ABX-EGF	20-30	1994-2007
KIT	IMATINIB	6	2004-2007
c-RAF	BAY 43-9006	0	

Pensem que l'estudi immunohistoquímic de proteïnes oncogèniques i que són dianes terapèutiques té **gran interès per tres motius principals**:

En **primer lloc** perquè permet valorar com s'expressa una proteïna en els tumors: el grau d'extensió i d'intensitat d'expressió, els tipus cel·lulars (cèl·lules tumorals, cèl·lules de l'estroma: fibroblasts, cèl·lules endotelials, ...) i el compartiment cel·lular (membrana, citoplasma, nucli) on es troba.

En **segon lloc** perquè els resultats d'expressió proteica en mostres tissulars es poden **contrastar** amb els obtinguts a partir d'**estudis in vitro fets en cultius cel·lulars**.

Per exemple la sobreexpressió de diferents factors de creixement VEGF, PDGF, TGF- $\alpha$  que participen en l'oncogènesis del carcinoma renal de cèl·lula clara està documentada en línies cel·lulars de carcinoma renal.<sup>46 99 100</sup>

Ahora també es pot **contrastar** l'expressió proteica en teixit per immunohistoquímica amb els resultats d'altres d'**estudis amb metodologies i abordatges diferents**: Western (proteïna), anàlisi d'expressió gènica (mRNA), Real-Time PCR (mRNA), citogenètica clàssica (DNA), Hibridació genòmica comparada (DNA)

En **tercer lloc** l'expressió immunohistoquímica d'una proteïna i especialment d'aquelles que participen en la biologia tumoral té un potencial valor diagnòstic i pronòstic. A més a més si es tracta d'una diana molecular també té un interès terapèutic.

Les proteïnes es poden expressar de forma específica en determinats tipus tumorals i no en altres i aquest fet pot ajudar a discriminar entre diferents entitats tumorals i ser útil en el **diagnòstic** anatomopatològic diari.<sup>74</sup>

L'expressió proteica pot correlacionar-se estadísticament amb paràmetres d'evolució clínica com la mort, la progressió tumoral (recidiva, metàstasi) i així tenir un significat **pronòstic**.

En aquest sentit, s'estan buscant activament nous marcadors moleculars per predir de forma acurada l'evolució dels pacients amb càncer renal. Es pretén així millorar el seu seguiment i plantejar en casos d'alt risc de recidiva o metàstasi teràpies adjuvants.<sup>71,101 72 75</sup>

S'està plantejant si l'expressió en teixit de proteïnes que participen en la oncogènesis i que són dianes terapèutiques podria correlacionar-se amb resposta als seus corresponents fàrmacs inhibidors selectius proteics.

Aquesta aproximació podria ser de gran rellevància de cara a **definir marcadors de resposta a tractament** per la selecció d'aquells malalts que més es poguessin beneficiar d'una determinada teràpia diana ("target therapy").

# **4. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS**

## 4.- HIPÒTESIS DE TREBALL I OBJECTIUS

El Carcinoma renal es considera el càncer urològic **més letal** per l'alt percentatge de pacients que desenvolupen **malaltia metastàtica** (30-50%) i el pronòstic desfavorable en aquests casos amb un temps de supervivència mig de sols 6-12 mesos i una taxa de supervivència als 2 anys del 10-20%.<sup>31</sup>

La **diferenciació sarcomatoide** en un tumor renal es considera una troballa histològica de mal pronòstic que s'associa a una supervivència mitja d'entre 6 i 19 mesos.

El maneig dels pacients amb Carcinoma renal planteja fonamentalment **dos grans problemàtiques:**

**Des del punt de vista pronòstic**, existeix una dificultat en predir de forma acurada l'evolució del malalt que es presenta amb Carcinoma renal localitzat.

Tot i que disposem de nombrosos paràmetres pronòstics validats (TNM, grau Fuhrman, Performance Status...) alguns cops aquests no són capaços d'identificar quins pacients desenvoluparan metastasi i quan ho faran i quins no. En la pràctica clínica, per exemple, ens trobem amb pacients Carcinoma renal de cèl.lula clara grau Fuhrman 2 localitzats a ronyó (pT1-T2) que desenvolupen metastasi al poc temps (1-2 anys) de la resecció quirúrgica.

**Des del punt de vista terapèutic**, clàssicament l'interferó-alfa i la Interleuquina-2 han estat els únics fàrmacs aprovats pel tractament dels malalts amb Carcinoma renal metastàtic amb taxes de resposta inferiors al 20% i respostes complertes sols en 2-8% dels malalts.

Les poques opcions terapèutiques i el poc benefici aconseguit amb el tractament immunomodulador han contribuït al pronòstic tant pobre dels malalts amb carcinoma renal disseminat.<sup>32,72</sup>

Els avenços en el coneixement de **la biologia tumoral**, han permès identificar i definir les **proteïnes amb activitat quinasa** no sols com elements claus en el creixement, la diferenciació i la supervivència cel·lular sinó com participants actius en la transformació neoplàstica. Concretament els **receptors amb activitat tirosina-quinasa** s'han perfilat com proto-oncogens implicats en la patogènia de nombrosos tumors.

En els darrers anys la **Teràpia Biològica** ha revolucionat l'abordatge farmacològic dels malalts oncològics. Aquesta nova corrent terapèutica es fonamenta en el coneixement de proteïnes oncogèniques i en la seva inhibició selectiva com a forma de combatre el càncer.

Unes de les drogues que lideren la teràpia biològica són els **inhibidors de proteïnes amb activitat quinasa**.<sup>4</sup>

Els **avenços en biologia tumoral i teràpia biològica** han tingut un gran impacte en el camp dels **Tumors de cèl·lules renals i estan donant resposta als problemes pronòstics i terapèutics que plantegen aquests tumors**.

En les darreres dècades i en l'actualitat s'està treballant per caracteritzar la biologia dels diferents subtipus de tumors de cèl·lules renals. Precisament un dels subtipus més freqüents i més estudiat **etiopatogènicament** és el **carcinoma renal de cèl·lula clara**.

Les alteracions genètiques (heterozigositat de 3p, pèrdua de funció del gen VHL) i les proteïnes implicades en la seva patogènia (HIF, VEGF, PDGF, TGF- $\alpha$ , CAIX etc...) representen la base conceptual per definir **nous marcadors moleculars pronòstics i terapèutics**.

Amb aquestes rerefons, s'estan proposant **nous models predictius** basats en la integració de factors pronòstics ja establerts i nous marcadors moleculars. Es pretén així, poder predir l'evolució dels malalts d'una forma més exacta per un seguiment clínic més ajustat i per identificar aquells casos amb alt risc de recidiva o metastasi que es poguessin beneficiar de quimioteràpia adjuvant post-cirurgia.<sup>71,72</sup>

Alhora, la **implementació de les Teràpies biològiques** pels malalts amb carcinoma renal metastàtic és ja una realitat. S'estan duent a terme **nombrosos assajos clínics** amb inhibidors proteics tirosina-quinasa (Sunitinib, Sorafenib...etc) que han aconseguit resultats esperançadors i significativament millors respecte a la teràpia convencional amb Interferó-alfa i Interleuquina-2.<sup>82 77</sup>

En resum, aquest treball té com a rerefons l'**enfoc translacional** del carcinoma renal basat en el coneixement de la seva biologia com a forma d'abordar els **reptes pronòstics i terapèutics** que planteja aquest càncer.

El nostre estudi té també com a referència el **desenvolupament de la teràpia biològica** pels malalts amb càncer i del gran ressò que va tenir l'aprovació de l'Imatinib (fàrmac inhibidor selectiu proteic de BCR-ABL, KIT i PDGFR) com a tractament eficaç de la Leucèmia Mieloide Crònica i el GIST per la FDA al 2001.

Aquest fet va despertar l'interès per l'expressió de KIT i PDGFR, ambdues dianes moleculars de l'Imatinib en diferents tumors amb la intenció d'expandir l'ús d'aquest fàrmac inhibidor proteic pel tractament d'altres neoplàsies.

A principis d'aquesta dècada es considerava que l'expressió d'una diana molecular en un tumor era rellevant de cara a proposar la teràpia amb els seus corresponents inhibidors selectius proteics. Aquesta idea amb el temps ha estat discutida i matisada.

L'**anàlisi immunohistoquímic en teixit tumoral de proteïnes oncogèniques** és interessant perquè permet valorar com i on s'expressen aquestes proteïnes i discutir el seu possible valor diagnòstic, pronòstic i terapèutic.

Pel seu paper com a mediadors de proliferació tumoral i pel seu potencial com a dianes terapèutiques; en aquest treball ens hem centrat en l'estudi de l'expressió dels receptors transmembrana tirosina-quinasa KIT i PDGFRA en tumors de cèl·lules renals.

**KIT** és un receptor transmembrana tirosina-quinasa que s'ha implicat en la patogènesi del GIST. El nostre grup va començar a estudiar l'expressió immunohistoquímica d'aquest marcador en un sèrie de Carcinomes renals amb diferenciació sarcomatoide mogut sobretot pel ressò mediàtic del valor de KIT com a diana terapèutica de l'Imatinib i per la manca de tractaments eficaços i el mal pronòstic d'aquestes neoplàsies.

Paral·lelament a la realització d'aquest estudi l'any 2003 Yamazaki et al van constatar la sobreexpressió de KIT en el Carcinoma renal Cromòfob. En aquest treball es va valorar el perfil d'expressió mitjançant arrays de DNA de 3 casos de Carcinoma renal Cromòfob, 10 Carcinomes renals de Cèl·lula Clara i 2 Carcinomes renals Papil·lars i es va documentar la sobrerregulació de KIT de forma exclusiva en els 3 casos de Carcinoma renal cromòfob<sup>102</sup>

Amb l'intenció de **contrastar els resultats de Yamazaki et al i tenint en compte el potencial oncogènic i com a diana terapèutica** de KIT vam estudiar l'expressió immunohistoquímica d'aquesta proteïna en una sèrie de tumors de cèl·lules renals.

També vam completar l'estudi d'expressió de KIT en la sèrie de carcinomes renals amb diferenciació sarcomatoide.

**PDGFR** és també un receptor transmembrana tirosina-quinasa de la mateixa família que el KIT que també s'ha implicat en la patogènesi d'alguns tumors. Aquest receptor té dos isoformes l'alfa i la beta. En mostres tissulars de tumors renals, no hi ha cap estudi d'expressió de PDGFR-Beta i sols dos de PDGFR-Alfa amb resultats controvertits. En un dels treballs publicat per Sulzbacher et al una alta expressió de PDGFRA es va correlacionar amb progressió tumoral i mal pronòstic. Per contra en l'estudi de Tawfik et al un valor baix de PDGFRA va ser significativament predictiu d'una menor supervivència global.<sup>103,104</sup>

Adicionalment, l'expressió de PDGFR en el **Carcinoma renal de cèl·lula clara** podria ser d'interès per la implicació del seu lligand (PDGF) en la seva **patogènesi**.

Com ja s'ha comentat anteriorment la pèrdua de funció del gen VHL en aquest subtipus tumoral condiciona la sobreexpressió mediada per HIF-1a de diferents factors de creixement entre els que es troba el PDGF<sup>44</sup>

Es creu que la unió lligand (PDGF)-receptor (PDGFR) podria promoure l'angiogènesi i el creixement tumoral contribuint així al fenotip tant vascularitzat del Carcinoma renal de cèl·lula clara.

Precisament pel paper del PDGF en la tumorigènesi del Carcinoma renal de cèl·lula clara s'ha proposat la inhibició de PDGF-PDGFR amb teràpies biològiques com a tractament dels pacients amb carcinoma renal de cèl·lula clara metastàtic.

Tenint en compte **els pocs estudis publicats al respecte**, la **implicació de PDGF en la patogènesi** del Carcinoma renal de cèl·lula clara, **el potencial de PDGFR com a diana terapèutica i el seu controvertit valor pronòstic** vam considerar avaluar l'expressió immunohistoquímica de PDGFRA i PDGFRB en tumors renals.

També vam estudiar l'expressió d'aquests marcadors en la serie de Carcinomes renals amb diferenciació sarcomatoide per explorar el seu possible ús com a diana terapèutica.

## OBJECTIU GENERAL

- L'objectiu general d'aquest treball és **caracteritzar l'expressió proteica de KIT i PDGFR-alfa/-beta** en mostres tissulars de tumors de cèl·lules renals mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica i **avaluar** el seu possible **valor com a marcadors diagnòstics, pronòstics i terapèutics**.

## OBJECTIUS PARTICULARS-ESPECÍFICS

1. Caracteritzar el **perfil d'expressió de KIT, PDGFR-alfa i PDGFR-beta** en diferents subtipus de Tumors de cèl·lules renals.
2. Avaluar i discutir el valor de **KIT com a marcador diagnòstic i terapèutic** en tumors de cèl·lules renals.
3. Avaluar i discutir el valor de **PDGFR-alfa i -beta com a marcador diagnòstic, pronòstic i terapèutic** en tumors de cèl·lules renals.
4. Avaluar i discutir el valor de **PDGFR-alfa i -beta com a marcador diagnòstic, pronòstic i terapèutic** en Carcinoma renal de cèl·lula clara on aquestes proteïnes participen en la seva oncogènesi.
5. Caracteritzar el **perfil d'expressió de KIT, PDGFR-alfa i PDGFR-beta** en el Carcinoma renal amb diferenciació sarcomatoide considerant la part epitelial i sarcomatoide de forma independent.
6. Estudiar si la **sobreexpressió proteica de KIT i PDGFR-alfa** en la part sarcomatoide s'**associa a mutacions** en aquests gens.
7. Discutir el valor de **KIT i PDGFR-alfa com a diana terapèutica** en el Carcinoma renal amb diferenciació sarcomatoide.

# 5. MATERIAL I MÈTODES



## 5.- MATERIALS I MÈTODES :

### 5.1.- ESTUDI DE L' EXPRESSIÓ DE KIT EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS AMB ESPECIAL ATENCIÓ AL CARCINOMA RENAL AMB DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE.

#### 5.1.1. SELECCIÓ DE LA SERIE DE TUMOR DE CÈL·LULES RENALS PER ESTUDI DE KIT

Es va recollir una serie de **78 casos de Tumors de cèl·lules renals** de l'axiu d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

Aquests es van revisar i tipificar d'acord a la **classificació** dels tumors renals de Heidelberg.<sup>105</sup> Es va també determinar el grau **Fuhrman** en el grup dels Carcinomes renals de cèl·lula clara.

El nombre de casos per cada tipus histològic inclòs en la serie fou el següent:

- 25 casos de Carcinoma Renal Cromòfob (3 dels quals amb diferenciació sarcomatoide)
  - 13 casos es van subclassificar en variant clàssica i 12 en eosinòfila
- 14 casos d'Oncocitoma Renal
- 29 casos de Carcinoma Renal de Cèl·lula clara
  - 3 casos amb grau Fuhrman 1/4
  - 8 casos amb grau Fuhrman 2/4
  - 11 casos amb grau Fuhrman 3/4
  - 7 casos amb grau Fuhrman 4/4
- 10 casos de Carcinoma Renal Papil·lar

En aquesta serie no es van anotar dades clínicopatològiques a excepció del **subtipus histològic tumoral** i el **grau Fuhrman** com ja hem comentat.

Per cada cas es va seleccionar un bloc de tumor representatiu per realitzar l'estudi immunohistoquímic de KIT.

#### 5.1.2. SELECCIÓ DE LA SERIE DE CARCINOMES RENALS AMB DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE PER ESTUDI DE KIT

Es va recollir una serie de **20 casos de Carcinoma renal amb diferenciació sarcomatoide** de l'axiu d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

Aquests es van revisar i tipificar d'acord a la classificació de la OMS dels tumors renals del 2002. Com a **dades anatomo-patològiques** es van anotar: el **subtipus histològic de la part epitelial**, la **mida del tumor** i el **pTNM**. (Taula 5.1)

La serie incloïa 2 casos (10%) amb part sarcomatoide sense part epitelial reconeguda després d'una inclusió exhaustiva del tumor. En el reste de casos, el component epitelial va correspondre a Carcinoma renal de cèl·lula clara en 10 casos (50%), Carcinoma renal papil·lar en 5 casos (25%) i Carcinoma renal cromòfob en 3 casos (15%).

També es van registrar les següents **dades clíniques** per cada cas: **sexe**, **edat**, **evolució** (DOD=mort per la malaltia "die of disease", AWOD="viu sense malaltia, alive without disease", DISEASE "viu amb malaltia") i **temps de seguiment**. (Taula 5.1)

Solsament en 19 dels casos es va disposar de teixit. Per cada cas es va seleccionar un o dos blocs amb representació de la **part epitelial** i **sarcomatoide** per fer l'estudi immunohistoquímic de KIT en els dos components.

### 5.1.3.CONDICIONS DE LA TÈCNICA IMMUNOHISTOQUÍMICA PER KIT

L'estudi immunohistoquímic es va fer a partir de seccions de 5 micres de gruix de teixit tumoral fixat en formol i inclòs en parafina.

Després de la **desparafinació** i **rehidratació** del teixit es va procedir a la **recuperació antigénica** en buffer EDTA 100mM (pH 8.0) amb olla a pressió (100°C) 2 minuts

L'anticòs utilitzat fou el **KIT (rabbit polyclonal)** de la casa comercial **DAKO** (referència 4502) amb una dilució de **1:100** i un **temps d'incubació d'una hora a temperatura ambient**.

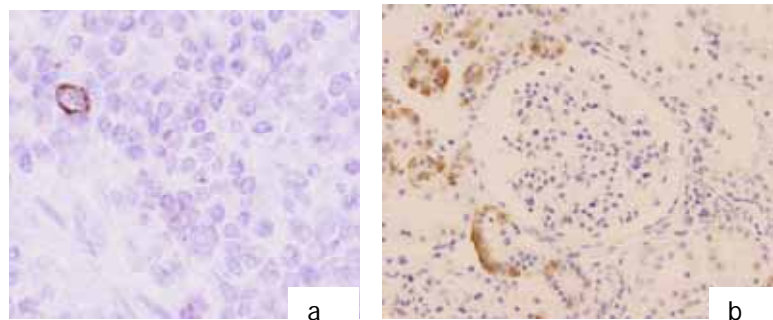
La **peroxidasa endògena es va bloquejar** incubant-se el teixit 10 min en peròxid d'hidrogen.

El sistema de detecció utilitzat fou l'**EnVision** (DAKO ref K401111/0) que inclou un **anticòs secundari** anti-rabbit en forma de polímer conjugat (30 minuts d'incubació).

El **revel·lat** es duqué a terme amb **DAB** (diaminobenzidina) i la contratinció amb Hematoxilina.

La tècnica immunohistoquímic es va fer de forma automatitzada pel processador TechMate 500 DAKO.

Els mastòcits del teixit van servir de **control intern positiu** pel KIT, mostrant una positivitat de membrana per aquest marcador (Figura 5.1.a) Els glomèruls i l'interstici van ser útils com a **control negatiu de teixit**. (Figura 5.1.b)



**Figura 5.1.** En aquestes imatges es representa (a) un mastòcit KIT positiu utilitzat com a control intern de la tècnica (X40) i (b) un glomèrul renal KIT negatiu (x20).

També es va realitzar **control negatiu de la tècnica substituint l'anticòs primari per solució fosfat salina**.

### 5.1.4.CONDICIONS D' AVALUACIÓ DE L' EXPRESSIÓ DE KIT

L'expressió de KIT es va estimar de **forma semiquantitativa** en una secció del tumor. Es va recollir l'extensió i el patró de la seva expressió:

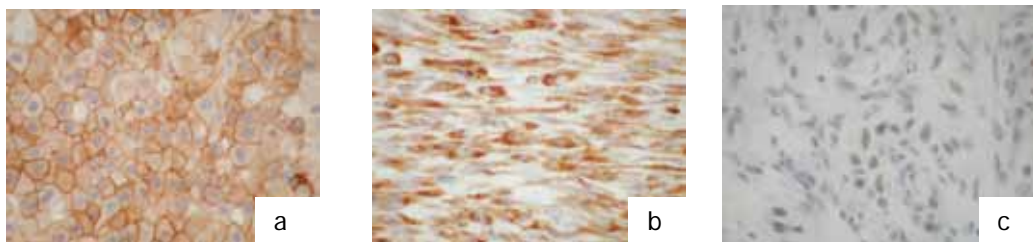
L'**extensió** de l'expressió es va categoritzar en 3 grups segons el **percentatge** aproximat de cèl.lules positives:

- **Focal** (<25% de cèl.lules positives),
- **Moderada** (25-50% de cèl.lules positives)
- **Difusa** (>50% de cèl.lules positives)

En la serie de Carcinomes renals amb **diferenciació sarcomatoide** l'extensió de l'expressió en 3 grups es va considerar amb els següents percentatges:

- **Focal** (<10% de cèl.lules positives)
- **Moderada** (10-50% de cèl.lules positives)
- **Difusa** (>50% de cèl.lules positives)

També es va recollir el **tipus de patró d'expressió (Figura 5.2)**: de **membrana (a)**, **citoplasmàtic (b)** i/o **nuclear (c)**.



**Figura 5.2.** En aquestes tres imatges histològiques es representen els patrons d'expressió observats. De membrana **(a)** en un cas de Carcinoma Cromòfob (x200), de citoplasma **(b)** en la part sarcomatoide d'un carcinoma Cromòfob (x400) i nuclear **(c)** en la part sarcomatoide d'un carcinoma de cèl.lula clara (x400)

En la serie de Carcinomes renals amb diferenciació sarcomatoide es va evaluar l'expressió en la part epitelial i sarcomatoide de forma **independent**.

## 5.2.- ESTUDI DE L'EXPRESSION DE PDGFR EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS AMB ESPECIAL ATENCIÓ AL CARCINOMA RENAL AMB DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE

### 5.2.1. SELECCIÓ DE LA SERIE DE TUMORS DE CÈL·LULES RENALS PER ESTUDI DE PDGFR I ELABORACIÓ D'ARRAYS DE TEIXIT

Es va recollir una serie de **229 casos de Tumors de cèl.lules renals** obtinguts amb consentiment de l'Arxiu d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. El diagnòstic histològic de tots els casos inclosos es van revisar tenint en compte l'última classificació de la OMS dels tumors renals (2002) <sup>33</sup> El nombre de casos per cada tipus histològic inclòs en la serie fou el següent:

- 113 casos de Carcinoma renal de Cèl.lula clara (49 %)
  - 16 amb grau Fuhrman 1 / 4
  - 47 amb grau Fuhrman 2 / 4
  - 35 amb grau Fuhrman 3 / 4
  - 15 amb grau Fuhrman 4 / 4
- 12 casos de Carcinoma renal Papil.lar tipus 1 (5 %)
- 20 casos de Carcinoma renal Papil.lar tipus 2 (9 %)
- 42 casos de Carcinoma renal Cromòfob (19 %)
- 5 casos de Carcinoma mucinós tubular (2 %)
- 2 casos de Carcinoma de conductes col.lectors (Bellini) (1 %)
- 28 casos d'Oncocitoma renal (12 %)
- 7 casos de Carcinoma renal No-classificable(3 %)

Com a **dades anatomo-patològiques** es van anotar: el **subtipus histològic**, el **grau nuclear Fuhrman** (en carcinoma renal de cèl.lula clara), la **mida del tumor** i el **pTNM**. (Taula 5.2)

També es van registrar les següents **dades clíniques** per cada cas: **sexe**, **edat**, **evolució** (DOD=mort per la malaltia "die of disease", AWOD=viu sense malaltia, "alive without disease", DISEASE= viu amb malaltia) i **temps de seguiment**.

Per fer l'estudi immunohistoquímic de PDGFRA i PDGFRB es van utilitzar "**arrays de teixit**".

Un array de teixit és una col.lecció ordenada de petits "cores" de teixit en un únic bloc de parafina a partir del qual es poden fer seccions histològiques que contindran un elevat nombre de mostres per estudiar. Sobre els arrays de teixit es poden fer diferents estudis desde FISH (Fluorescence in situ hybridization), Hibridació in situ de RNA i immunohistoquímica.

Per tant, aquesta tècnica permet realitzar de forma simultànea estudis de diferents tipus sobre un gran nombre de casos, assegurant-se així una homogeneïtat de condicions sobre les mostres, un estalvi significatiu en reactius i en temps de valoració de la tècnica.

L'elaboració d'ARRAYS de TEIXIT consisteix en ( veure Figura 5.3. i 5.4. ):

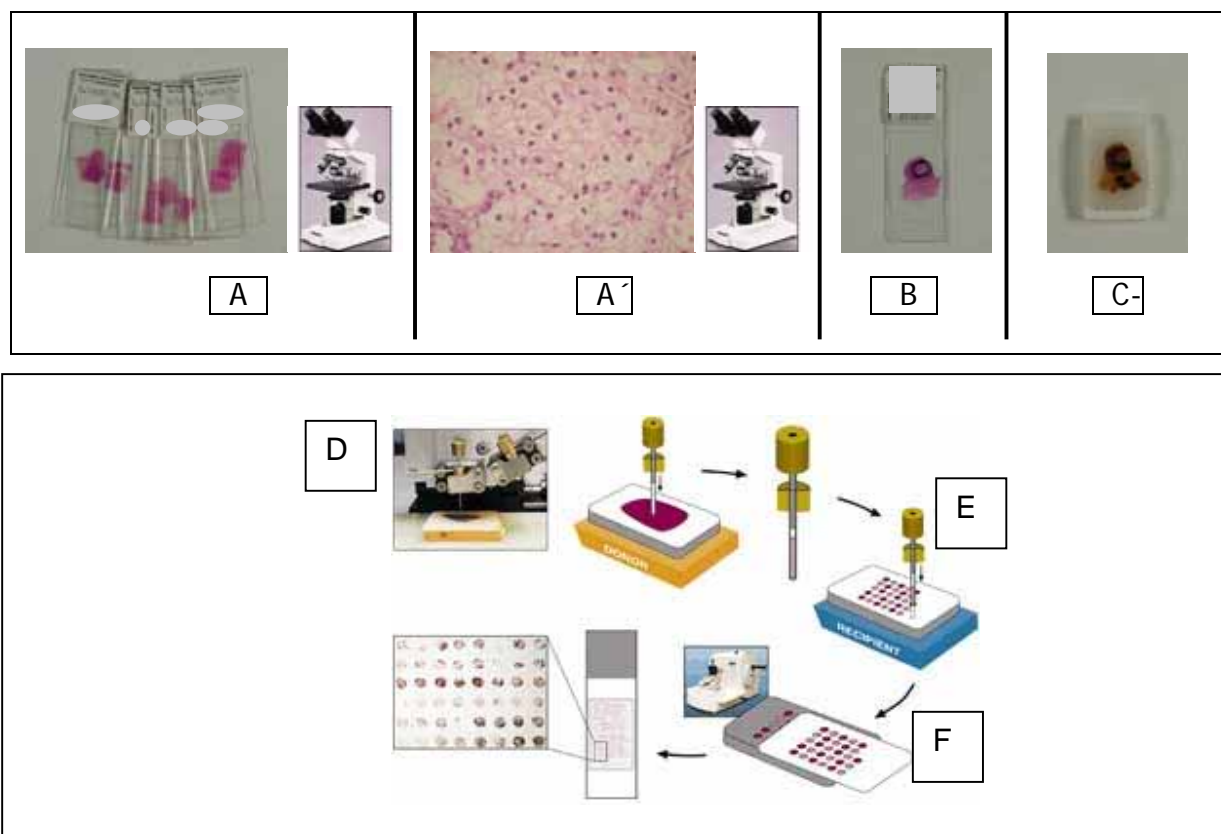
A i B - revisar les preparacions histològiques d'un cas i seleccionar una àrea tumoral representativa

C - marcar la zona tumoral seleccionada en el bloc de parafina

D.- extraure del bloc de parafina seleccionat "donant" un cilindre de 0.6, 1, 2 ó 6 mm de gruix que conté el teixit d'interès previamente marcat

E.- reinclusió del cilindre de teixit extret del bloc "donant" a un bloc "receptor" de forma ordenada i seguint una plantilla d'inclusió.

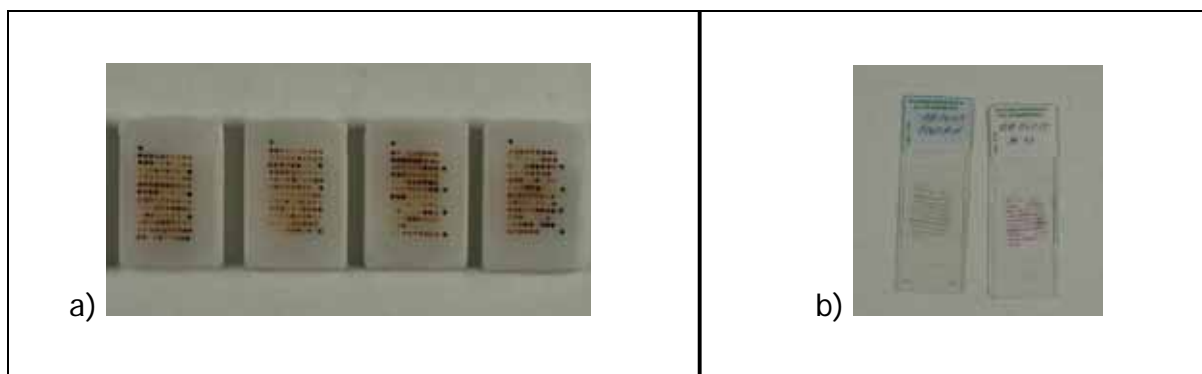
F.- obtenció d'un bloc receptor que conté una serie de mostres tumorals i a partir del qual es poden fer seccions histològiques i ulteriors estudis.



**Figura 5.3.** Representació esquemàtica de l'elaboració d'arrays de teixit. <http://www.microarraystation.com/images/tissue-microarray-process.jpg>

En el nostre estudi es van dissenyar i elaborar **10 arrays** de teixit amb un total de **229 casos** de Tumors de cèl.lules renals. Cada array va incloure 23 tumors. Els casos corresponien a peces quirúrgiques de tumors fixats en formol i inclosos en parafina.

Per a cada cas es van incloure 3 "cores" de teixit tumoral de 1 mm de diàmetre cadascun d'ells. En 72 casos també es van representar 2 cores de parènquima renal normal



**Figura 5.4.** Imatges corresponents a alguns dels arrays tissulars realitzats (a) i a dos preparacions histològiques obtingudes a partir dels blocs de teixit (b). Una de les preparacions està tenyida amb hematoxilina-eosina i l'altra correspon a una tinció immunohistoquímica per PDGFRA.

### 5.2.2. SELECCIÓ DE LA SERIE DE CARCINOMES RENALS AMB DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE PER ESTUDI DE PDGFR

Es van seleccionar **16 casos** fixats en formol i inclosos en parafina de peçes quirúrgiques de **Carcinoma renal amb diferenciació sarcomatoide** de l'arxiu d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona. 10 d'aquests casos pertanyien a la serie de 20 casos recollida al 2004 en la que es va estudiar l'expressió de KIT.

Sols vam considerar de la serie previa aquells casos en els que la part sarcomatoide estava ampliament representada i en els que hi havia suficient material per realitzar l'estudi complet d'expressió immunohistoquímica PDGFRA, PDGFRB i extracció de DNA posterior (veure apartat 5.3) Es van afegir també 6 nous casos de Carcinoma renal amb diferenciació sarcomatoide.

Es van revisar les preparacions histològiques per confirmar el diagnòstic. La part epitelial dels casos es va diagnosticar d'acord a la classificació de la WHO del 2002.

En 9 casos la part epitelial va correspondre a un carcinoma renal de cèl.lula clara (56%), en 1 cas a un carcinoma renal papil.lar (6%), en 5 a un carcinoma renal cromòfob (32%) i en un cas a un carcinoma renal no classificable (6%).

Per cada cas, es va seleccionar un bloc representatiu de la **part epitelial** i un altre de la **part sarcomatoide** per realitzar l'estudi immunohistoquímic de cada component.

Com a **dades anatomo-patològiques** es van anotar: **el subtipus histològic de la part epitelial** (com ja hem esmentat) **la mida del tumor** i el **pTNM**. (Taula 5.3 i 5.4)

També es van registrar les següents **dades clíniques** per cada cas: **sexe**, **edat**, **evolució** (DOD=mort per la malaltia "die of disease", AWOD "viu sense malaltia, alive without disease", DISEASE "viu amb malaltia") i **temps de seguiment**. (Taula 5.3 i 5.4)

### 5.2.3.CONDICIONS DE LA TÈCNICA D' IMMUNOHISTOQUÍMICA PER PDGFR

L'estudi immunohistoquímic es va fer a partir de seccions de teixit tumoral fixat en formol i inclòs en parafina de 5 micres de gruix. Aquestes es van **desparafinar** i **rehidratar**.

La **recuperació antigènica** es va realitzar en buffer CITRAT (pH 6.0) (DAKO, S 2031) amb olla a pressió 5 minuts amb un temps de repòs posterior de 15 minuts a temperatura ambient.

L'anticòs utilitzat fou el **PDGFRA i PDGFRB (rabbit polyclonal)** de la casa comercial **Santa Cruz** (referències sc-338 i sc-339 respectivament) amb una dilució de **1:100 pel PDGFRA i 1:200 pel PDGFRB** i un temps d'incubació d'**una hora** a temperatura ambient pels dos anticòssos. La **peroxidasa endògena es va bloquejar** amb una incubació en peròxid d'hidrogen de 10 minuts.

El sistema de detecció utilitzat fou l'**EnVision** (DAKO ref K401111/0) que inclou un **anticòs secundari anti-rabbit** en forma de polímer conjugat. El revelat es dugué a terme amb DAB (diaminobenzidina) i la contrateixió amb Hematoxilina.

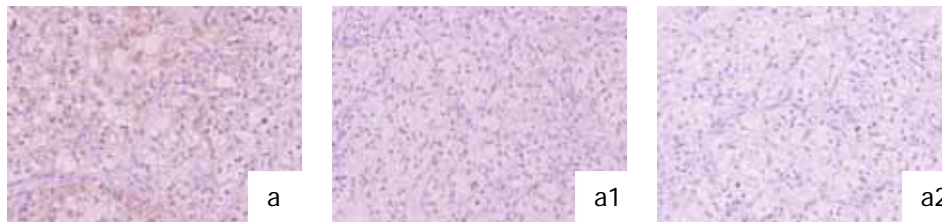
La tècnica immunohistoquímic es va fer de forma automatitzada pel processador "Autostainer" de DAKO.

Els túbuls renals del parènquima normal van servir de **control intern positiu** pel PDGFRA i PDGFRB, mostrant una positivitat citoplasmàtica per aquests marcadors. Els glomèruls van ser negatius pel PDGFRA i van ser útils com a **control negatiu de teixit per aquest marcador**.

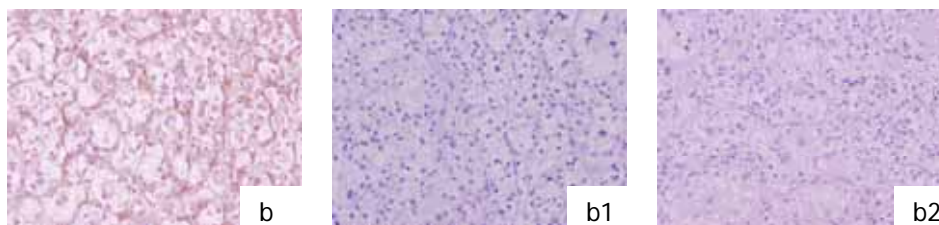
Es va fer **control negatiu** de la tècnica *substituint l'anticòs primari per Immunoglobulina rabbit no immune (Figura 5.6.a1; Figura 5.7. a1.) a la mateixa concentració que l'anticòs.*

També es va confirmar l'especificitat dels anticòssos *substituint l'anticòs primari per una dilució de l'anticòs primari amb blocking peptide* (amb una concentració deu vegades superior a l'anticòs i incubació de la dilució 2 hores a 37°C) (Figura 5.6.a2.; Figura 5.7.a2.).

En ambdós casos després de realitzar-se tota la tècnica, el teixit no va mostrar positivitat immunohistoquímic assegurant-se així l'especificitat dels anticòssos.



**Figura 5.6.** Expressió de PDGFRA en un Carcinoma de cèl·lula clara (a) (expressió en les cèl·lules tumorals: difusa i dèbil, score: baix; expressió vascular: negativa). Mateix cas com a control negatiu utilitzant Immunoglobulina no immune (a1) i blocking peptid (a2)



**Figura 5.7.** Expressió de PDGFRB en un Carcinoma de cèl·lula clara (b) (expressió en les cèl·lules tumorals: negativa; expressió vascular: positiva difusa). Mateix cas com a control negatiu utilitzant Immunoglobulina no immune (a1) i blocking peptid (a2)



### 5.2.4. CONDICIONS D' AVALUACIÓ DE L' EXPRESSIÓ DE PDGFR

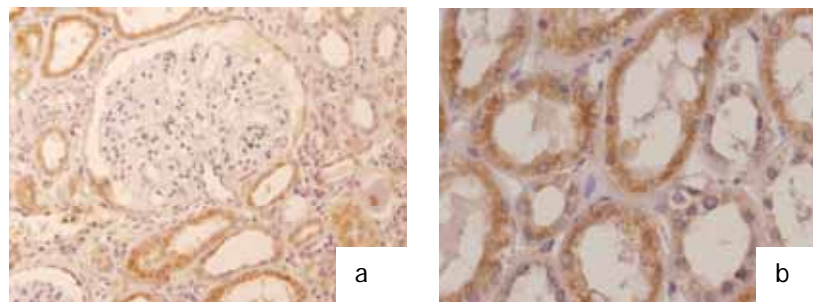
PDGFRA i PDGFRB es van estimar de forma **semiquantitativa** en una secció del tumor tenint en compte l'expressió d'aquests marcadors en les cèl·lules tumorals (extensió i intensitat i score a partir d'aquests dos paràmetres ) i en la paret vascular (extensió).

L'**extensió** de l'expressió en les **cèl·lules tumorals** es va categoritzar en 3 grups segons el percentatge aproximat de cèl·lules positives:

- **Focal** (<25% de cèl·lules positives)
- **Moderada** (25-50% de cèl·lules positives)
- **Difusa** (>50% de cèl·lules positives)
- 

També es va valorar la **intensitat** de l'expressió en les **cèl·lules tumorals** en dos graus tenint com a referència la intensitat dels túbuls del parènquima normal (Figura 5.8 i 5.9):

- **Dèbil** si la intensitat era menor que la dels túbuls
- **Fora** si la intensitat era igual o major que la dels túbuls



**Figura 5.8.** En aquesta imatge histològica es representa l'expressió de PDGFRA en els túbuls del parènquima renal normal (a 200x, b 400x) La seva intensitat es va utilitzar com a referència i amb la categoria de "fora".



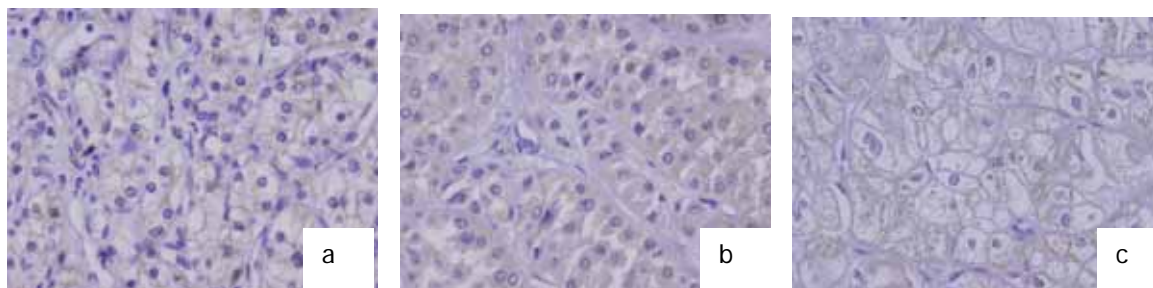
Posteriorment a partir d'aquests dos paràmetres: extensió i intensitat en les cèl·lules tumorals es va fer un **score** de tres categories (0,1,2) (Taula 5.5)

- ❖ **0 , expressió absent.**- aquells casos negatius o positius amb intensitat dèbil i extensió focal.
- ❖ **1, expressió baixa.**- aquells casos amb intensitat dèbil i extensió moderada o difusa i també aquells casos amb intensitat forta i extensió focal
- ❖ **2, expressió alta.**- aquells casos amb intensitat forta i extensió moderada o difusa .

		Extensió			
		Negativa	Focal	Moderada	Difusa
Intensitat	Dèbil	Absent	Absent	Baixa	Baixa
	Força	Absent	Baixa	Alta	Alta

**Taula 5.5.** Representació de l'avaluació de l'score d'expressió en cèl·lules tumorals de PDGFRA i PDGFRB que té en compte extensió i intensitat.

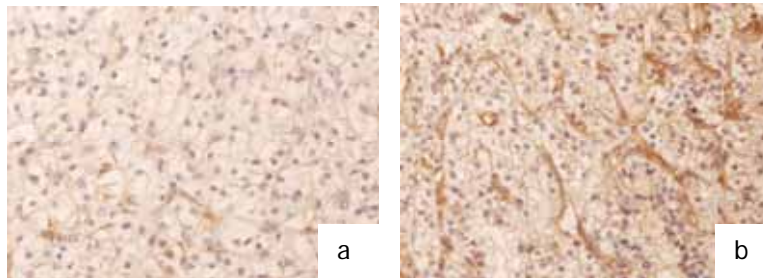
L'avaluació de PDGFRA i PDGFRB en les cèl·lules tumorals no fou fàcil ja que en molts casos la positivitat fou **dubtosa (Figura 5.9)**. En aquest sentit, es van utilitzar uns criteris estrictes i sols els casos clarament positius tot i que dèbils foren considerats positius. L'avaluació de l'expressió la van fer 3 patòlegs de forma independent i els casos discordants i els dubtosos foren discutits en grup en un mateix microscopi arribant-se a un acord.



**Figura 5.9.** Expressió de PDGFRA en tres casos de Carcinoma renal que foreu etiquetats com dubtosos (a)Ca renal de Cèl·lula clara, (b) Oncocitoma, (c) Carcinoma cromòfob. Aquests casos es discutiren entre els tres patòlegs que van evaluar l'expressió immunohistoquímica i es consideraren negatius.

També es va valorar l'expressió en els vasos d'aquests dos marcadors que es va classificar com a (Figura 5.11):

- **Negativa**
- **Focal** < 25% dels vasos tumorals són positius pel marcador.
- **Difusa** >25% dels vasos tumorals són positius pel marcador.



**Figura 5.11.** Expressió vascular de PDGFRB en dos carcinomes de cèl·lula clara:(a) el primer amb expressió vascular positiva focal i (b) el segon positiva difusa.

També es va recollir el **tipus de patró d'expressió en les cèl·lules tumorals** : **perifèric, citoplasmàtic, perifèric i citoplasmàtic i nuclear.**

En la serie de Carcinomes renals amb diferenciació sarcomatoide es va evaluar l'expressió en la part epitelial i sarcomatoide de forma **independent.**

### 5.3.- ESTUDI MUTACIONAL DE KIT I PDGFRA EN CARCINOMA RENAL AMB DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE.

L'estudi mutacional de KIT i PDGFRA es va realitzar sols en la part sarcomatoide ja que aquesta fou la part que va mostrar sobreexpressió immunohistoquímica de KIT i PDGFRA.

Per tant, l'extracció de DNA es va dur a terme sols en la part sarcomatoide.

Es va seleccionar un bloc amb representació de la part sarcomatoide en el que previamente s'havia caracteritzat l'expressió immunohistoquímica de KIT i PDGFRA.

Si el bloc contenia arees clarament definides de parènquima renal no tumoral o component epitelial aquestes es van treure.

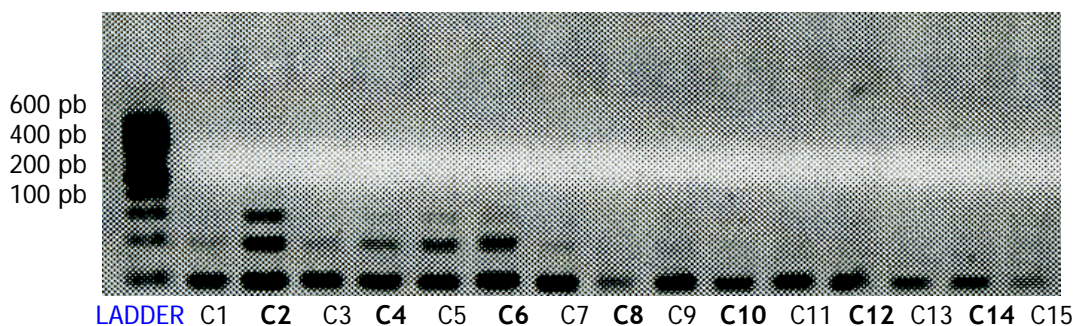
No es va fer extracció de DNA d'aquells blocs que tenien la part epitelial i sarcomatoide molt barrejades i en els que hagués calgut tècniques de microdissecció per obtenir els dos components per separat. Tampoc es van fer extracció de DNA els casos amb molta necrosis tumoral.

El DNA es va extraure utilitzant el KIT comercial "QIAamp® DNA mini KIT" (Qiagen, número de catàleg 51304) i seguint les instruccions incloses en el mateix producte.

Després de l'extracció es va realitzar una **PCR de control** en la que es van amplificar alhora fragments de 100, 200, 400, 600 parells de bases (pb).

L'objectiu d'aquesta PCR fou el de valorar la qualitat del DNA obtingut i el grau de fragmentació del mateix. Partint d'un DNA de poca qualitat (molt fragmentat) s'aconseguiran amplificar fragments de longitud petita 100-200 pb mentres que amb un DNA de molta qualitat (poc fragmentat) s'amplificaran fins i tot fragments de 600 pb (de molta longitud).

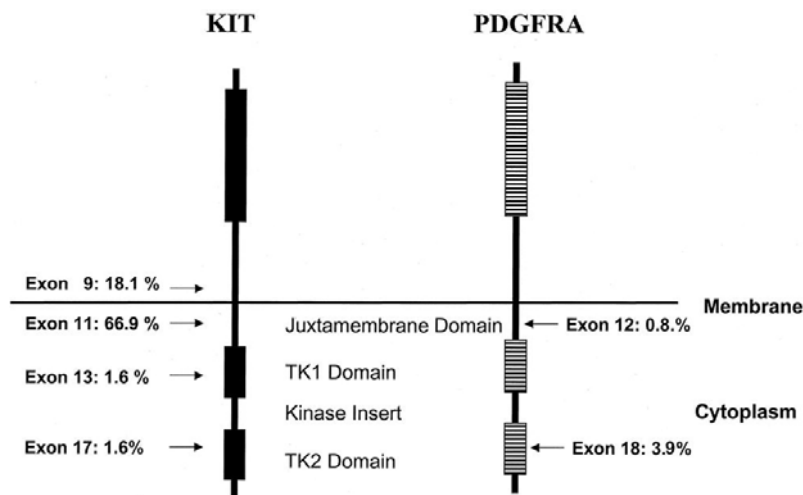
En els nostres casos es va obtenir un DNA de poca qualitat : dels 16 casos totals: en 4 no es va amplificar cap fragment (24%), en 7 es va amplificar fragments de fins a 100 parells de bases (47%) i en 5 es van amplificar fragments de fins a 200 parells de bases (29%).



En aquest gel s'exemplifica un gel control en el que cada pouet representa el resultat de la PCR control d'un cas. Com observem en molts dels casos sols s'obté l'amplificació de fins a 100 parells de bases. A la part esquerra del gel es situa una mostra "ladder" que és el referent per determinar la longitud en parells de bases de les bandes (producte amplificat).

Després de l'extracció de DNA de cada cas es va realitzar l'**amplificació** dels exons 9,11,13, 17 de KIT i dels 12 i 18 de PDGFRA. Les condicions de la PCR es detallen en la Taula 1 i els primers que es van utilitzar en la PCR en la Taula 2.

En el nostre estudi ens vam centrar en l'anàlisi mutacional dels dominis juxtamembrana i catalítics de KIT i PDGFRA perquè són els més freqüentment mutats en GIST.<sup>25,106 13</sup>



**Figura.5.3.2.** En aquest esquema es representa de forma esquemàtica l'estructura de KIT i PDGFRA amb els seus diferents dominis. Es troba anotat en percentatge els dominis on s'han descrit les mutacions amb guany de funció en el GIST. 03 J Clin Oncol Heinrich et al

Taula 1: condicions de la PCR pels exons de KIT i de PDGFRA.

	<b>KIT: exons 9,11,13,17</b>	<b>PDGFRA: exons 11,12,17,18</b>
<b>Components de la solució de PCR per cada cas (25 µl)</b>	15,3 µl d'aigua destilada 2,5 µl Buffer 2(MgCl2) 5 µl 1microM dNTP 0,5 µl PRIMER Forward 100 microM 0,5 µl PRIMER Reverse 100 microM 0,2 µl Taq polimerase	17,3 µl d'aigua destilada 2,5 µl Buffer 1,5 µl MgCl2 0,5 µl 10microM dNTP 1 µl PRIMER Forward 10 microM 1 µl PRIMER Reverse 10 microM 0,2 µl Taq GOLD polimerase
<b>Condicions de la PCR (Termociclador)</b>	Desnaturalització inicial a 95°C 10 min seguida per 40 cicles: ( 95°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min ) i un pas final d'extensió de 10 min 72°C.	Desnaturalització inicial a 95°C 10 min seguida per 40 cicles: ( 95°C 30'', 55°C 30'', 72°C 30'' ) i un pas final d'extensió de 10 min 72°C.

Taula 2: Llistat de primers utilitzats per la PCR dels exons 9,11,13 and 17 de KIT i els exons 11,12, 17 i 18 de PDGFRA

Exó	Primers	Seqüències dels primers 5´ - 3´
Kit 9	Ex9 F	TCCTAGAGTAAGCCAGGGCTT
	Ex 9 R	GCCTAAACATCCCCTTAAATTT
Kit 11	Ex 11 F	CCAGAGTGCTCTAATGACTG
	Ex 11 R	AGCCCCTGTTTCATACTGAC
Kit 13	Ex 13 F	GCTTGACATCAGTTTGCCAG
	Ex 13 R	AAAGGCAGCTTGGACACGGCTTTA
Kit 17	Ex 17 F	GTTTTCTTTTCTCCTCCAACCTAATA
	Ex 17 R	TTGAAACTAAAAATCCTTTGCAGGAC
PDGFRA 11	Ex 11F	CATTGTGCCTCTCTCTTTGTCA
	Ex 11R	GAGAAAATATCTACCTGTTTCCAAATGA
PDGFRA 12	Ex 12 F	ACCTGTCCTGGTCATTTATAGAAACC
	Ex 12 R	CTTACCAAGCACTAGTCCATCTCTTG
PDGFRA 17	Ex 17 F	ACCAATACATTTAATTTCTTTTCTGCAG
	Ex 17 R	TTGAACTTACATTTTTTGAAGCCAA
PDGFRA 18	Ex 18 F	AGTCATTCTTCTTTTCCATGCA
	Ex 18 R	TGGACGTACTGCCTTTTCG

Després de la PCR es va procedir a la **purificació** dels seus productes amb el "PCR purification KIT" (Marligen Bioscience nº catàleg 11458-015).

Posteriorment es va fer dos **PCR de seqüenciació** per cada cas i exó amplificat (una amb el primer Forward i l'altra amb el Reverse) utilitzant el "BigDye Terminator" (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) i els mateixos primers que la PCR inicial aquest cop amb una concentració 10 microM pels primers dels exons de KIT i a 2,5 microM pels primers dels exons de PDGFRA.

Els productes de la PCR de seqüenciació es van **precipitar** utilitzant EDTA i etanol i es van **analitzar amb l'ABI Prism 310 sequence analyzer** (Applied Biosystems)

Es va **obtenir així una seqüència** per cada exó i per cada cas amplificat en sentit forward i reverse. Aquesta seqüència es va **comparar amb la seqüència correcta extreta de la base de dades de la web del National Center for Biotechnology Information (NCBI)** utilitzant la funció "NCBI Standard Nucleotide Blast Search" "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide>

Finalment comentar que la PCR no va aconseguir amplificacions en la majoria dels casos per la mala qualitat del DNA extret.

Recordem que en un 71% dels casos de la nostra serie la qualitat del DNA obtinguda fou dolenta (no amplificant-se cap fragment (24%) o sols fragments de fins a 100 parells de bases (47%) en la PCR control).

A més a més, cal tenir en compte que els primers utilitzats estaven dissenyats per detectar fragments d'entre 100 i 200 parells de bases. Aquest fet juntament amb la mala qualitat del DNA dels casos justifica que no es poguessin amplificar ni analitzar la seqüència de la majoria dels casos.

Davant aquesta situació i per tal d'analitzar tots els casos ens vam plantejar comprar nous primers dissenyats per detectar fragments més petits.

Donat que en els casos en que es va poder amplificar i analitzar la seqüència no vam detectar mutacions, vam decidir no proseguir amb l'estudi de tots els casos.

# 6. RESULTATS

## 6.- RESULTATS

### 6.1.- EXPRESSIÓ DE KIT EN TUMORS DE CÈL·ULES RENALS

En l'estudi d'expressió immunohistoquímica de KIT en tumors de cèl·lules renals es va observar positivitat en un alt percentatge de **Carcinomes Cromòfobs (ChRCC) (88%)** i **Oncocitomes (RO) (71%)** essent el reste de subtipus de tumors renals estudiats Carcinoma renal de cèl·lula clara (CRCC) i papil·lar (PRCC) ) negatius per aquest marcador (Figura 6.1.2)

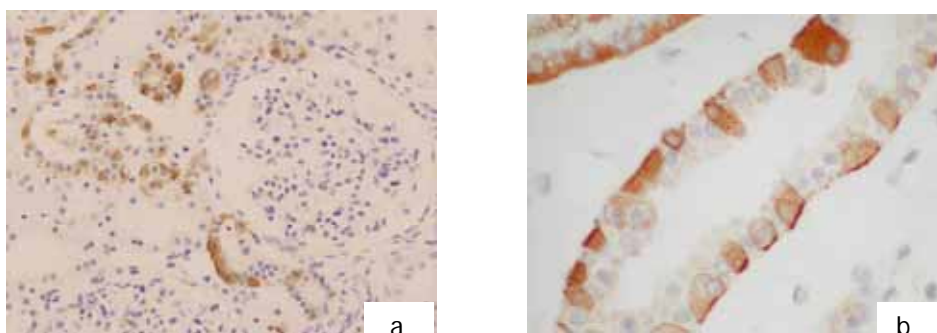
No es van observar diferències rellevants pel que fa al percentatge de casos positius en la variant clàssica (91%) del Carcinoma Cromòfob respecte a la variant eosinòfila (83,3%)

En la majoria de casos tal i com es troba indicat en la taula 6.1. l'extensió de l'expressió fou de caràcter **difús** i en tots ells el patró d'expressió fou de **membrana**.

	No casos + (%)	Extensió focal No casos (%)	Extensió moderada No casos (%)	Extensió difusa No casos (%)
<b>Carcinoma Cromòfob</b>	22/25 <b>(88%)</b>	2/22 (9,1%)	2/22 (9,1 %)	18/22 <b>(81,8%)</b>
<b>Oncocitoma</b>	10/14 <b>(71%)</b>	4/10 (40%)	0/10 (0%)	6/10 <b>(60%)</b>
<b>Carcinoma de Cèl·lula Clara</b>	0/29 <b>(0%)</b>	0	0	0
<b>Carcinoma Papil·lar</b>	0/10 <b>(0%)</b>	0	0	0

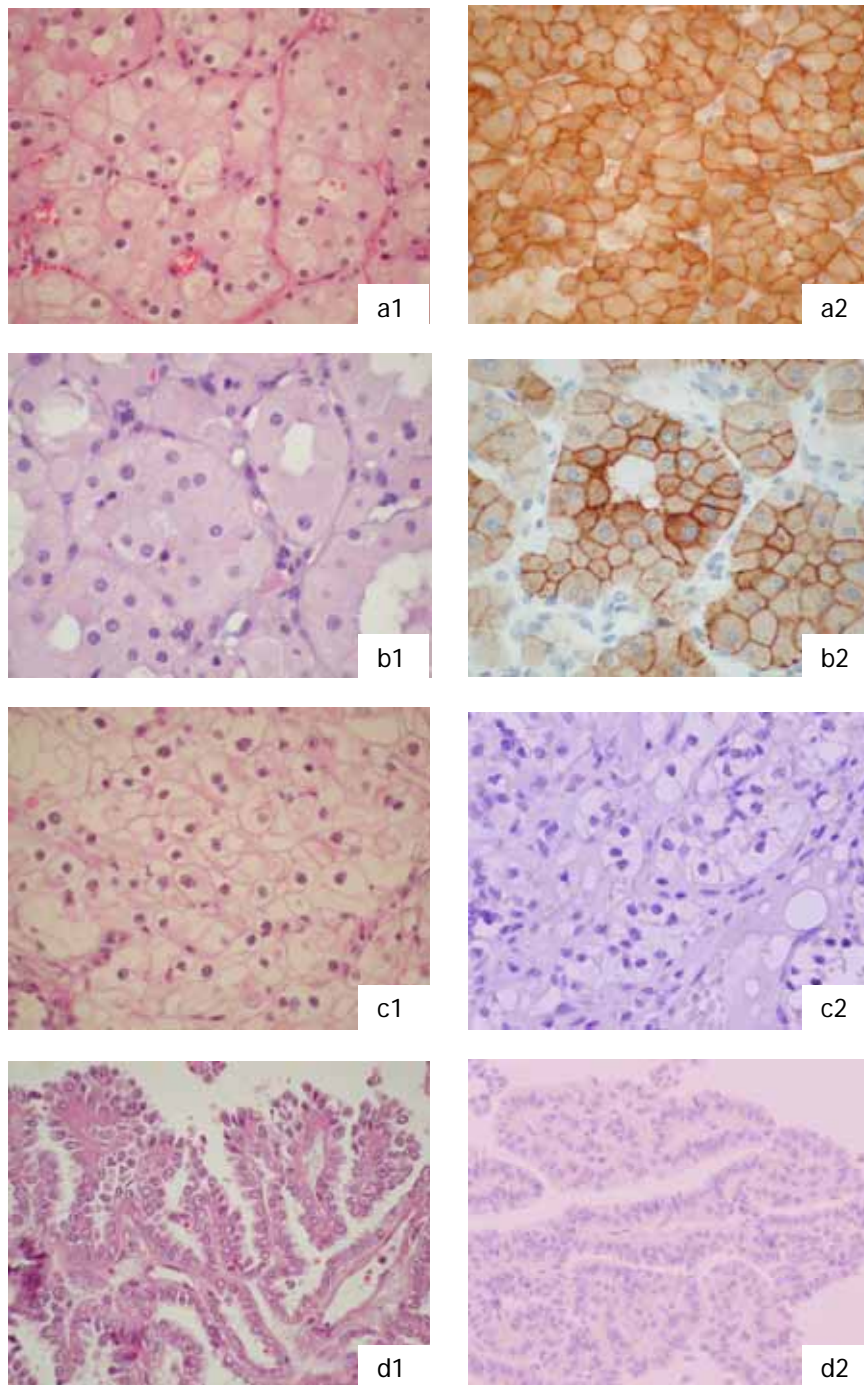
**Taula 6.1.** Expressió de KIT en diferents subtipus de Tumors de cèl·lules renals segons l'extensió de la positivitat.

Pel que fa al **parènquima renal** no-tumoral, l'expressió de KIT es va observar en el citoplasma d'algunes cèl·lules dels túbuls presentant de forma ocasional un reforç basal de membrana. Els glomèruls van resultar negatius per aquest marcador. (Figura 6.1.1).



**Figura 6.1.1.** Aquestes imatges il·lustren l'expressió de KIT en ronyó normal (a 200X, b 400X).





**Figura 6.1.2.** Aquestes imatges il·lustren l'expressió de KIT difusa i de membrana en un Carcinoma renal cromòfob (x200) (a1:H-E i a2:KIT) i un Oncocitoma renal (x400) (b1:H-E i b2:KIT). També es representa la negativitat per KIT en un cas de Carcinoma renal de cèl.lula Clara(400x) (c1:H-E i c2:KIT) i en un Carcinoma renal Papil·lar (200x) (d1:H-E i d2:KIT).



A.Petit, M.Castillo, M.Santos, B.Mellado, J.B. Alcover, C.Mallofré  
**“KIT expression in Chromophobe Renal Cell Carcinoma:  
Comparative Immunohistochemical Analysis of KIT Expression  
in Different Renal Cell Neoplasms.”**  
American Journal of Surgical Pathology 2004; 28: 676-678

## ORIGINAL ARTICLE

## KIT Expression in Chromophobe Renal Cell Carcinoma

### *Comparative Immunohistochemical Analysis of KIT Expression in Different Renal Cell Neoplasms*

*Anna Petit, MD,\* Mireia Castillo, MD,\* Mónica Santos, MD,\* Begoña Mellado, MD,†  
Joan B. Alcover, MD,‡ and Carme Mallofre´, MD\**

**Abstract:** The overexpression of c-Kit in chromophobe renal cell carcinoma (ChRCC) has been described by comparative gene expression analyses and has been proposed as a possible specific hallmark of this neoplasm. The aim of our study was to establish its immunohistochemical expression in a large series of ChRCC and to compare it with other renal neoplasms. In our study, immunohistochemical characterization of KIT was performed in 87 renal neoplasms including 25 cases of ChRCC, 13 cases of renal oncocytoma, and 39 renal cell carcinomas (21 cases of conventional RCC [CRCC], 8 cases of CRCC with granular cell differentiation, and 10 cases of papillary RCC [PRCC]). Eighty-eight percent ChRCC and 71% oncocytomas showed immunohistochemical expression of KIT, while the other types of RCC studied were all negative. The meaning of immunohistochemical expression of KIT in ChRCC and oncocytomas is still unknown, but its immunohistochemical staining appears to be useful in distinguishing ChRCC from PRCC, CRCC, and its granular cell variant. Moreover, our findings support current models that consider that there is a histopathogenic relationship between oncocytoma and ChRCC. Finally, it should be determined whether KIT plays a role in the tumorigenesis of ChRCC and oncocytoma and whether targeted therapy with STI-571, an inhibitor of KIT, could be effective in exceptional cases of ChRCC with metastatic extension or recurrence.

**Key Words:** KIT, chromophobe renal cell carcinoma, renal cell carcinoma

(*Am J Surg Pathol* 2004;28:676–678)

From the Departments of \*Pathology, †Oncology, and ‡Urology, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

This work has been partly supported by a grant of the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (PI020519).

Reprints: Carme Mallofre´, MD, Department d'Anatomia Patològica, Hospital Clínic de Barcelona, C/ Villarroel, 170, Escala 3, 5è pis, Barcelona 08036, Spain (e-mail: mallofre@clinic.ub.es).

Copyright © 2004 by Lippincott Williams & Wilkins

**C**hromophobe renal cell carcinoma (ChRCC) is a type of malignant epithelial tumor of renal parenchyma that accounts for 5% of malignant renal neoplasms. It was first described by Thoenes et al in 1985, and it has specific morphologic, immunohistochemical, genetic, and ultrastructural features<sup>14,21,22</sup>. Although many genetic alterations have been described<sup>12,15,19</sup> no oncogenes or tumor suppressor genes have been correlated with the tumorigenesis of ChRCC. Recently, a study based on the analysis of gene expression profiles by oligonucleotide arrays on different types of renal cell carcinomas (RCC) reported the overexpression of KIT in ChCCR as a distinctive hallmark of this variant of RCC since it was found up-regulated in the ChRCC cases but not in the conventional RCC (CRCC) and papillary RCC (PRCC) cases analyzed.<sup>28</sup> This study also demonstrated immunohistochemically the KIT gene product on the tumor cell membrane of the three cases of ChRCC considered.<sup>28</sup>

Based on these results, we found it interesting to contrast these data with the immunohistochemical analysis of KIT expression in a larger series of cases of ChRCC and also to compare these results with the immunohistochemical expression of KIT in other types of renal cell tumors, such as CRCC, CRCC with granular cell differentiation, PRCC, and oncocytoma.

## MATERIALS AND METHODS

The study group consisted of 25 cases of ChRCC (3 of which exhibited areas with sarcomatoid differentiation), 14 cases of renal oncocytoma and 39 RCC including 21 cases of CRCC, 8 cases of CRCC with granular cell differentiation, and 10 cases of PRCC. All cases were retrieved from the files of our Department of Pathology and the diagnoses reviewed according to the Heidelberg Classification of Renal Cell Tumors.<sup>13</sup> Among CRCC, cases with different Furhman grades were included in the study: 3 cases corresponded to grade 1/4, 6 to grade 2/4, 7 to grade 3/4, and 5 to grade 4/4. Cases of ChRCC were subclassified into classic variant and eosinophilic variant.<sup>22</sup>

Immunohistochemical analysis was performed on 5- $\mu$ m-thick, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections of each case with the EnVision detection system (automatic processor TechMate-500, DAKO) using a polyclonal antibody directed against KIT (Polyclonal Rabbit Anti-human c-Kit, A 4502 Affinity isolated, DakoCytomation Denmark A/S) at a dilution of 1:100, which is currently used to detect the 145-kDa c-kit product in gastrointestinal stromal tumors in our institution. For heat-induced epitope retrieval, the sections were subject to 100 mM EDTA buffer (pH 8.0) in a pressure cooker for 2 minutes.

KIT expression was visually estimated as the approximate percentage of positive stained tumor cells in a selected tumor section of each case. The extent of immunoreactivity was categorized as focal (<25% positivity of tumor cells), moderate (25%–50% positivity of tumor cells), and diffuse (>50% positivity of tumor cells). Only membranous staining was considered positive, although cytoplasmic and/or nuclear staining was also recorded.

## RESULTS

Twenty-two of the 25 cases of ChRCC were immunohistochemically positive for KIT (88%), all of them exhibiting a membranous staining profile. Of the 22 cases that were KIT positive, 2 (9.09%) showed focal expression, 2 (9.09%) moderate expression, and 18 (81.8%) diffuse expression (Fig. 1a). Ninety-one percent (11 of 12) of ChRCC classic variant cases and 83.3% (10 of 12) of ChRCC eosinophilic variant cases presented KIT immunostaining (Fig. 1b). All 3 cases of ChRCC with sarcomatoid differentiation showed diffuse membranous immunostaining for KIT in the areas with ChRCC features. Moreover, areas of sarcomatoid differentiation exhibited cytoplasmic positivity in 2 cases and nuclear positivity in the other case. Ten of 14 cases (71%) of renal oncocytomas also showed immunohistochemical expression of KIT with a

membranous pattern (Fig. 1c). Of these cases, 4 (40%) showed focal expression and 6 (60%) showed diffuse expression. None of the other 39 RCCs exhibited immunopositivity for KIT. In nonneoplastic kidney tissue adjacent to the tumor lesion, KIT expression was detected in the cytoplasm of some cells of the renal tubules, occasionally presenting a reinforcement of positivity in the basal membrane of the cell.

## DISCUSSION

Recently, there has been an increasing interest in the study of c-kit expression on different neoplasms due to the therapeutical introduction of STI-571, an inhibitor of the tyrosine kinases bcr-abl,<sup>7</sup> c-kit,<sup>39</sup> and PDGFR<sup>3</sup> that has been shown to be an effective targeted therapy against chronic myelogenous leukemia<sup>5,26</sup> and gastrointestinal stromal tumor.

C-kit is a proto-oncogene located in the long arm of chromosome 4 that encodes a transmembrane receptor with intrinsic tyrosine-specific protein kinase activity in its intracellular domain.<sup>29</sup> The ligand for c-kit is stem cell factor.<sup>11,27</sup> The c-kit receptor is normally expressed in mast cells, skin basal cells and melanocytes, breast epithelium, germ cells,<sup>25</sup> and interstitial cells of Cajal.<sup>23</sup> This protein has also been described

as being expressed in several neoplasms but only in mast cell disease,<sup>8</sup> germ cell tumors,<sup>24</sup> chronic myeloid leukemia,<sup>2</sup> and gastrointestinal stromal tumor,<sup>10</sup> the constitutive expression of KIT due to gain of function mutations in its proto-oncogene has been related to the growth and progression of the disease.

Recently, a study based on comparative gene expression profiles by oligonucleotide arrays on different RCCs reported KIT up-regulation in the 3 cases of ChRCC analyzed and demonstrated KIT immunopositivity on the membrane of the neoplastic cells.<sup>28</sup>

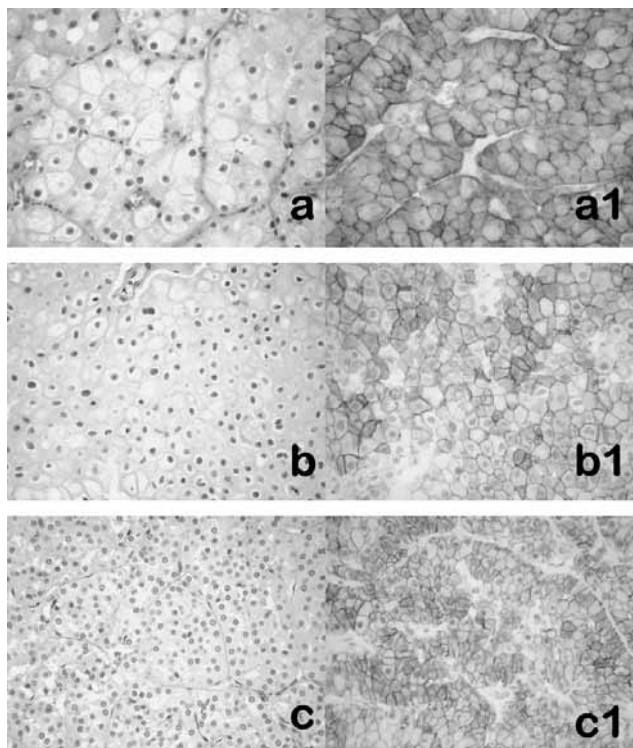
These data were contrasted in our study of 25 cases of ChRCC showing a positive immunohistochemical expression of KIT in 88% of cases. All of these cases exhibited a membranous staining profile of KIT according to the characteristic transmembrane location of this protein. Most of them (88.8%) presented diffuse immunostaining of more than 50% of neoplastic cells. Nuclear and cytoplasmic staining was observed in some cases, although its significance is still unknown.

It was also found that KIT expression was specific of ChRCC regarding other types of RCCs, as was pointed out in the study of Yamazaki et al.<sup>28</sup> None of the 21 cases of CRCC, 8 cases of CRCC with granular cell differentiation, and 10 cases of PRCC considered in our study showed immunostaining for KIT.

These results led us to consider KIT as a useful marker in the differential diagnosis of different RCCs, especially in cases of unclear diagnosis such as CRCC versus classic variant of ChRCC, and CRCC with granular cell differentiation versus eosinophilic variant of ChRCC. It is important to be able to recognize ChRCC, since this neoplasm has a more favorable prognosis than CRCC.<sup>1,4</sup> However, immunostaining for KIT is not appropriate to distinguish oncocytoma from eosinophilic variant of ChRCC because both renal tumors show immunopositivity for KIT in a high percentage of cases, 71% and 88%, respectively.

In the cases of renal oncocytoma, KIT immunohistochemical profile was also membranous with diffuse expression in 60% of cases. This finding supports current models that consider ChRCC and oncocytoma to have a histopathogenic relationship and to originate in cells of the collecting duct.<sup>16,20,30</sup> It is still to be established whether KIT immunopositivity plays a role in the tumorigenesis of ChRCC and oncocytoma and whether that expression corresponds to a constitutive activation of KIT receptor.

ChRCC is associated with a more favorable clinical prognosis than other subtypes of RCC,<sup>4</sup> but cases of ChRCC with aggressive behavior have been reported.<sup>18</sup> In this respect, the positivity of KIT in ChRCC brings up the possible effectiveness of targeted therapy using STI-571. For this reason, future studies should aim at determining whether KIT expression is involved in the pathogenesis of ChRCC and whether its inhibition by STI-571 could be useful to control cell proliferation in cases of ChRCC.



**FIGURE 1.** Immunohistochemical expression of KIT in (a) chromophobe renal cell carcinoma classic variant (hematoxylin and eosin), (b) chromophobe renal cell carcinoma eosinophilic variant, and (c) oncocytoma. All these cases (a1, b1, c1) show diffuse membrane expression of KIT. a–c: Hematoxylin and eosin, original magnification X400. a1, b1, c1: Polyclonal rabbit anti-human KIT with hematoxylin counterstain, original magnification X400.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Margarita Mainar and Elena Gonzalvo for their technical support.

#### REFERENCES

1. Akhtar M, Kardar H, Linjawi T, et al. Chromophobe cell carcinoma of the kidney: a clinicopathologic study of 21 cases. *Am J Surg Pathol.* 1995;1245–1256.
2. Beghini A, Peterlongo P, Ripamonti CB, et al. C-kit mutations in core binding factor leukemias. *Blood.* 2000;95:726–727.
3. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 295:139–145.
4. Chevillet JC, Lohse CM, Zincke H, et al. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:612–624.
5. Dagher R, Cohen M, Williams G, et al. Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res.* 2002;8:3034–3038.
6. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001;344:1031–1037.
7. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996;2:561–566.
8. Ferger F, Ribadeau Dumas A, Leriche L, et al. Kit and c-kit mutations in mastocytosis: a short overview with special reference to novel molecular and diagnostic concepts. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127:110–114.
9. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, et al. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood.* 2000;96:925–932.
10. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain of function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 1998;279:577–580.
11. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol.* 1994;55:1–96.
12. Kovacs A, Kovacs G. Low chromosome number in chromophobe renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 1992;3:267–268.
13. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol.* 1997;183:131–133.
14. Mathers ME, Pollock AM, Marsh C, et al. Cytokeratin 7: a useful adjunct in the diagnosis of chromophobe renal cell carcinoma.

*Histopathology*. 2002;40:563–567.

15. Nagy A, Wilhelm M, Sukosd F, et al. Somatic mitochondrial DNA mutations in human chromophobe renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;35:256–260.
16. Ortmann M, Vierbuchen M, Fisher R. Renal oncocytoma: lectin and immunohistochemical features indicating an origin from the collecting duct. *Virchows Arch B*. 1988;56:175–184.
17. Peggs K, Mackinnon S. Imatinib mesylate: the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348:1048–1050.
18. Renshaw A, Henske E, Loughlin K, et al. Aggressive variants of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer*. 1996;78:1756–1761.
19. Speicher MR, Schoell B, du Manoir S, et al. Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17 and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*. 1994;145:356–364.
20. Störkel S, Steart PV, Drenckhahn D, et al. The human chromophobe cell renal carcinoma: its probable relation to intercalated cells of the collecting duct. *Virchows Arch B*. 1989;56:237–245.
21. Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ. Human chromophobe cell renal carcinoma. *Virchows Arch B (Cell Pathol)*. 1985;48:207–217.
22. Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ, et al. Chromophobe cell renal carcinoma and its variants: a report on 32 cases. *J Pathol*. 1988;155:277–287.
23. Thomsen L, Robinson TL, Lee JC, et al. Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nat Med*. 1998;4:848–851.
24. Tian Q, Frierson HF Jr, Krystal GW, et al. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *Am J Pathol*. 1999;154:1643–1647.
25. Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K, et al. Preferential localization of c-kit product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch*. 1994;424:135–141.
26. Van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, et al. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet*. 2001;358:1421–1423.
27. Vliagoftis H, Worobec AS, Metcalfe DD. The protooncogene c-kit and c-kit ligand in human disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100: 435–440.
28. Yamazaki K, Sakamoto M, Ohta T, et al. Overexpression of KIT in chromophobe renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2003;22:847–852.
29. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*. 1987;6:3341–3351.
30. Young A, Amin M, Moreno C, et al. Expression profiling of renal epithelial neoplasms. *Am J Pathol*. 2001;158:1639–1651.

© 2004 Lippincott Williams & Wilkins

A.Petit, M. Castillo, B. Mellado, C. Mallofré.

**“c-KIT overexpression in Chromophobe Renal Cell Carcinoma is not associated with c-KIT mutation of exons 9 and 11”.**

Letter to the editor

American Journal of Surgical Pathology 2005, 29:1544-1545

## **c-Kit Overexpression in Chromophobe Renal Cell Carcinoma Is Not Associated With c-kit Mutation of Exons 9 and 11**

### **To the Editor:**

We have read with interest the original article on c-kit expression in chromophobe renal cell carcinoma (ChRCC) by Petit et al.<sup>3</sup> The authors present an immunohistochemical study of 25 cases of chromophobe renal cell carcinomas with a positivity rate of 88% and discuss the possibility of a targeted therapy with STI-571 (imatinib mesylate, [Gleevec]).

As the response to imatinib in GIST is associated with the kit mutational status<sup>2</sup> and aggressive behavior, we analyzed the exons 9 and 11 of the c-kit gene for possible mutations in 14 of 22 ChRCCs and 4 oncocytomas that showed a positive c-kit immunohistochemical staining with the polyclonal antibody A4502 (DAKO). Gene analysis was performed by direct sequencing according to Hirota et al.<sup>1</sup> None of the investigated tumors showed any mutations in exons 9 or 11 known to be relevant for targeted therapy with imatinib.

As the authors speculate the expression of c-kit antigen to be an immunohistochemical marker for a possible therapy, to date we do not see an option for a targeted therapy with imatinib. On the one hand, ChRCCs seldom show progression (aggressiveness); and on the other hand, according to our results, therapy relevant c-kit mutations of exon 9 and 11 could not be found.

Andrea Haitel, MD Martin Susani, MD Nikolaus Wick, MD Peter R. Mazal, MD Fritz Wrba, MD

Department of Clinical Pathology University of Vienna Vienna, Austria

### **REFERENCES**

1. Hirota S, Nishida T, Isozaki K, et al. Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J Pathol*. 2001;193:505–510.
2. Mechtersheimer G, Egerer G, Hensel M, et al. Gastrointestinal stromal tumors and their response to treatment with the tyrosine kinase inhibitor imatinib. *Virchows Arch*. 2004;444: 108–118.
3. Petit A, Castillo M, Santos M, et al. kit expression in chromophobe renal cell carcinoma: comparative immunohistochemical analysis of kit expression in different renal neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:676–678.



## **c-kit Overexpression in Chromophobe Renal Cell Carcinoma Is Not Associated With c-kit Mutation of Exons 9 and 11**

### **Authors' Reply:**

In response (AmJSurgPathol.2005;29:842) to the letter received from Haitel et al, we would like to make some comments.

Although the main topic of our article was the usefulness of KIT in the differential diagnosis of epithelial renal cell neoplasms as well as the support of a pathogenic relationship between of chromophobe renal cell carcinoma (ChRCC) and renal oncocytoma (RO),<sup>5</sup> We agree with Haitel et al about the poor relevance of considering Imatinib as a possible treatment of ChRCC provided that it is a neoplasm with good prognosis. However, cases with aggressive behavior have been documented.<sup>6</sup> On that respect, the results presented by Haitel et al and the ones published in a recent study by Pan et al<sup>4</sup> point out that the expression of KIT in ChRCC and also in RO is not associated with mutations of its gene. So we agree with them that at present there is no evidence to pose Imatinib as a target therapy for cases of ChRCC provided that the response to Imatinib seems to be associated not only with KIT expression but also with gain of function mutations of these protein.<sup>2,3</sup>

Recently, KIT expression has also been described in sarcomatoid renal cell carcinoma (SRCC) a high-grade transformation of different subtypes of renal cell carcinoma.<sup>1</sup> As this pattern of dedifferentiation is associated with poor prognosis due to its local aggressiveness and the absence of effective therapeutical options, we are currently analyzing kit mutational status in our series of SRCC. We expect that new studies would come out in the next future to elucidate the role of KIT not only in ChRCC and RO but also in SRCC

Anna Petit, MD Mireia Castillo, MD Begoña Mellado, MD Carme Mallofre,  
Hospital Clinic, Facultat de Medicina Anatomia Patològica Universitat Barcelona Barcelona, Spain

### **REFERENCES**

1. Castillo M, Petit A, Mellado B, et al. C-KIT expression in sarcomatoid renal cell carcinoma: potential therapy with Imatinib. *JUrol.* 2004; 171:2176–2180.
2. Duensing A, Heinrich MC, Fletcher CD, et al. Biology of gastrointestinal stromal tumors: KIT mutations and beyond. *CancerInvest.* 2004; 22:106–116.
3. Hirota S, Nishida T, Isozaki K, et al. Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *JPathol.* 2001;193:505–510.
4. Pan CC, Chen PC, Chiang H, et al. Over-expression of KIT (CD117) in chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *AmJClinPathol.* 2004;121:878–883.
5. Petit A, Castillo M, Santos M, et al. Kit expression in chromophobe renal cell carcinoma: comparative immunohistochemical analysis of kit expression in different renal neoplasms. *AmJSurgPathol.* 2004;28:676–678.
6. Renshaw A, Henske E, Loughlin K, et al. Aggressive variants of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer.* 1996;78:1756–1761.

2005LippincottWilliams&Wilkins

## 6.2.- EXPRESSIÓ DE PDGFR EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS.

En la següent taula es detallen les característiques clínico-patològiques de la sèrie de tumors renals en el que es va estudiar l'expressió de PDGFR (n=229)

<b>Gènere (%)</b>	
<b>Masculí</b>	<b>156 (68.1)</b>
Femení	73 (31.9)
Edat mitjana al diagnòstic (rang)	65.6 (26.5-88.6)
<b>Subtipus tumoral (%)</b>	
<b>Carcinoma renal de cèl·lula clara</b>	<b>113 (51)</b>
Carcinoma renal cromòfob	12 (5.3)
Carcinoma renal papil·lar T1	20 (9)
Carcinoma renal papil·lar T2	42 (19)
Oncocitoma real	28 (12.5)
Tumor mucinós tubular amb cèl. fusiformes	5 (2.2)
Carcinoma de conductes col·lectors (Bellini)	2 (1)
<b>pT (%)</b>	
pT1	123 (53.7)
pT2	37 (16.2)
pT3	65 (28.4)
pT4	4 (1.7)
<b>pN (%)</b>	
pN0	217 (94.8)
pN1	7 (3.1)
pN2	4 (1.7)
<b>Estadi (%)</b>	
I	118 (51.5)
II	36 (15.7)
III	52 (22.7)
IV	22 (9.6)
Mida tumoral mitjana en cm.(rang)	6 (1-25)
Pacients amb metàstasi al diagnòstic (%)	19 (8.3)
Pacients amb metàstasi durant el seguiment (%)	71 (31)
Pacients morts per la malaltia (%)	55 (24)
Mitjana de seguiment en mesos (rang)	56 (0-190)
Supervivència als 5 anys	74.3 %
Supervivència mitja en mesos(95% CI)	129 (117-142)

Per avaluar i representar els resultats de l'expressió de PDGFRA i PDGFRB en les cèl·lules tumorals vam considerar l' "score" (que té en compte extensió i intensitat de positivitat - veure apartat 5.2.4.) i que té tres categories d'expressió : absent (0), baixa (1), alta (2).

Per avaluar i representar els resultats de l'expressió de PDGFRB en la paret vascular vam considerar l'extensió de l'expressió en 3 categories: absent (0), focal (1) i difusa (2). ( veure apartat 5.2.4) No es representa l'expressió vascular de PDGFRA per no trobar-se present en cap dels casos estudiats.

Subtipus tumoral	PDGFRA cèl. tumorals				PDGFRB cèl. Tumorals				PDGFRB vascular			
	No casos (%)			p	No casos (%)			p	No casos (%)			p
0	1	2	0		1	2	0		1	2		
CRCC (n=113)	68 (62)	32 (29)	10 (9)	NA	91 (84)	13 (12)	5 (5)	NA	54 (50)	24 (22)	31 (28)	NA
PRCC t1 (n=12)	7 (64)	4 (36)	0	0.553	8 (80)	2 (20)	0	0.623	11 (100)	0	0	0.006 <sup>a</sup>
PRCC t2 (n=20)	15 (75)	4 (20)	1 (5)	0.522	15 (75)	5 (25)		0.209	16 (84)	2 (11)	1 (5)	0.018
ChRCC (n=42)	12 (30)	22 (55)	6 (15)	0.002 <sup>a</sup>	25 (63)	13 (33)	2 (5)	0.013	38 (95)	2 (5)	0	<0.001 <sup>a</sup>
OR (n=28)	17 (68)	7 (28)	1 (4)	0.677	15 (60)	8 (32)	2 (8)	0.029	21 (81)	5 (19)	0	0.004 <sup>a</sup>
TMFRCC (n=5)	1 (20)	4 (80)	0	0.055	1 (20)	4 (80)	0	0.0002 <sup>a</sup>	5 (100)	0	0	0.087
CDC (n=2)	1 (50)	1 (50)	0	0.772	2 (100)	0	0	0.821	2 (100)	0	0	0.368

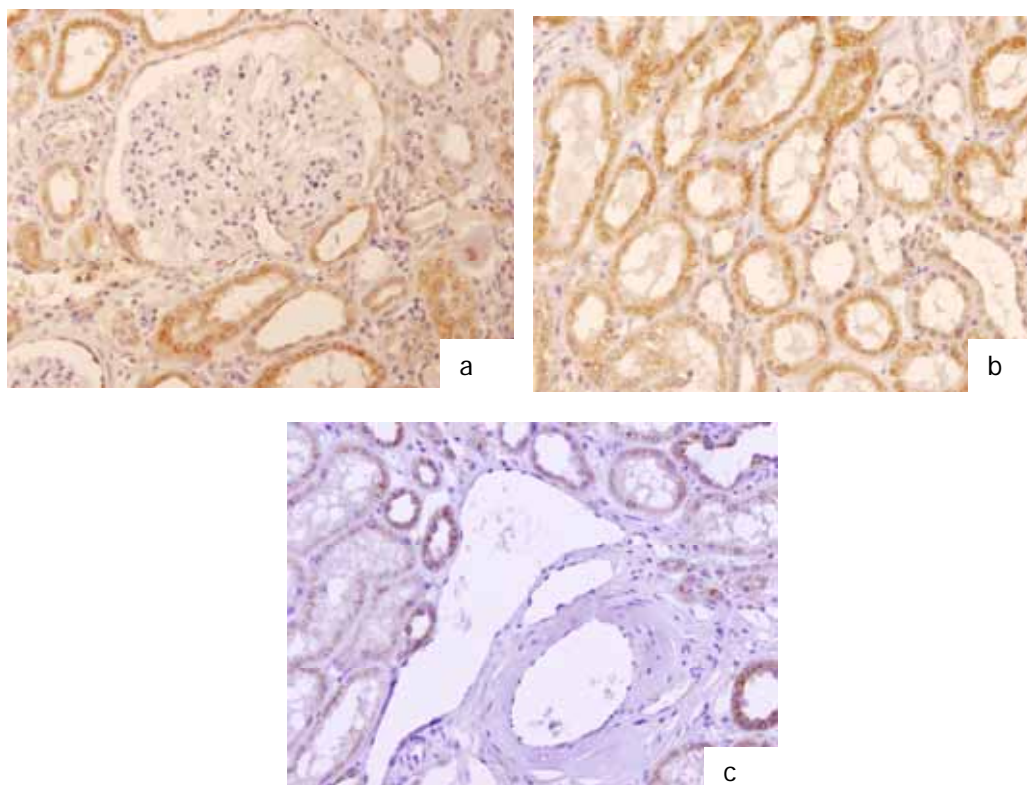
**Taula 6.2.1.** Expressió de PDGFRA i PDGFRB en les cèl·lules tumorals i PDGFRB en els vasos segons el subtipus de Tumor de cèl·lules renals. Es representa la significació estadística al comparar el resultat de l'expressió d'aquests marcadors en el Carcinoma renal de cèl·lula clara respecte als altres subtipus tumorals.

<sup>a</sup>Statistically significant once penalized by Bonferroni method. NA: not applicable

Abreviatures: CRCC(Carcinoma renal de cèl.lula clara), PRCC (Carcinoma renal papil.lar), ChRCC (Carcinoma renal cromòfob), RO (Oncocitoma renal), TMFRCC (Carcinoma renal tubular mucinós amb component fusiforme), CDC (Carcinoma dels conductes col.lectors o de Bellini), URCC(Carcinoma renal no-classificable)

En aquest estudi també es va avaluar l'expressió de PDGFRA en el ronyó normal.

Es va observar positivitat per PDGFRA de forma homogènia en els túbuls renals que es va categoritzar com intensitat forta i es va prendre com a referència per avaluar la intensitat d'expressió per aquest marcador en les cèl·lules tumorals. Les cèl·lules del glomèrul i de la paret de vènules, arterioles i capil·lars van ser negatius per PDGFRA (Veure Figura 6.2.1.).



**Figura 6.2.1.** Expressió de PDGFRA en el ronyó normal (a. 100X, b. 200X c. 200X )

Pel que fa a l'expressió PDGFRA en les cèl·lules tumorals, la majoria de casos (62%) de Carcinoma renal de cèl·lula clara, es van considerar negatius. Respecte als casos positius, una elevada proporció van presentar una expressió baixa (29/38, 76%). (Taula 6.2.1.)

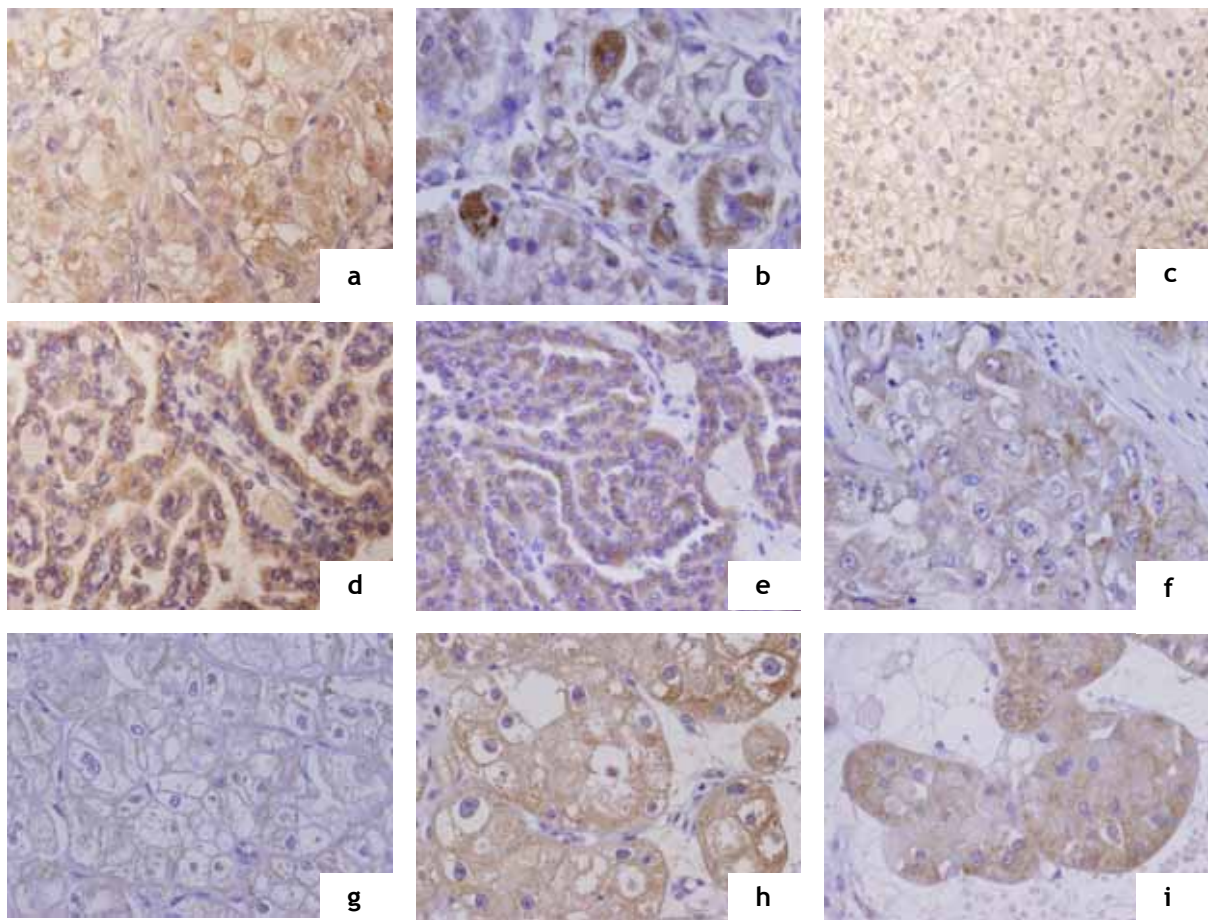
Aquest mateix patró d'expressió de PDGFRA es va observar en el Carcinoma papil·lar tipus 1 i 2 i en l'Oncocitoma Renal. En aquests subtipus un alt percentatge de casos foren negatius (64%, 75%, 68% respectivament) i en els casos positius el patró d'expressió baix (score 1) fou el predominant (100%, 80%, 87% respectivament).

Per contra, en el Carcinoma Cromòfob la majoria dels casos ( 70% ) foren positius amb un clar predomini de l'score 1 o expressió baixa (22/26, 84%). Aquests resultats foren significativament diferents respecte els obtinguts en el Carcinoma renal de cèl·lula clara (p 0.002) .

Un 80% dels Carcinomes tubulars mucinosos amb cèl·lules fusiformes i un 50% dels Carcinomes de Bellini foren positius amb score 1. Tot i això els resultats respecte aquests dos subtipus s'han d'interpretar amb cautela considerant l'escàs nombre de casos estudiats (5 i 2 respectivament).

El patró d'expressió en tots els subtipus tumorals fou majoritàriament citoplasmàtic observant-se reforç perifèric en alguns casos de forma focal.

L'expressió de PDGFRA vascular no està contemplada en la Taula 6.2. ja que cap cas de la serie va presentar positivitat vascular per aquest marcador.

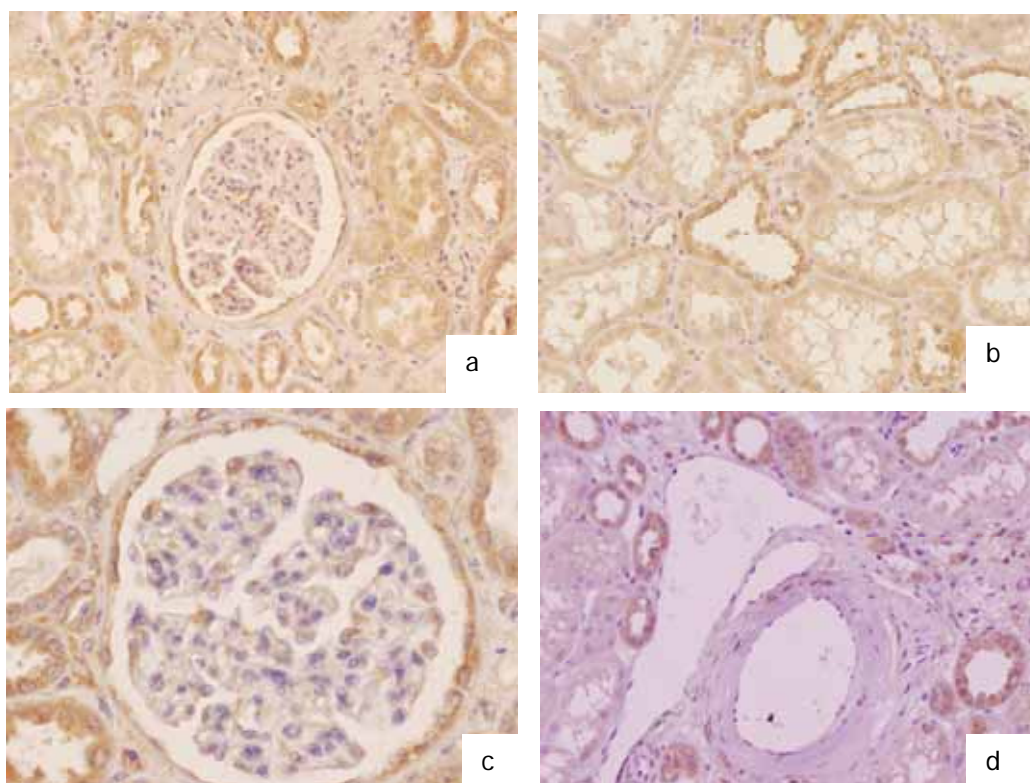


**Figura 6.2.2. Expressió de PDGFRA en els diferents subtipus de Tumors de cèl·lules renals.** (a) CRCC amb score 1-baix (positivitat difusa i dèbil) amb patró citoplasmàtic 400X (b) CRCC amb score 2-alt (positivitat moderada i forta) amb patró citoplasmàtic 400X, (c) CRCC etiquetat com score 0-negatiu 200X; (d) PRCC amb score 1-baix (positivitat difusa i dèbil) 400X, (e) TMFRCC amb score 1-baix (positivitat difusa i dèbil) 400X, (f) NCRCC amb score 1-baix (positivitat difusa i dèbil) 400X; (g) ChRCC amb score 0- negatiu X400, (h) ChRCC amb score 1-baix (positivitat difusa i dèbil) 400X, (i) OR amb score 1 (positivitat difusa i dèbil) 400X.

Abreviatures: CRCC(Carcinoma renal de cèl.lula clara), PRCC (Carcinoma renal papil.lar), ChRCC (Carcinoma renal cromòfob), RO (Oncocitoma renal), TMFRCC (Carcinoma renal tubular mucinós amb component fusiforme), CDC (Carcinoma dels conductes col.lectors o de Bellini), URCC(Carcinoma renal no-classificable)



En el parènquima renal normal es va observar expressió de PDGFRB en els **túbuls** amb una intensitat d'expressió **heterogènea**. Alguns túbuls presentaren una intensitat **dèbil** i altres **forta**. Algunes **cèl·lules de la càpsula de Bowman** i algunes **cèl·lules del mesangi glomerular** també van mostrar positivitat per PDGFRB. Pel que fa a l'expressió de PDGFRB en la paret vascular únicament es va observar de forma ocasional positivitat en el citoplasma de les cèl·lules musculars d'algunes arterioles. Les vènules i els capil·lars no van presentar expressió de PDGFRB.



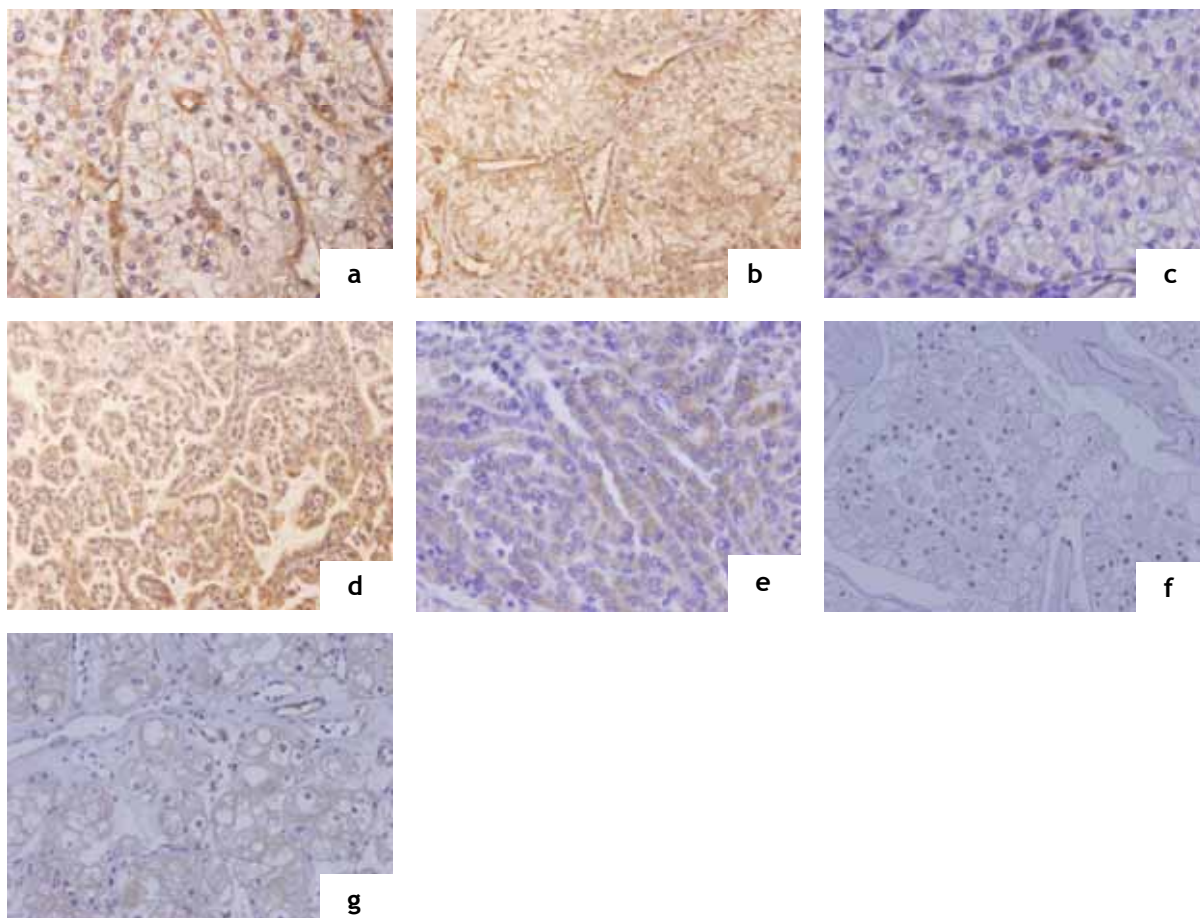
**Figura 6.2.3.** Expressió de PDGFRB en el ronyó normal. (a. 200X, b. 200X, c. 400X, d.200X)

Respecte a l'**expressió de PDGFRB en les cèl·lules tumorals**, va ser negativa en un alt percentatge de casos en el Carcinoma renal de cèl·lula clara, Carcinoma papil·lar tipus 1 i 2, Carcinoma Cromòfob, Oncocitoma renal i Carcinoma de Bellini. Únicament el Carcinoma tubular mucinós amb cèl·lules fusiformes va mostrar un alt percentatge de casos positius (80%) la majoria amb score 1. Precisament l'expressió en aquest subtipus tumoral fou significativament diferent respecte al Carcinoma de cèl·lula clara ( $p = 0,0002$ ). Com hem comentat anteriorment, els resultats derivats de l'estudi del Carcinoma tubular mucinós amb cèl·lules fusiformes s'han d'interpretar amb cautela per l'escàs nombre de casos estudiats (5 en nombre).

A diferència de PDGFRA, si que es va observar **expressió de PDGFRB en la paret vascular**, sobretot en el Carcinoma renal de cèl·lula clara. De fet, un 50% dels casos amb aquest subtipus histològic van presentar positivitat vascular (focal en el 44% i difusa en el 56% dels casos).

Per contra, no es va detectar expressió de PDGFRB vascular en la majoria de casos dels altres subtipus tumorals.

La diferència entre l'expressió vascular de PDGFRB en el Carcinoma renal de cèl·lula clara respecte el reste de subtipus va resultar ser significativa, a excepció del Carcinoma tubular mucinós i el Carcinoma de Bellini per l'escàs nombre de casos contemplats.



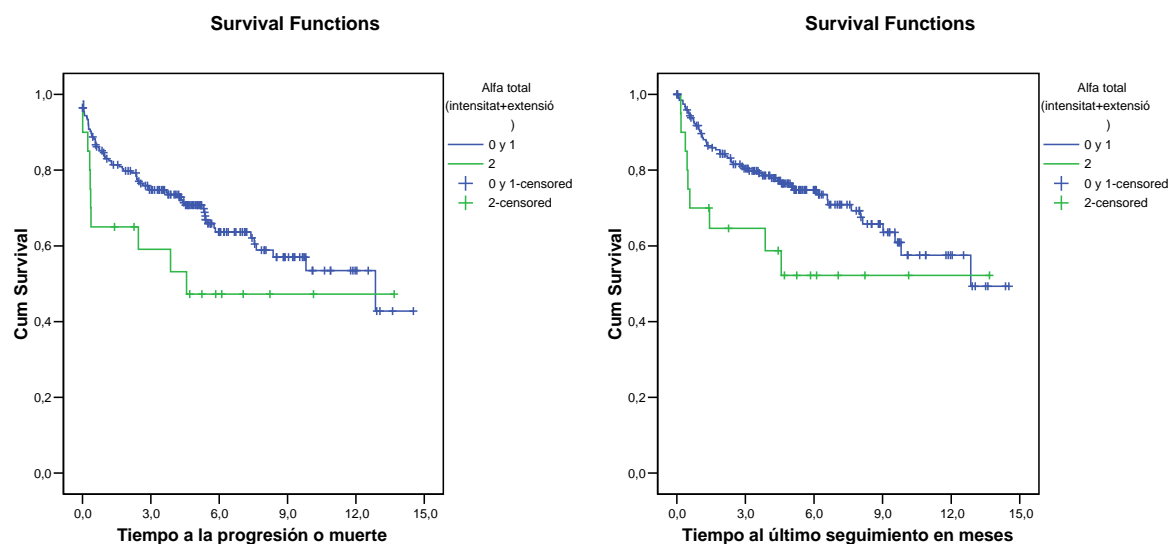
**Figura 6.2.4. Expressió de PDGFRB en els diferents subtipus de tumors de cèl·lules renals.**

(a) CRCC amb absència d'expressió en les cèl·lules tumorals i positivitat difusa en els vasos 400X, (b) CRCC amb expressió baixa-score 1 (difusa i dèbil) en les cèl·lules tumorals i positivitat difusa en els vasos 200X, (c) CRCC amb absència d'expressió en les cèl·lules tumorals i positivitat difusa en els vasos 400X, (d) PRCC 200X i (e) TMFRCC 400X amb score 1 en les cèl·lules tumorals ( difusa i dèbil), (f) ChRCC amb score 0 200X i (g) Oncocitoma amb score 1 (moderada i dèbil) 400X (g).

Abreviatures: CRCC(Carcinoma renal de cèl.lula clara), PRCC (Carcinoma renal papil.lar), ChRCC (Carcinoma renal cromòfob), RO (Oncocitoma renal), TMFRCC (Carcinoma renal tubular mucinós amb component fusiforme), CDC (Carcinoma dels conductes col.lectors o de Bellini), URCC(Carcinoma renal no-classificable)

Pel que fa a l'estudi estadístic de supervivència (Progression free survival i Overall survival) **partint de tota la serie de tumors renals** estudiats; no es van observar diferències estadísticament significatives; considerant l'expressió **PDGFRA i PDGFRB en les cèl·lules tumorals**.

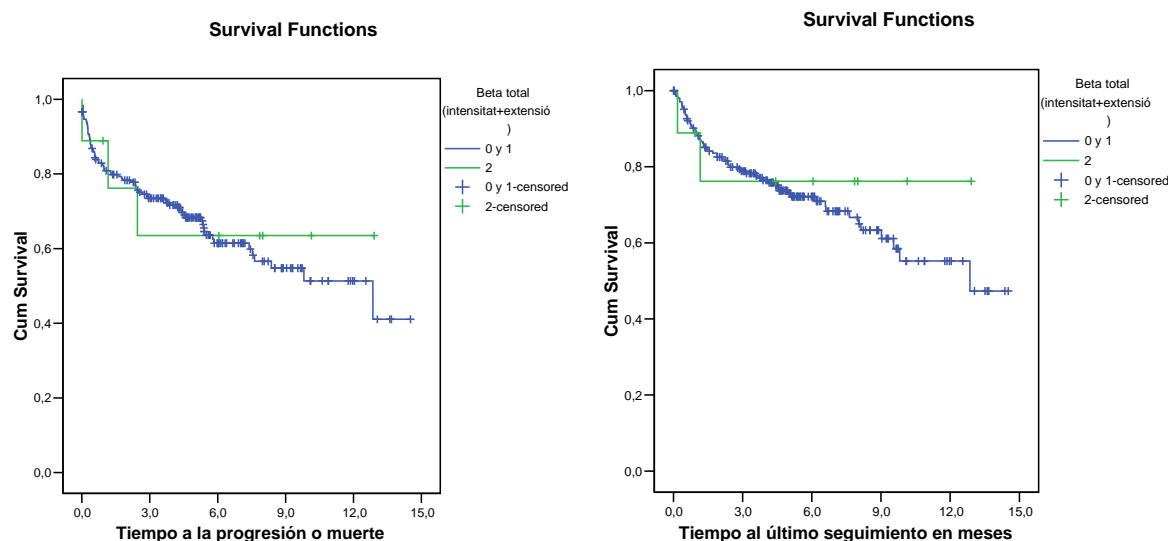
Puntualitzar que per fer l'estudi estadístic, l'expressió de PDGFRA i PDGFRB en les cèl·lules tumorals amb score negatiu (0) i baix (1) es va agrupar en una única categoria. El motiu d'aquesta consideració, fou una corba de supervivència molt similar per aquestes dos categories (negatiu, baix).



**Fig 6.2.5.**

Supervivència sense progressió de malaltia segons **PDGFRA** en cèl. tumorals  
p=0.1138

Supervivència global segons **PDGFRA** en cèl. tumorals  
p=0.0596



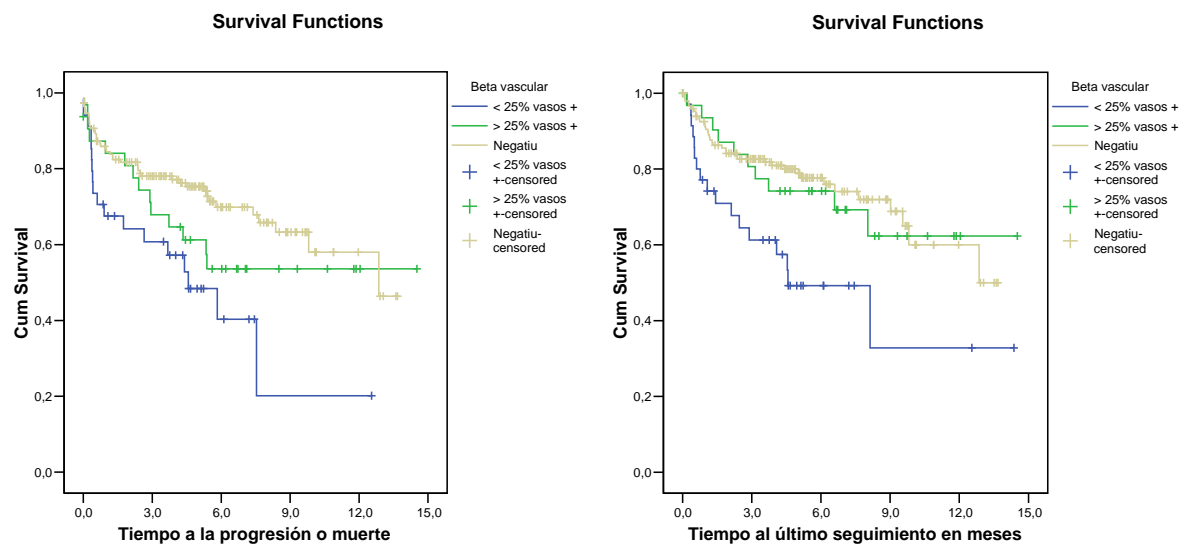
**Fig 6.2.6.**

Supervivència sense progressió de malaltia segons **PDGFRB** en cèl. tumorals  
P=0.6891

Supervivència global segons **PDGFRB** en cèl. tumorals  
p=0.581



Pel que fa a l'expressió de **PDGFRB vascular** partint de **tota la serie de tumors renals**, vam observar una supervivència millor en el grup que no tenia expressió vascular i en el que la presentava de forma difusa.



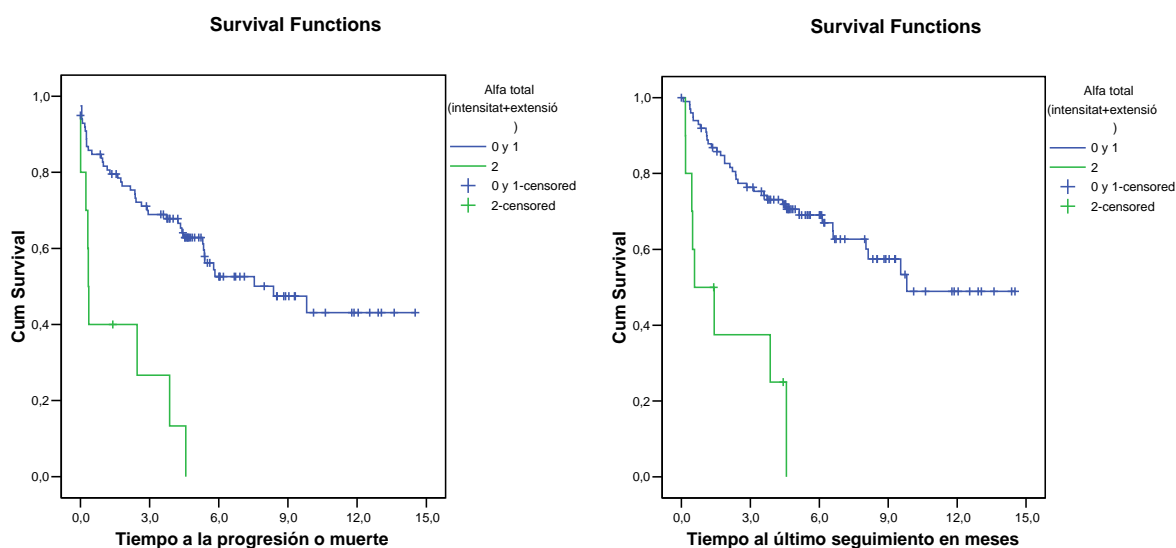
**Fig 6.2.7.**  
Supervivència sense progressió de malaltia  
segons **PDGFRB vascular**  
 $p=0.0067$

Supervivència global  
segons **PDGFRB vascular**  
 $p=0.005$

Per la implicació de PDGF en la patogènia del **carcinoma renal de cèl·lula clara** es va fer un estudi estadístic de supervivència (Progression free survival i Overall survival) considerant només els casos corresponents a aquest subtipus tumoral  
En la següent taula s'anoten les característiques clínico-patològiques d'aquest subgrup (n=100).

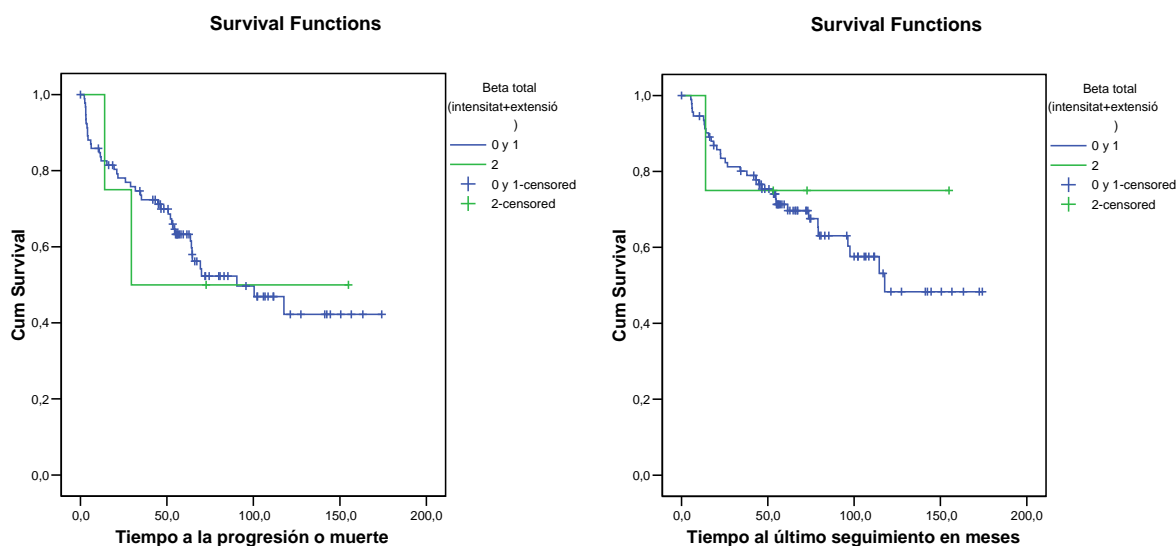
<b>Gènere (%)</b>	
Masculí	72 (72)
Femení	28 (28)
<b>Edat mitjana al diagnòstic (rang)</b>	65.6 (26.5-88.6)
<b>pT (%)</b>	
pT1	52 (52)
pT2	13 (13)
pT3	35 (35)
<b>pN (%)</b>	
pN0	97 (97)
pN1	1 (1)
pN2	2 (2)
<b>Estadi (%)</b>	
I	51 (51)
II	13 (13)
III	34 (34)
IV	2 (2)
<b>Mida tumoral mitjana en cm (rang)</b>	6 (2-16)
<b>Pacients amb metàstasi durant el seguiment (%)</b>	39 (39)
<b>Pacients morts per la malaltia (%)</b>	28 (28)
<b>Mitjana de seguiment en mesos (rang)</b>	58 (0-190)
<b>Supervivència als 5 anys</b>	72.4 %
<b>Mitjana de supervivència en mesos(95% CI)</b>	125 (108-142)

Puntualitzar que per fer l'estudi estadístic, l'expressió de PDGFRA i PDGFRB en les cèl·lules tumorals amb valor negatiu i score baix es va agrupar en una única categoria. El motiu d'aquesta consideració, fou una corba de supervivència molt similar pels scores negatiu i baix.



**Fig 6.2.8.**  
Supervivència sense progressió de malaltia  
segons PDGFRA en cèl. tumorals  
**p<0.0001**

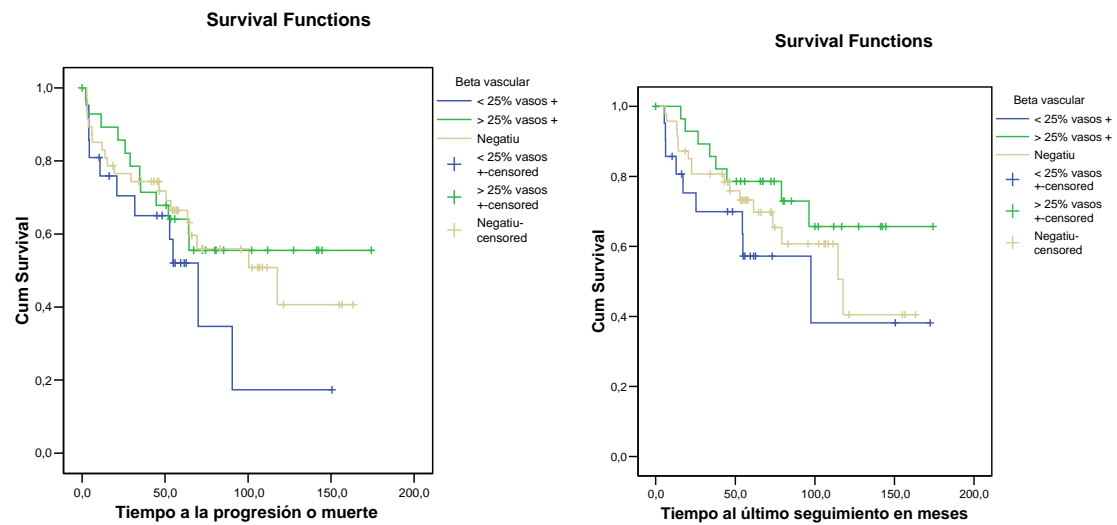
Supervivència global  
segons PDGFRA en cèl. tumorals  
**p<0.0001**



**Fig 6.2.9.**  
Supervivència sense progressió de malaltia  
segons PDGFRB en cèl. tumorals  
p=0.973

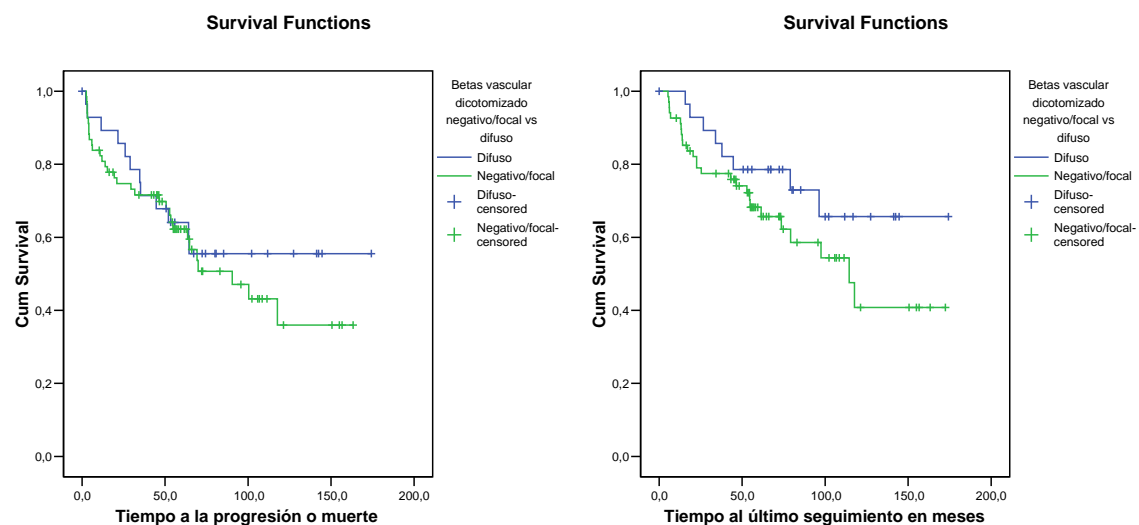
Supervivència global  
segons PDGFRB en cèl. tumorals  
p=0.707

Es van observar diferències significatives pel que fa a supervivència i expressió de **PDGFRA en cèl·lules tumorals**. Els tumors que presentaren una expressió alta (score 2) per aquest marcador van evolucionar més desfavorablement que els que tingueren una expressió baixa o negativa. (p<0,005)



**Fig 6.2.10.**  
Supervivència sense progressió de malaltia segons **PDGFRB vascular (0, 1, 2)**  
p= 0.347

Supervivència global segons **PDGFRB vascular (0, 1, 2)**  
p= 0.22



**Fig 6.2.11.**  
Supervivència sense progressió de malaltia segons **PDGFRB vascular (agrupant la categoria negativa i focal en una mateixa)**  
p=0.484

Supervivència global segons **PDGFRB vascular (agrupant la categoria negativa i focal en una mateixa)**  
p=0.164

En les corbes de supervivència que consideren l'expressió vascular de **PDGFRB** en carcinoma renal de cèl·lula clara, s'observa una tendència a una millor supervivència en el grup amb expressió difusa vascular de PDGFRB respecte al grup amb expressió negativa i focal per PDGFRB. Tot i això les diferències no són significatives.

	PDGFRA cèl. tumorals				PDGFRB cèl. tumorals				PDGFRB vascular			
	0	1	2	p	0	1	2	p	0	1	2	p
<b>Mida tumoral cm (SD) (%)</b>	6.4 (2.8)	6.6 (3.1)	10 (4.8)	0.137 <sup>a</sup>	6.3 (2.7)	9.2 (4.2)	8.1 (1.5)	0.059 <sup>a</sup>	6.8 (3.2)	6.3 (2.8)	7 (3.4)	0.821 <sup>a</sup>
<b>pT (%)</b>				0.457 <sup>b</sup>				0.148 <sup>b</sup>				0.810 <sup>b</sup>
1 (n=52)	30 (58)	18 (35)	2 (4)		43 (83)	3 (6)	3 (6)		25 (48)	11 (21)	13 (25)	
2 (n=13)	6 (46)	5 (39)	1 (8)		9 (69)	4 (31)	0		5 (39)	4 (31)	4 (31)	
3 (n=35)	23 (66)	8 (23)	4 (11)		29 (83)	5 (14)	1 (3)		17 (49)	6 (17)	12 (34)	
4 (n=0)												
<b>Fuhrman (%)</b>				0.003 <sup>b</sup>				0.026 <sup>b</sup>				0.858 <sup>b</sup>
1 (n=17)	12 (71)	3 (18)	1 (6)	0.001 <sup>c</sup>	15 (88)	1 (6)	0	0.004 <sup>c</sup>	7 (41)	3 (18)	6 (35)	0.604 <sup>c</sup>
2 (n=43)	32 (74)	11 (26)	0		40 (93)	1 (2)	1 (2)		19 (44)	10 (23)	13 (30)	
3 (n=30)	11 (37)	14 (47)	3 (10)		19 (63)	8 (27)	2 (7)		17 (57)	6 (20)	6 (20)	
4 (n=10)	4 (40)	3 (3)	3 (3)		7 (7)	2 (2)	1 (1)		4 (40)	2 (20)	4 (40)	

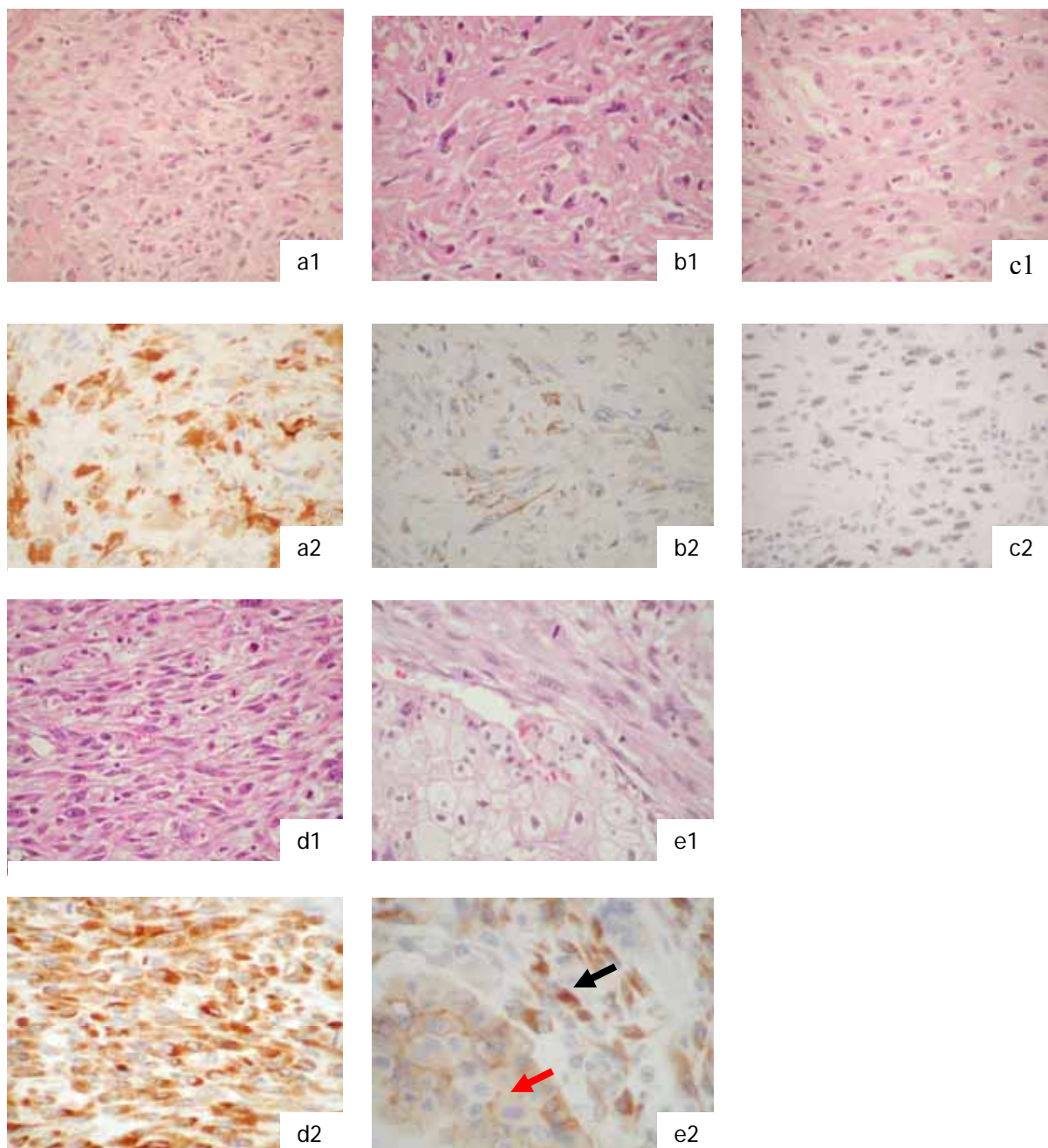
<sup>a</sup> Kruskal-Wallis test

<sup>b</sup> Pearson Chi Square test

<sup>c</sup> Linear association test

**Taula 6.2.2.** Taula que representa la correlació entre l'expressió de PDGFRA, PDGFRB en les cèl·lules tumorals i de PDGFRB vascular i els paràmetres patològics: pT i grau Fuhrman en el subgrup de Carcinoma renal de cèl·lula clara.

### 6.3.- EXPRESSIÓ I ESTUDI MUTACIONAL DE KIT I PDGFR EN CARCINOMA RENAL AMB DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE.



**Figura 6.3.1.** Expressió de KIT en la part sarcomatoide (DS): DSCRCC amb positivitat difusa i citoplasmàtica (a1-HE, a2-KIT), DSCRCC amb positivitat focal i citoplasmàtica (b1-HE, b2-KIT), DSPRCC amb positivitat difusa i nuclear (c1-HE, c2-KIT), DSChRCC amb positivitat difusa i citoplasmàtica per KIT (d1-HE, d2-KIT). A més detall, també es representa la part epitelial i sarcomatoide d'un ChRCC (e1-HE, e2-KIT) per il·lustrar la positivitat de membrana en la part epitelial (fletxa vermella) i citoplasmàtica en la sarcomatoide (fletxa negra).

M.Castillo,A.Petit, B.Mellado, A.Palacín, J.B.Alcover, C.Mallofré  
**"C-KIT Expression in Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma:  
Potential therapy with Imatinib"**  
Journal of Urology 2004; 171: 2176-2180

0022-5347/04/1716-2176/0

Vol. 171, 2176–2180, June 2004 THE JOURNAL OF UROLOGY®

Printed in U.S.A. Copyright © 2004 by AMERICAN UROLOGICAL ASSOCIATION DOI: 10.1097/01.ju.0000127727.33232.cf

## C-KIT EXPRESSION IN SARCOMATOID RENAL CELL CARCINOMA: POTENTIAL THERAPY WITH IMATINIB

MIREIA CASTILLO, ANNA PETIT, BEGOÑA MELLADO, ANTONIO PALACIN, JOAN B. ALCOVER AND CARME MALLOFRE\*

*From the Departments of Pathology (MC, AP, AP, CM), Oncology (BM) and Urology (JBA),*

*Hospital Clínic de Barcelona, Institut D'Investigació Biomedica August Pi Sunyer,*

*University of Barcelona, Barcelona, Spain*

### ABSTRACT

**Purpose:** Sarcomatoid (S) renal cell carcinoma (RCC) is an uncommon subtype of RCC with a poor prognosis because of its local aggressiveness and high metastatic rate. Currently, there is no specific, effective treatment for it. A relatively nontoxic tyrosine kinase inhibitor, imatinib (STI-571) has been approved as a target therapy in neoplasms that express c-Kit. We investigated c-Kit expression in this type of tumor, which to our knowledge has not been previously described.

**Materials and Methods:** We reviewed 215 cases of RCC diagnosed at our department from 1995 to 2002. Of the cases 20 (9.3%) were SRCC. Formalin fixed, paraffin embedded material was available in 19 cases. We performed immunohistochemical staining against c-Kit using rabbit polyclonal antihuman antibody (CD117, Dako Corp., Carpinteria, California), diluted 1:100. Its expression was evaluated in the epithelial and the spindle components.

**Results:** Two of the 20 SRCC cases (10%) showed no epithelial differentiation. The epithelial component was conventional RCC in 10 cases (50%), papillary RCC in 5 (25%) and chromophobe RCC in 3 (15%). A total of 16 cases (80%) presented at an advanced stage at diagnosis, namely T3 or T4 and/or metastatic disease. Immunohistochemical study showed positivity in the epithelial component only in the 3 chromophobe SRCCs. The sarcomatoid component was positive for c-Kit in 18 cases (94.7%).

**Conclusions:** High c-Kit expression in SRCC in our series and the existence of a target therapy, imatinib (STI-571), against cells that express this receptor open the possibility of using this treatment for these tumors, especially in cases of advanced disease.

KEY WORDS: kidney; carcinoma, renal cell; gene expression; imatinib

Accepted for publication January 16, 2004.

\* Correspondence: Department of Pathology, Hospital Clínic, C/Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain (telephone: (34) 93.227.55.36; FAX: (34) 93.227.57.17; e-mail: mallofre@clinic.ub.es).



In 1968 sarcomatoid (S) renal cell carcinoma (RCC) was first described by Farrow et al.<sup>1</sup> It is a relatively uncommon tumor with a reported incidence of 1.2% to 12.3% of renal malignancies. Currently it is considered to represent a transformation to a higher grade malignancy rather than a variant of RCC and in the Heidelberg classification of renal tumors<sup>2</sup> it is not mentioned as a distinct entity. The spindle-like features may be present in all types of RCC, including conventional (clear cell), chromophobe, papillary, collecting duct and even transitional cell carcinomas, because the incidence of this sarcomatoid change is variable depending on the subtype of RCC from which it arises, namely 8% in conventional, 9% in chromophobe, 3% in papillary, 29% in collecting duct and 11% in unclassified RCC.<sup>3</sup>

Sarcomatoid change in RCC is associated with higher aggressiveness locally and metastatically and, thus, with a poor prognosis.<sup>4,6</sup> Surgical resection alone does not seem to affect the clinical course of these tumors significantly and they show a poor prognosis even after treatment. Some adjuvant therapies to improve the results of surgery have been tested in the last years. Chemotherapy regimens containing doxorubicin have been suggested as an adjuvant therapy by several groups with different results. Some investigators observed that durable remission may be achieved with this therapy,<sup>7,8</sup> while others did not note an objective response.<sup>9</sup> Immunotherapy regimens similar to those used for RCC, which include interleukin-2, have proved to be partially useful in select patients with improved survival rates but they have not achieved healing of the disease.<sup>10</sup>

Furthermore, directed therapy diagnoses are becoming an important addition to the treatment plan for a number of common malignancies. The identification of specific cellular targets provides new treatment strategies for the oncologist. To date the best known one is the identification of Her2/neu protein in breast cancer cells. Trastuzumab is currently used as first line therapy for metastatic breast cancers that over express Her-2<sup>11</sup> and other humanized antibodies are being tested for this purpose.<sup>12</sup> The expression of c-Kit (CD117) is well known in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) and activation of the c-Kit gene is considered a ubiquitous feature of these tumors.<sup>13</sup> Several clinical reports document the successful treatment of GISTs with a relatively nontoxic tyrosine kinase inhibitor, namely imatinib (STI-571), which was recently approved by the Food and Drug Administration. The response to treatment is directly related to the cellular expression of CD117 by neoplastic cells but in a low percent of patients tumors show primary resistance to imatinib.<sup>14</sup>

Recently Yamazaki et al reported specific c-Kit over expression in chromophobe RCC compared with other types of RCC.<sup>15</sup> Thus, they opened the possibility of a new target therapy for this type of RCC. We determined whether SRCC shows any positivity for c-Kit in either of the 2 components (epithelial or sarcomatoid) with the objective of finding out whether this ominous tumor could be a candidate for therapeutic strategies involving imatinib (STI571).

#### MATERIAL AND METHODS

*Clinical specimens.* In the files at our department of pathology from 1995 to 2002 we identified 215 consecutive nephrectomy specimens diagnosed as RCC. All cases were histologically reviewed and classified following the Heidelberg classification for renal tumors.<sup>2</sup> The 20 cases (9.3%) with a malignant spindle component were diagnosed as SRCC. Formalin fixed, paraffin embedded material was available in only 19 of these 20 cases. Histological features of the 2 components were reevaluated separately from hematoxylin and eosin sections.

Clinical data recorded were patient age at diagnosis, gender, tumor size and localization, stage following the 2003 TNM classification<sup>16</sup> and outcome. The outcome was classified as free of disease (AWOD), disease and dead of disease (DOD). These findings were obtained from the clinical files and entered into a computerized database for analysis.

*Immunohistochemistry.* Immunohistochemistry was performed using the Envision method (Dako Corp.) on 5  $\mu$ m sections from formalin fixed, paraffin embedded blocks. We used the c-Kit (CD117) rabbit polyclonal antihuman antibody A4502, dilution 1:100. c-Kit expression was evaluated in the epithelial and spindle components. Staining intensity ranged from mild to strong but only strongly positive cells were evaluated. We recorded the distribution of positive cells as less than 10%—focal, 10% to 50%—moderate, and greater than 50%—diffuse in relation to all neoplastic cells, following the criteria of Smitley et al.<sup>17</sup> Tissue mast cells served as the internal positive control because they are usually present in all tissues and they show a characteristic cytoplasmic positivity. Figure 1 shows the epithelial component in case 2, corresponding to conventional RCC that was negative for c-Kit and in which we noted mast cell staining for c-Kit. All slides included an internal negative control, which consisted of the nontumoral renal parenchyma, where the glomeruli and interstitium were negative for c-Kit. A section processed by changing the primary antibody to phosphate buffered saline served as a technical negative control.

## RESULTS

*Clinical specimens.* Table 1 lists clinical findings corresponding to the 20 SRCCs. There was no sex predominance and mean age at diagnosis was 61 years (range 50 to 78). All tumors were more than 5 cm in diameter except 1, which was 3 cm (range 3 to 18, average 8.9). A total of 16 patients (80%) presented with an advanced stage at diagnosis; that is with locally advanced tumors (pT3 and pT4) or metastatic disease. Survival was low after surgery with a median survival of only 10 months but a mean survival of 19 months (fig. 2). This was because there were 3 patients with a long survival followup (48, 73 and 83 months, respectively), while all others died promptly after diagnosis. Of the patients 13 died of disease with an average survival of 8.5 months (range 1 to 24). Only 6 patients (30%) survived at an average followup of 42.8 months (range 6 to 83), of whom 1 had tumor recurrence. These patients had localized tumors (pT1–pT2) with no evidence of lymph node infiltration or metastasis at diagnosis. One patient who had a pT3b tumor was lost to followup.

*Histology.* Histologically 2 cases (10%) showed a spindle pattern with no epithelial differentiation after total inclusion of the mass. In the other cases the epithelial component corresponded to conventional RCC in 10 cases (50%), papillary RCC in 5 (25%), and chromophobe RCC in 3 (15%). The sarcomatoid component did not show any type of morphological differentiation in the majority of tumors (fig. 3, *a* and *b*). Three cases had an extensive rhabdoid phenotype and 1 contained a considerable number of giant multinucleated cells in the background of an unclassified sarcomatoid pattern (fig. 3, *c* and *d*). Mitotic activity was high and most tumors showed extensive necrotic areas.

*Immunohistochemistry.* The 3 tumors corresponding to the chromophobe variant of RCC showed cytoplasmic granular positivity with membrane reinforcement in the epithelial component (fig. 4). Table 2 lists immunohistochemical results, corresponding to the sarcomatous component of the 19 cases. The spindle component was positive for c-Kit in 18 cases (94.7%). Using the evaluation criteria previously mentioned<sup>17</sup> 7 cases were diffusely positive, 6 were moderately positive and 4 were focally positive. Of the cases 13 showed cytoplasmic staining, while the remaining 5 showed intense nuclear positivity.

TABLE 1. Clinicopathological findings in 20 patients with SRCC

Pt No. — Age — Sex	Side	Size (cm)	TNM	Epithelial Component	Outcome	Followup (mos)
1 — 53 — F	Lt	3	pT1N0M0	Papillary	AWOD	6
2 — 39 — M	Lt	9	pT3bN0M1	Conventional	DOD	7
3 — 50 — F	Lt	18	pT3aN0M1	Conventional	DOD	9
4 — 46 — M	Rt	12	pT3aN1M0	Conventional	DOD	5
5 — 50 — F	Lt	8	pT4N0M0	Papillary	DOD	1
6 — 45 — M	Rt	6	pT3aN0M0	Conventional	AWOD	21
7 — 76 — M	Rt	12	pT2N0M0	Papillary	Disease	21
8 — 54 — M	Lt	7.5	pT3aN0M1	Conventional	DOD	14
9 — 54 — M	Rt	13.5	pT3bN0M1	Conventional	DOD	4
10 — 59 — F	Rt	13	pT3aN0M1	Chromophobe	DOD	2
11 — 62 — F	Lt	14	pT4N0M0	Chromophobe	DOD	7
12 — 79 — M	Lt	10	pT3aN0M0	Papillary	AWOD	48
13 — 56 — M	Lt	11	pT3bN0M1	Conventional	DOD	24
14 — 76 — F	Lt	9	pT3aN2M0	Conventional	DOD	10
15 — 70 — F	Rt	10	pT3aN1M0	Conventional	DOD	7
16 — 75 — M	Rt	6	pT3bN0M0	Papillary	Lost to followup	
17 — 78 — F	Rt	9	pT2N0M1	Chromophobe	DOD	15
18 — 68 — F	Rt	8	pT4N0M0	None identified	DOD	6
19 — 75 — F	Rt	7.5	pT2N0M0	Conventional	AWOD	83
20 — 49 — M	Rt	5	pT1N0M0	None identified	AWOD	78

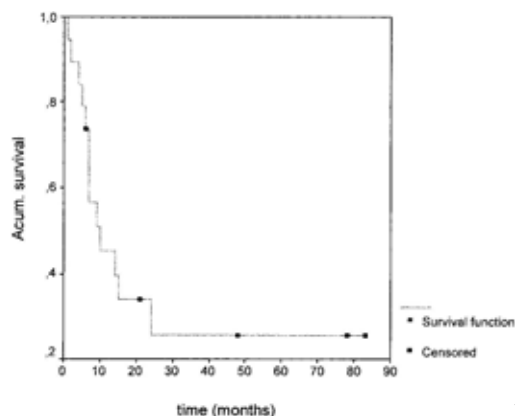


FIG. 2. Survival curve for 20 patients expressed by Kaplan-Meier plot shows that median survival was 10 months in our series, in agreement with reported poor prognosis of SRCC. *Acum.*, cumulative.

TABLE 2. *Immunohistochemical results*

Pt No.	RCC Histological Type	Epithelial Component c-Kit		Sarcomatous c-Kit	Component Staining Pattern
		Epithelial Component c-Kit	Staining Pattern		
1	Papillary	Neg	Neg	Neg	—
2	Conventional	Neg	Neg	Pos	Diffuse
3	Conventional	Neg	Neg	Pos*	Moderate
4	Conventional	Neg	Neg	Pos	Diffuse
5	Papillary	Neg	Neg	Pos	Moderate
6	Conventional	Neg	Neg	Pos	Diffuse
7	Papillary	Neg	Neg	Pos	Moderate
8	Conventional	Neg	Neg	Pos	Moderate
9	Conventional	Neg	Neg	Pos*	Diffuse
10	Chromophobe	Pos	Diffuse	Pos	Diffuse
11	Chromophobe	Pos	Diffuse	Pos	Diffuse
12	Papillary	Neg	Neg	Pos	Focal
13	Conventional	Neg	Neg	Pos	Focal
14	Conventional	Neg	Neg	Pos*	Moderate
15	Conventional	Neg	Neg	Pos	Focal
16	Papillary	Neg	Neg	Pos*	Diffuse
17	Chromophobe	Pos	Diffuse	Pos	Focal
18	No epithelial component identified	Neg	Neg	Pos	Moderate
19	Conventional	Neg	Neg	Pos*	Moderate

\* Intense nuclear membrane.

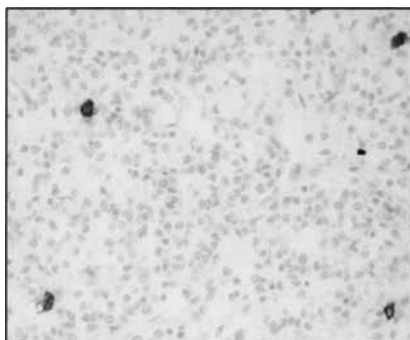


FIG. 1. Case 2. Mast cell cytoplasm was positive for c-Kit.

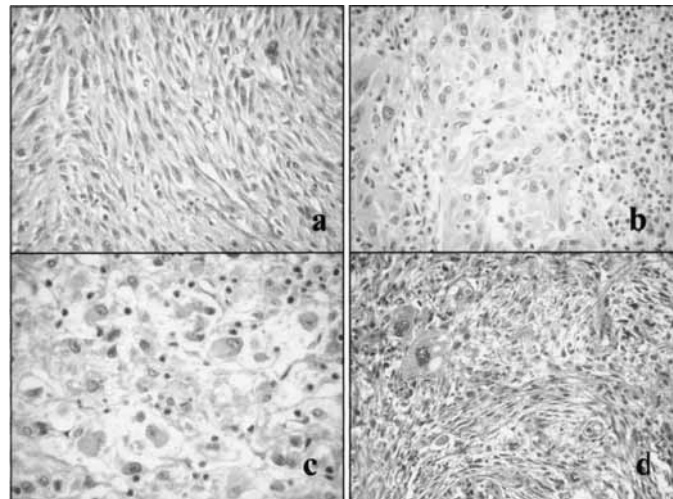


FIG. 3. SRCC histological patterns. *a*, case 8. Sarcomatoid proliferation with interlacing bundles of spindle malignant cells. H & E, reduced from X400. *b*, case 16. Sarcomatoid proliferation with interlacing bundles of spindle malignant cells. H&E, reduced from X 600. *c*, case 13. Sarcomatoid proliferation with intermingled rhabdoid-like cells. H & E, reduced from X600. *d*, case 11. Sarcomatoid proliferation with scattered giant multinucleated cells. H&E, reduced from X200.

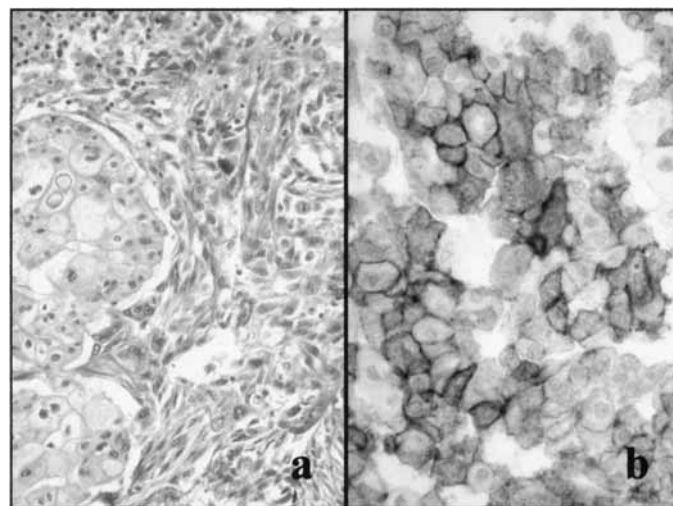


FIG. 4. Case 10. Three chromophobe SRCCs showed diffuse positivity in the epithelial component that was granular cytoplasmic with -membrane reinforcement. *a*, H&E, reduced from X400. *b*, c-Kit, reduced from X600.

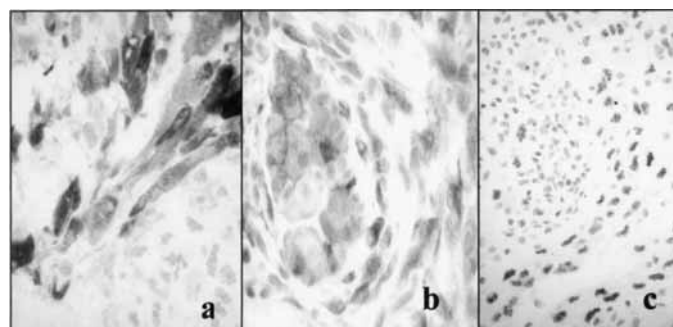


FIG. 5. Staining patterns in sarcomatous component. *a*, case 2. Conventional SRCC with sarcomatoid component (left) showing strong, diffuse positivity, while carcinomatous component (right) is completely negative for c-Kit. *b*, case 11. Chromophobe RCC shows intense positivity for c-Kit in both components. *c*, case 16. Malignant spindle cells (right) demonstrate intense nuclear positivity for c-Kit, while epithelial cells are negative. c-Kit, reduced from X 400.

## DISCUSSION

SRCC is a poor prognosis tumor with a low survival rate. Most cases are diagnosed at an advanced stage with disseminated disease. Currently treatment with surgical excision of the mass with or without adjuvant chemotherapy or radiotherapy, has little effect in these patients. Our results are in accordance with those reported previously. Most tumors presented at an advanced stage at surgery and patients had a low survival rate (table 1 and fig. 2).

c-Kit is a proto-oncogene located in the long arm of chromosome 4. It encodes a transmembrane receptor (CD117) with an internal tyrosine-kinase component that is structurally related to platelet-derived growth factor receptor and the receptor for colony stimulating factor-1. Kit receptor and its ligand stem cell factor regulate early hematopoiesis, and the development of germ cells, melanocytes and interstitial cells of Cajal. It is normally expressed by various normal tissue cell types, including mast cells, skin basal cells, melanocytes, breast epithelium, ovary and interstitial cells of Cajal.

The role of c-Kit in tumorigenesis has been studied in GISTs, in which the c-Kit tyrosine kinase is frequently activated by mutations that commonly occur in the transmembranous and/or tyrosine kinase domains. Immunohistochemical expression of c-Kit has been reported in other malignancies, including different types of carcinoma (breast, colon, pancreas, Merkel cell carcinoma,<sup>18</sup> small cell carcinoma of the lung, a few sarcomas other than GIST and angiomyolipoma). GIST treatment with the relatively nontoxic tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI-571) was recently approved. Response to treatment is directly related to the cellular expression of CD117 by neoplastic cells.<sup>19</sup>

In our study we found immunohistochemical expression for c-Kit in the sarcomatous component of 18 SRCCs. Of the positive cases 13 (72%) showed strong cytoplasmic positivity, a pattern that is found in GISTs and in other tumors that over express c-Kit receptor (fig. 5, *a* and *b*).<sup>15,17,18</sup> The other 5 cases (28%) had intense and diffuse nuclear staining (fig. 5, *c*). The meaning of this nuclear expression is still unclear but it could represent a different activation system of the gene.

Membranous and cytoplasmic positivity for c-Kit in the epithelial component of chromophobe SRCC was first reported by Yamakazi et al (fig. 1).<sup>15</sup> They analyzed gene expression profiles in 15 cases of RCC using high density oligonucleotide arrays. Of their cases 3 of chromophobe RCC showed specific up-regulation of the Kit gene. Immunohistochemical analysis demonstrated membranous expression of c-Kit in all 3 cases. However, in these 3 cases they did not note any mutation in the domains between the transmembrane and tyrosine kinase regions of the c-Kit gene, where mutations mainly occur in GISTs.<sup>13</sup> Therefore, they concluded that there was over expression of WT c-Kit. We recently performed a study in 53 RCCs and 15 oncocytomas. In our experience none of the conventional and papillary RCCs showed any staining for c-Kit, while 68% of chromophobe RCCs and 71% of oncocytomas showed membranous and cytoplasmic positivity for this marker.<sup>20</sup> To our knowledge c-Kit expression has not been reported previously in SRCC and the function of the c-Kit receptor in tumorigenesis is unclear.

In our series c-Kit expression did not correlate with outcome. Most SRCCs (94.7%) were positive for c-Kit and only 1 SRCC in the 6 survivors was negative for this marker. Thus, this expression must be considered a distinct feature of this high grade renal neoplasm rather than a prognostic factor.

We have not performed molecular studies to determine whether the c-Kit gene shows mutations similar to those detected in GISTs. However, our hypothesis is that strong and diffuse expression of c-Kit seen at the tissue level may represent an activated c-Kit dependent signaling pathway, as in GISTs. Further studies must be done with frozen material in order to find out the status of the c-Kit gene in these tumors and to understand better the etiology of this sarcomatoid change in RCC and its biological implications. In conclusion, although further clinical studies must be done, our results indicate that due to the ominous prognosis of SRCC and the relatively low toxicity of imatinib, treatment with this Kit-kinase inhibitor should be considered a good option in patients with disseminated disease who have no other alternative therapies.

Elena Gonzalvo and Margarita Mainar performed immunohistochemical staining

## REFERENCES

1. Farrow, G. M., Harrison, E. G. and Utz, D. C.: Sarcomas and sarcomatoid and mixed malignant tumors of the kidney in adults—part III. *Cancer*, **22**: 556, 1968
2. Kovacs, G., Akhtar, M., Beckwith, B. J., Bugert, P., Cooper, C. S., Delahunt, B. et al: The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol*, **183**: 131, 1997
3. de Peralta-Venturina, M., Moch, H., Amin, M., Tamboli, P., Hailemariam, S., Mihatsch, M. et al: Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. *Am J Surg Pathol*, **25**: 275, 2001
4. Mian, B. M., Bhadkamkar, N., Slaton, J. W., Pisters, P. W. T., Daliani, D., Swanson, D. A. et al: Prognostic factors and survival of patients with sarcomatoid renal cell carcinoma. *J Urol*, **167**: 65, 2002
5. Ro, J. Y., Ayala, A. G., Sella, A., Samuels, M. L. and Swanson, D. A.: Sarcomatoid renal cell carcinoma: clinicopathologic. A study of 42 cases. *Cancer*, **59**: 516, 1987
6. Amin, M. B., Amin, M. B., Tamboli, P., Javidan, J., Stricker, H., de-Peralta Venturina, M. et al: Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol*, **26**: 281, 2002
7. Sella, A., Logothetis, C. J., Ro, J. Y., Swanson, D. A. and Samuels, M. L.: Sarcomatoid renal cell carcinoma. A treatable entity. *Cancer*, **60**: 1313, 1987
8. Bangalore, N., Bhargava, P., Hawkins, M. J. and Bhargava, P.: Sustained response of sarcomatoid renal-cell carcinoma to MAID chemotherapy: case report and review of the literature. *Ann Oncol*, **12**: 271, 2001
9. Escudier, B., Droz, J. P., Rolland, F., Terrier-Lacombe, M. J., Gravis, G., Beuzeboc, P., et al: Doxorubicin and ifosfamide in patients with metastatic sarcomatoid renal cell carcinoma: a phase II study of the genitourinary group of the French Federation of Cancer Centers. *J Urol*, **168**: 959, 2002
10. Cangiano, T., Liao, J., Naitoh, J., Dorey, F., Figlin, R. and Belldegrun, A.: Sarcomatoid renal cell carcinoma: biologic behavior, prognosis, and response to combined surgical resection and immunotherapy. *J Clin Oncol*, **17**: 523, 1999
11. Arteaga, C. L.: Trastuzumab, an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, **5**: 96, 2003
12. Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L. et al: Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic cancer. *J Clin Oncol*, **14**: 737, 1996
13. Rubin, B. P., Singer, S., Tsao, C., Duesing, A., Lux, M. L., Ruiz, R. et al: KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*, **61**: 8118, 2001
14. Demetri, G. D., von Mehren, M., Blanke, C. D., Van den Abbeele, D., Eisenberg, B., Roberts, P. J. et al: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med*, **347**: 472, 2002
15. Yamazaki, K., Sakamoto, M., Ohta, T., Kanai, Y., Ohki, M. and Hirohashi, S.: Overexpression of KIT in chromophobe renal cell carcinoma. *Oncogene*, **22**: 847, 2003
16. TNM Classification of Malignant Tumours, 6th ed. International Union Against Cancer. New York: Wiley-Liss, pp. 193–195, 2002
17. Smithy, B. E., Pappo, A. S. and Hill, D. A.: C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol*, **26**: 486, 2002
18. Su, L. D., Fullen, D. R., Lowe, L., Uherova, P., Schnitzer, B. and Valdez, R.: CD117 (Kit receptor) expression in Merkel cell carcinoma. *Am J Dermatol Pathol*, **24**: 289, 2002
19. Heinrich, M. C., Blanke, C. D., Druker, B. J. and Corless, C. L.: Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol*, **20**: 1692, 2002
20. Petit, A., Castillo, M., Santos, M., Mellado, B., Alcover, J. B. and Mallofre, C.: Kit expression in chromophobe renal cell carcinoma: Comparative immunohistochemical analysis of KIT expression in different Renal Cell Neoplasms. Unpublished data

A.Petit, M. Castillo, A. Gaspa, D. Colome, X. Garcia de Albéniz,  
C. Moreno, M. Camós, B. Mellado, C. Mallofré  
**“Expression and mutational analyses of KIT and PDGFR- $\alpha$  in  
Sarcomatoid renal cell carcinoma”**  
PENDENT DE PUBLICACIÓ

**Title:** EXPRESSION AND MUTATIONAL ANALYSES OF KIT AND PDGFR- $\alpha$  IN SARCOMATOID RENAL CELL CARCINOMA.

**Authors:** Anna Petit, Mireia Castillo, Albert Gaspa, Dolors Colome (\*), Xabier Garcia de Albéniz (+), Carol Moreno (\*), Mireia Camós (\*), Begoña Mellado (+), Carme Mallofré

**Affiliations:** Department of Pathology, Hematopathology (\*) and Oncology (+). Hospital Clínic de Barcelona. IDIBAPS. University of Barcelona. Barcelona. Spain.

**Sources of Support:**

This work has been supported by grant of the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (PI020519) and “Premi Fi de residència de l’Hospital Clínic de Barcelona 2005”

**Acknowledgements**

The authors thank Olga Luna, Judith Vela, Montse Fàbregas, Margarita Mainar and Elena Gonzalvo for their technical support.

**Abstract:**

Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma (SRCC) is not a distinct histologic entity but represents high-grade transformation associated with poor prognosis and absence of effective therapy in advanced stages of different subtypes of Renal Cell Carcinoma. Immunohistochemical expression of KIT in SRCC raised the potential use of Imatinib as a target therapy. Experience in Gastrointestinal Stromal Tumour (GIST) has shown that gain of function mutations of KIT and PDGFRA represent a pathogenetic mechanism and a prerequisite for clinical response to Imatinib. Taking this paradigm as a reference, the aim of our study is to assess the expression and mutational status of both KIT and PDGFR, targets of Imatinib in a series of 16 SRCC considering the epithelial and sarcomatoid part independently. Expression of KIT and PDGFRA was observed in the sarcomatoid part of 81,2% cases and in the epithelial part of 31,2% and 43,7% cases respectively. The sarcomatoid component of a subset of 6 and 7 SRCC with KIT and PDGFRA overexpression was further submitted to mutational analyses for KIT exons 9, 11 and PDGFRA exons 12, 18 resulting in no mutations identified. Thus, overexpression of KIT and PDGFRA in the sarcomatoid part of SRCC is not associated with gain of function mutations in the exons most commonly affected in GIST. So that to date, there is not enough evidence to support the use of Imatinib for the treatment of patients with metastatic SRCC. Otherwise the reason why KIT and PDGFRA are overexpressed in sarcomatoid differentiation remains to be elucidated.

**Key words:**

KIT, PDGFR, Renal Cell Carcinoma, Sarcomatoid, Mutations.



## INTRODUCTION

The increased understanding of molecular carcinogenic pathways along with the advent of target therapy has changed the clinical management of advanced Renal Cell Carcinoma (RCC), classically considered one of the most radio- and chemoresistant.<sup>1,2 3</sup>

Among renal tumors, Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma (SRCC) is considered one of the most aggressive phenotypes. This entity first described by Farrow et al in 1967<sup>4</sup> is currently not regarded as a distinct histological category but a high-grade transformation occurring in different RCC subtypes.<sup>5</sup>

The incidence of sarcomatoid differentiation is reported to be 8% in Clear Cell Renal Cell Carcinoma (CRCC), 3% in Papillary Renal Carcinoma (PRCC), 9% in Chromophobe Renal Carcinoma (ChRCC), 29% in Collecting Duct Carcinoma (CDC) and 11% in Unclassified Renal Cell Carcinoma (URCC). The pathogenesis of this pattern of dedifferentiation is still unknown.<sup>6</sup>

Clinically, SRCC is associated with poor prognosis because of its local aggressiveness and high metastatic rate with a 5-year disease-specific survival of 15-22 % depending on the series.<sup>6 7</sup>

There is still not an effective treatment for patients with metastatic SRCC. Proposed regimes using immunotherapy and different chemotherapeutic agents have obtained absence or low response rates.<sup>8 9 10 11</sup>

In last decade, there has been an increasing interest to characterize the expression of tyrosine-kinase receptors in different tumours not only because they are commonly deregulated or mutated in human cancers but also because they represent attractive molecular targets for new biologic drugs.<sup>12</sup>

PDGFR and KIT are two examples of transmembrane tyrosine-kinases that have an oncogenic role in numerous neoplasms and can be inhibited pharmacologically.<sup>13 14</sup>

In this respect, Imatinib is a well-known targeted therapy against tyrosine kinases BCR-ABL, KIT and PDGFR, that is effective in Chronic Myelogenous Leukemia (CML) and Gastrointestinal Stromal Tumour (GIST).<sup>15</sup>

In GIST, KIT or PDGFR- $\alpha$  (PDGFRA) gain of function mutations play a crucial role in its pathogenesis and are responsible for Imatinib success<sup>16</sup>. This example among others has contributed to pose a paradigm on how expression and oncogenic activation of tyrosin-kinases can be translated into the clinic and establish the basis of an effective biologic treatment.<sup>15,17 18</sup>

Although the rationale of targeted therapies in SRCC has to be defined, overexpression of KIT in a high percentage of SRCC raised the possible clinical use of Imatinib as a targeted therapy for these tumours.<sup>19</sup>

Because of the need of effective therapeutic approaches for SRCC patients we considered to further study this hypothesis. So that, the aim of this work is to assess the immunohistochemical expression of both targets of Imatinib, KIT and PDGFRA and to further contrast if this overexpression could be associated with gain of function mutations by analogy with GIST.

## MATERIALS AND METHODS

### Selection of cases

16 formalin-fixed paraffin-embedded cases of SRCC were retrieved from surgical pathology archives of our hospital. We included 10 cases of our previous study in which sarcomatoid part was broadly represented and enough biological material was available to conduct KIT and PDGFRA immunohistochemistry and DNA extraction. Other 6 SRCC cases were added to the series. Hematoxylin-eosin stained sections from each specimen were reviewed to confirm the histological diagnosis. The epithelial part of SRCC cases were classified according to WHO classification 2002<sup>5</sup> into CRCC (9 cases), PRCC (1 case), ChRCC (5 cases) and URCC (1 case).

Apart from histological subtype of the epithelial part of SRCC, tumor size, stage following 6th TNM classification, patient age at diagnosis, gender, and outcome were recorded.<sup>20</sup>. All this clinicopathological data is summarized in Tables 1 and 2.

### Immunohistochemical analysis

For immunohistochemical analysis, KIT (A 4502 DAKO, Carpinteria, CA; dilution 1:100) and PDGFRA (sc-338 Santa Cruz Biotechnology, CA; dilution 1:100) antibodies were used. A representative block from both the epithelial and the sarcomatoid part was selected and four micron paraffin-embedded sections obtained. After paraffin removal and hydration, antigen retrieval was performed using pressure cooker in EDTA buffer (pH 9.0) for KIT and in Citrate buffer (pH 6.0) for PDGFRA. Endogenous peroxidase activity was blocked in 3% hydrogen peroxide for 10 min. The slides were incubated with the primary antibody for 60 min at room temperature. EnVision System (DAKO, Carpinteria, CA) was used to detect antigen-antibody reaction. Sections were visualized with 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen and counterstained with Mayer's hematoxylin.

Mast cells within the tumor served as positive internal control for KIT. Renal tubules of renal parenchyma adjacent to the tumor were taken as positive internal control for PDGFRA. Negative control consisted on substituting the primary antibody with non-immune Immunoglobulin with an equivalent concentration. For an extra PDGFRA negative control, blocking peptide was also used.

Expression of PDGFRA and KIT in the epithelial and sarcomatoid component was evaluated independently. For KIT, the extent of immunoreactivity was assessed semiquantitatively in a selected tumor section and categorized as focal (<25% of tumor cells positive), moderate (25-50% of tumor cells positive) and diffuse (>50% of tumor cells positive).

For PDGFRA, the extent and intensity of staining were considered. The extent of positivity was also regarded semiquantitatively in the same manner as for KIT.

The staining of renal tubules not only served as an internal positive control but also as a reference of intensity. Intensities lower than the one observed in renal tubules were regarded as weak and intensities higher or the same as renal tubules were considered strong.

Finally a score of immunoreactivity in 3 categories was made up taking into account extension and intensity. So that, cases negative or weak with focal expression were graded as 0 (negative), cases with weak and moderate or diffuse staining and cases with strong but focal expression as 1 (low expression)

and cases with strong intensity and moderate or diffuse expression as 2 (high expression). The pattern of positivity being nuclear, membranous and cytoplasmic was also recorded.

### **Mutational analysis**

For each case, a paraffin block corresponding to sarcomatoid differentiation was selected to perform DNA extraction. Immunohistochemical study of KIT and PDGFRA was previously done in the same block. Clearly demarcated areas of non tumoral tissue or of epithelial component were removed from the block. In cases, in which the epithelial and sarcomatoid component were intermingled or in which necrosis was really extensive DNA extraction was not done. Genomic DNA was extracted using the commercial KIT “QIAamp ® DNA mini KIT” (Qiagen, catalog number 51304, Hilden, Germany) following the manufacturer’s instructions. Quality of DNA obtained was assessed by PCR<sup>21</sup> that included five pairs of control gen primers that amplify products of 100, 200, 300, 400 and 600 base pairs (bp). Overall, quality of DNA from our samples was not good, since we could only detect PCR products of 100 and 200 bp length in just one third of the cases. Consequently, we designed primers to amplify fragments of 100 to 200 bp length corresponding to KIT exons 9, 11 and PDGFRA exons 12, 18. Primer sequences are listed in Table 3.

PCR amplification of exons 9 and 11 of KIT was performed in a 25 µl reaction containing 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 50 pmol of each primer and 1U Taq polimerase (Roche, Basel, Switzerland). Cycling conditions started with denaturalization at 95°C for 10 min followed by 40 cycles ( 95°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min) and a final extension step for 10 min at 72°C.

PCR amplification of exons 12 and 18 of PDGFRA was performed in 25 µl reaction containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 10 pmol of each primer, and 1U AmpliTaq gols (Applied Biosystems). Cycling conditions started with denaturalization at 95°C for 10 min followed by 40 cycles (95°C 30 seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30 seconds) and a final extension step for 10 min at 72°C.

PCR products were identified on a 2% metaphor agarose gel and visualized under UV after ethidium bromide staining. PCR products were purified using a rapid PCR purification system (Marligen, biosciences; Ijamsville, MD) and directly sequenced, in both directions to avoid misreading errors, with the appropriate specific primer using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing 3.1 (Applied Biosystems, CA, USA) in an automated DNA sequencer (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems, CA, USA). Sequences obtained were compared to NCBI Human KIT and PDGFRA gene nucleotide sequence and blasted using NCBI Standard Nucleotide Blast Search to determine the presence of mutation within a particular exon.

## **RESULTS**

KIT was expressed in 81,2 % of cases in the sarcomatoid component (Figure 1). Expression was diffuse in 38,5 % of cases, moderate in 15,4 % and focal in 46,1 %. No expression of KIT was seen in the epithelial component of SRCC except for ChRCC cases, all of which exhibited a moderated-diffuse staining. (Table 4) Different patterns of staining for KIT were noted comparing the epithelial and sarcomatoid parts. The epithelial component of SRCC positive cases (all of them of ChRCC subtype)

displayed a membranous staining whereas the sarcomatoid part exhibited cytoplasmic or nuclear positivity.

81,2% cases were positive for PDGFRA in the sarcomatoid part most of which (92,3%) exhibiting high expression (Figure 1). Conversely, only 7 cases (43,8%) showed overexpression of PDGFRA in the epithelial part, most of them with low expression ( $p=0,002$ ) (Table 5). The pattern of staining in both the epithelial and sarcomatoid part was predominantly cytoplasmic. (Table 6, Figure 1). In non-neoplastic kidney tissue adjacent to the tumor lesion, KIT was detected in the cytoplasm of some renal tubules, occasionally with basal reinforcement. PDGFRA was present with strong staining in all tubules of renal parenchyma whereas glomeruli did not show any expression. Provided that overexpression of PDGFRA and KIT was observed mainly in the sarcomatoid component, this part was the one submitted to mutational analyses.

So that, sequencing of KIT exons 9, 11 was done in the sarcomatoid part of 6 cases, two of which expressed KIT focally, 1 moderately and 3 diffusely. As already pointed out, areas in which KIT expression was seen by immunohistochemistry although categorized as focal were the ones selected to pursue DNA extraction.

Mutational Analysis of PDGFRA exons 12 and 18 was done in the sarcomatoid part of 7 cases, all of which showed high expression of PDGFRA.

None of the cases analyzed, harbored mutations in KIT nor in PDGFRA in the sequenced exons.

## DISCUSSION

Prognosis of patients with SRCC is very poor because of high stage at presentation and ineffective treatment in these advanced stages. The report of KIT expression in sarcomatoid differentiation of RCC yielded the potential use of Imatinib for the treatment of this neoplasm<sup>19</sup>. This hypothesis is deeper studied in this work.

Expression of KIT and PDGFRA, both targeted by Imatinib, was assessed by immunohistochemistry in a series of 16 SRCC considering the epithelial and the sarcomatoid parts independently. Higher expression of these two tyrosine-kinase receptors was observed in the sarcomatoid part (81,2% KIT and 81,2% PDGFRA) in comparison with the epithelial part (31,2% KIT and 43,7% PDGFRA) (Tables 4, 5) These differences were statistically significant for PDGFRA ( $p=0,002$ ) but not for KIT as 5 out of 16 cases corresponded to Chromophobe SRCC. In this tumor subtype, KIT expression is observed in most cases in accordance with already published data.<sup>22 23;24</sup> Most of the cases that displayed positive staining for PDGFRA in the epithelial part were categorized as low (71% of positive cases) while 92,3% of cases showed high expression of PDGFRA in the sarcomatoid part (Table 5, Figure 1).

Results regarding KIT positivity in sarcomatoid part of SRCC are slightly lower in this series (81,2%) compared to the other series previously published by our group (96%)<sup>19</sup>. That's due to the fact that 3 of the 6 new diagnosed cases added to the current series did not show KIT expression. Despite this, the percentage of KIT positive cases is still noticeable.

However, other studies have shown markedly different observations regarding KIT expression in the sarcomatoid part of SRCC.<sup>25 26</sup> Bishu et al. found KIT expression in the sarcomatoid part of 7 out of 25 SRCC cases (28%). In the work of Sengupta et al., KIT positivity was only found in 4,1% of a series of 123 cases with sarcomatoid differentiation demonstrating positive staining in both the epithelial and the sarcomatoid components.

The differences between the results of our group and these two published works prompt us to review and compare the immunohistochemical protocols followed. The KIT antibody used in all three studies is the same (DAKO, A 4502). However, the dilution used by Segupta et al. (1/600) is lower than the one used by our group (1/100). The immunohistochemical protocol carried out by Bishu et al. was not specified as results were published in abstract form.

Therefore, being the antibody referenced the same (DAKO, A4502) and the positive and negative controls correctly assessed in all research works, we believe that the threshold of antigen detection could be lower in our study than the one of Sengupta et al., due to the fact that a higher concentration of the primary antibody was used in our study. Moreover, in our series, two cases exhibiting nuclear immunostaining of KIT were rated as positive. This pattern of expression was not mentioned neither in the study of Segupta et al. nor in the one of Bishu et al.

Since Imatinib approval as effective treatment against GIST and CML, many studies have been published characterizing expression of Imatinib targets, mainly PDGFRA and KIT, on different neoplasms with the purpose to expand the tumors in which Imatinib could be a therapeutic option.<sup>27</sup>

However, it has been documented that many KIT and PDGFRA expressing tumours do not or only very rarely harbor KIT or PDGFRA activating mutations.<sup>28</sup>

As a result, it is not surprising that many clinical trials have observed only minimal or no clinical efficacy of Imatinib in various types of tumors based only on immunohistochemical expression of KIT or PDGFRA.

These studies support the concept that mutation-mediated activation of these two tyrosine kinase receptors is a prerequisite for successful treatment with Imatinib<sup>29 13;30;31</sup>.

Provided that sensitivity to Imatinib can not be inferred based solely on positive immunohistochemical expression of its targets, we search for mutational status of both KIT and PDGFRA in a subset of SRCC cases where sarcomatoid differentiation showed a clear overexpression of these proteins<sup>15;16</sup>.

In our analysis, we concentrated on exons 9 and 11 of KIT and 12 and 18 of PDGFRA, where activating mutations in KIT and PDGFRA have been most commonly found in GIST. We specially focused on exons 9 and 11 of KIT (that encode for the juxtamembranous domains) as they are the most frequently mutated exons in GIST and the ones with mutations associated with higher response to Imatinib<sup>30</sup> In our work, no mutations were identified in exons analyzed in any of the cases. These results are in concordance with Segupta et al. who reported absence of exon 9, 11, 13 and 17 KIT mutations in seven KIT positive high grade Renal Cell Carcinomas, five of which exhibited sarcomatoid differentiation. The lack of KIT mutations exposed in this previous study and the present one support the fact that KIT expression in SRCC doesn't follow the same mechanism of tumorigenesis as the one established for GIST<sup>32</sup>

In conclusion, our work shows that KIT and PDGFRA expression is a common finding in sarcomatoid differentiation of RCC. The molecular mechanism underlying this expression and whether this could have an active role in the clinical aggressiveness of this high grade transformation is still unknown. We sought for specific mutations in KIT and PDGFR exons that have been involved in GIST tumorigenesis and response to Imatinib in order to establish a basis for potential therapy with this drug. The lack of mutations in SRCC does not support this hypothesis. However the presence of other mutations can not be excluded. The role of tyrosine-kinases in the pathogenesis and as therapeutic targets in SRCC remains to be elucidated.

#### REFERENCES

1. Stadler WM. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2005;104:2323-33.
2. Patel PH, Chaganti RS, Motzer RJ. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2006;94:614-19.
3. Atkins MB, Ernstoff MS, Figlin RA, Flaherty KT, George DJ, Kaelin WG, Jr., Kwon ED, Libermann TA, Linehan WM, McDermott DF, Ochoa AC, Pantuck AJ, Rini BI, Rosen MA, Sosman JA, Sukhatme VP, Vieweg JW, Wood CG, King L. Innovations and challenges in renal cell carcinoma: summary statement from the Second Cambridge Conference. *Clin Cancer Res* 2007;13:667s-70s.
4. Farrow GM, Harrison EG, Jr., Utz DC. Sarcomas and sarcomatoid and mixed malignant tumors of the kidney in adults. 3. *Cancer* 1968;22:556-63.
5. Tumors of the Kidney. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, eds. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon: IARC Press, 2004.
6. de Peralta-Venturina M, Moch H, Amin M, Tamboli P, Hailemariam S, Mihatsch M, Javidan J, Stricker H, Ro JY, Amin MB. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. *Am J Surg Pathol* 2001;25:275-84.
7. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Leibovich BC, Frank I, Blute ML. Sarcomatoid renal cell carcinoma: an examination of underlying histologic subtype and an analysis of associations with patient outcome  
6. *Am J Surg Pathol* 2004;28:435-41.
8. Cangiano T, Liao J, Naitoh J, Dorey F, Figlin R, Belldegrun A. Sarcomatoid renal cell carcinoma: biologic behavior, prognosis, and response to combined surgical resection and immunotherapy  
1. *J Clin Oncol* 1999;17:523-28.

9. Mian BM, Bhadkamkar N, Slaton JW, Pisters PW, Daliani D, Swanson DA, Pisters LL. Prognostic factors and survival of patients with sarcomatoid renal cell carcinoma. *J Urol* 2002;167:65-70.
10. Escudier B, Droz JP, Rolland F, Terrier-Lacombe MJ, Gravis G, Beuzeboc P, Chauvet B, Chevreau C, Eymard JC, Lesimple T, Merrouche Y, Oudard S, Priou F, Guillemare C, Gourgou S, Culine S. Doxorubicin and ifosfamide in patients with metastatic sarcomatoid renal cell carcinoma: a phase II study of the Genitourinary Group of the French Federation of Cancer Centers  
1. *J Urol* 2002;168:959-61.
11. Nanus DM, Garino A, Milowsky MI, Larkin M, Dutcher JP. Active chemotherapy for sarcomatoid and rapidly progressing renal cell carcinoma. *Cancer* 2004;101:1545-51.
12. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411:355-65.
13. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 2002;20:1692-703.
14. Jones AV, Cross NC. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2912-23.
15. Druker BJ. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv Cancer Res* 2004;91:1-30.
16. Hirota S, Isozaki K. Pathology of gastrointestinal stromal tumors  
1. *Pathol Int* 2006;56:1-9.
17. Demetri GD. Targeting c-kit mutations in solid tumors: scientific rationale and novel therapeutic options. *Semin Oncol* 2001;28:19-26.
18. Kitamura Y, Hirota S, Nishida T. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): a model for molecule-based diagnosis and treatment of solid tumors. *Cancer Sci* 2003;94:315-20.
19. Castillo M, Petit A, Mellado B, Palacin A, Alcover JB, Mallofre C. C-kit expression in sarcomatoid renal cell carcinoma: potential therapy with imatinib  
6. *J Urol* 2004;171:2176-80.
20. *TNM Classification of Malignant Tumors*. Hoboken, New Jersey: John Wiley, 2002.
21. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, Garcia-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-317.

22. Yamazaki K, Sakamoto M, Ohta T, Kanai Y, Ohki M, Hirohashi S. Overexpression of KIT in chromophobe renal cell carcinoma. *Oncogene* 2003;22:847-52.
23. Petit A, Castillo M, Santos M, Mellado B, Alcover JB, Mallofre C. KIT expression in chromophobe renal cell carcinoma: comparative immunohistochemical analysis of KIT expression in different renal cell neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2004;28:676-78.
24. Pan CC, Chen PC, Chiang H. Overexpression of KIT (CD117) in chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocyoma. *Am J Clin Pathol* 2004;121:878-83.
25. Sengupta S, Cheville JC, Corless CL, Lohse CM, Heinrich MC, Kwon ED, Zincke H, Blute ML, Leibovich BC. Rare expression of KIT and absence of KIT mutations in high grade renal cell carcinoma. *J Urol* 2006;175:53-56.
26. Bishu, S, Papavero, V., Adley, B. P., Lin, F., and Yang, X. J. C-kit protein immunoreactivity in renal cell carcinoma with sarcomatoid dedifferentiation. *Modern Pathology* 18[Supplement 1], 132 A. 2005.  
Ref Type: Abstract
27. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005;13:205-20.
28. Sihto H, Sarlomo-Rikala M, Tynninen O, Tanner M, Andersson LC, Franssila K, Nupponen NN, Joensuu H. KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha tyrosine kinase gene mutations and KIT amplifications in human solid tumors. *J Clin Oncol* 2005;23:49-57.
29. von MM. Targeted therapy with imatinib: hits and misses? *J Clin Oncol* 2005;23:8-10.
30. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von MM, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S, Fletcher JA. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21:4342-49.
31. bieć-Rychter M, Dumez H, Judson I, Wasag B, Verweij J, Brown M, Dimitrijevic S, Sciot R, Stul M, Vranck H, Scurr M, Hagemeyer A, Van GM, van Oosterom AT. Use of c-KIT/PDGFR $\alpha$  mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2004;40:689-95.
32. Rubin BP, Heinrich MC, Corless CL. Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet* 2007;369:1731-41.



## TABLES

**Table 1.** Baseline characteristics of the SRCC patients (n=16) included in this study

<b>Sex (%)</b>	
<b>Male</b>	11 (68.8)
<b>Female</b>	5 (31.2)
<b>Median age at diagnosis (range)</b>	65.9 (39.1-86.9)
<b>pT (%)</b>	
<b>pT1</b>	1 (6.3)
<b>pT2</b>	3 (18.8)
<b>pT3</b>	10 (62.5)
<b>pT4</b>	2 (12.5)
<b>Stage (%)</b>	
<b>I</b>	1 (6)
<b>II</b>	3 (20)
<b>III</b>	6 (37)
<b>IV</b>	6 (37)
<b>Median tumor size in cm (range)</b>	9.8 (4.2-25)
<b>Patients metastatic at diagnosis (%)</b>	5 (31.3)
<b>Patients suffering metastatic disease during follow-up (%)</b>	14 (87.5)
<b>Patients died of the disease (%)</b>	12 (75)
<b>Median follow-up in months (range)</b>	8.5 (1-141)
<b>One-year survival</b>	40 %
<b>Median survival in months(95% CI)</b>	9.1 (4-14.2)

**Table 2.** Clinicopathological findings in 16 SRCC cases in our series

Patient	Age	Sex	Tumor size	pTNM	Stage	Epith.component subtype	Outcome	Follow up (months)
1	41	M	9	pT3N0M1	IV	Clear cell	DOD	5
2	48	M	12	pT3N0M1	IV	Clear cell	DOD	5
3	78	M	12	pT2N0M0	II	Papillary	AWD	24
4	56	M	13,5	pT3N0M1	IV	Clear cell	DOD	4
5	68	M	13	pT4N0M1	IV	Chromophobe	Lost to follow up	
6	56	M	7,5	pT3N0M0	III	Clear cell	DOD	13
7	64	F	14	pT2N0M0	II	Chromophobe	DOD	9
8	58	M	11	pT3N0M0	III	Clear cell	DOD	28
9	72	F	10	pT3N2M0	IV	Clear cell	DOD	7
10	85	F	9	pT3N0M0	III	Chromophobe	DOD	12
11	51	M	4,2	pT3N0M0	III	Clear cell	DOD	56
12	70	M	9,5	pT4N0M1	IV	Unclassified	DOD	8
13	72	M	9,5	pT3N0M0	III	Cel clara	DOD	5
14	67	M	7	pT3N0M0	III	Clear cell	AWD	141
15	87	F	25	pT2N0M0	II	Chromophobe	DOD	8
16	68	F	4,5	pT1N0M0	I	Chromophobe	AWD	14

Explanatory legends: M, male; F, female; DOD, died of disease; AWD, alive without disease.

**Table 3.** Primer sequences for PCR amplification of exons 9, 11 of KIT and 12, 18 of PDGFRA

Exon	Primer	Primer sequences 5' - 3'
Kit 9	Ex9 F	TCCTAGAGTAAGCCAGGGCTT
	Ex 9 R	GCCTAAACATCCCCTTAAATTT
Kit 11	Ex 11 F	CCAGAGTGCTCTAATGACTG
	Ex 11 R	AGCCCCTGTTTCATACTGAC
PDGFRA 12	Ex 12 F	ACCTGTCCTGGTCATTTATAGAAACC
	Ex 12 R	CTTACCAAGCACTAGTCCATCTCTTG
PDGFRA 18	Ex 18 F	AGTCATTTCTTCCCTTTTCCATGCA
	Ex 18 R	TGGACGTACACTGCCTTTTCG

**Table 4.** Expression of KIT in the epithelial and sarcomatoid part of SRCC based on the extension of its positivity.

	Negative	Positive				p*
<b>KIT</b> (16 cases)			Focal	Moderate	Diffuse	
Epithelial (%)	11 (68.8)	6 (31.2)	0	1 (16.7)	5 (83.3)	0.131
Sarcomatoid (%)	3 (18.8)	13 (81.2)	6 (46.1)	2 (15.4)	5 (38.5)	

\*Mantel-Haenszel trend test.

**Table 5.** Expression of PDGFRA according to the score (includes extension and intensity of positivity)

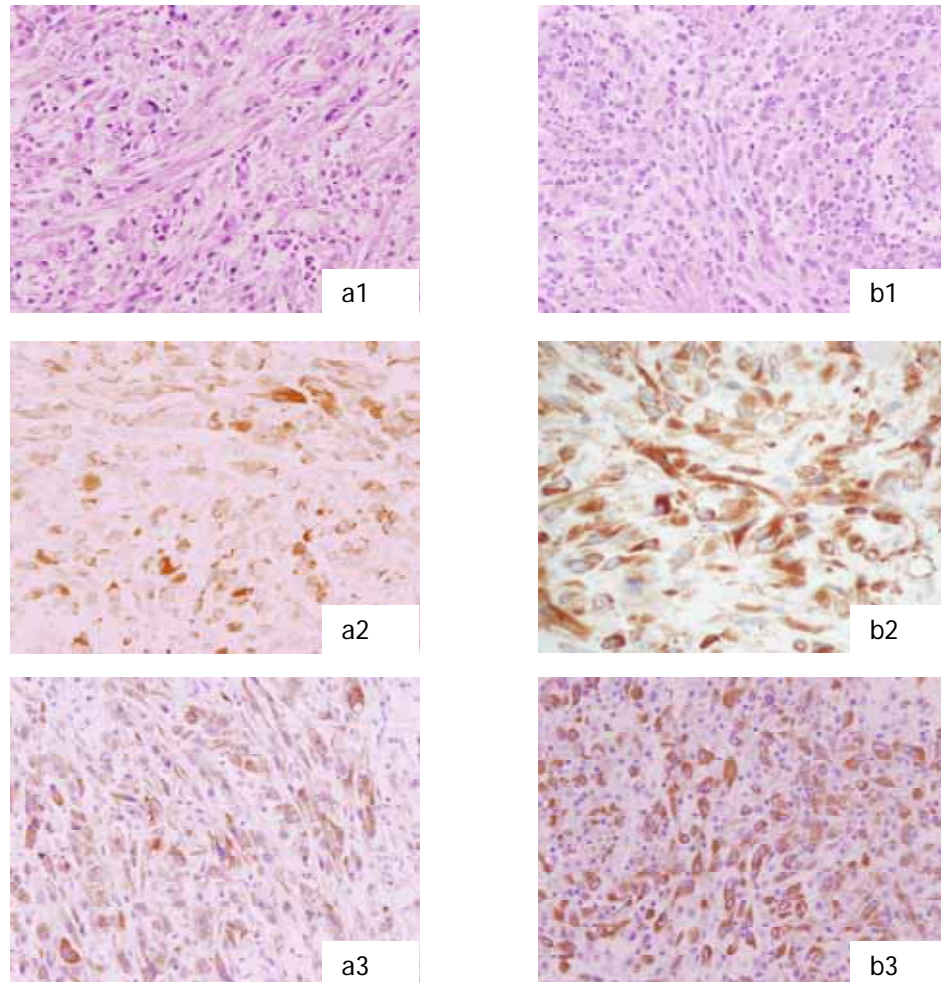
	Negative	Positive			p*
<b>PDGFRA</b> (16 cases)			Low expression	High expression	
Epithelial (%)	9 (56.3)	7 (43.7)	5 (71.4)	2 (28.6)	0.002
Sarcomatoid (%)	3 (18.8)	13 (81.2)	1 (7.7)	12 (92.3)	

\*Mantel-Haenszel trend test.

**Table 6.** KIT and PDGFRA expression considering epithelial and sarcomatoid parts independently. Cases in which KIT and PDGFRA mutational analyses were performed in the sarcomatoid component are depicted with “X”.

Cases	SRCC Subtype	KIT expression *		Mutational analysis of KIT sarcomatoid part		PDGFRA expression *		Mutational analysis of PDGFRA sarcomatoid part	
		Epithelial part	Sarcomatoid part	Exon 9	Exon 11	Epithelial part	Sarcomatoid part	Exon 12	Exon 18
1	Clear cell	0	3			0	1		
2	Clear cell	0	3	X	X	0	2	X	X
3	Papillary	0	2			0	0		
4	Clear cell	0	3			0	0		
5	Chromophobe	3	3	X	X	1	2	X	X
6	Clear cell	0	2	X	X	0	2	X	X
7	Chromophobe	3	3	X	X	0	2	X	X
8	Clear cell	0	1	X	X	0	2	X	X
9	Clear cell	0	1	X	X	2	2		
10	Chromophobe	3	1			1	0		
11	Clear cell	0	1			1	2		
12	Unclassified	0	0			1	2		
13	Clear cell	0	1			2	2		
14	Clear cell	0	0			1	2		
15	Chromophobe	3	1			1	2	X	X
16	Chromophobe	2	0			0	2	X	X

\*KIT expression. 0: absence of expression, 1: focal, 2: moderate, 3: diffuse expression. PDGFRA expression. 0: absence of expression, 1: low, 2 high expression



**Fig. 1.** Microscopic images illustrating the expression of KIT and PDGFRA in the sarcomatoid part of two SRCC cases (Hematoxylin-eosin a1 200X, b1 200X). Note the cytoplasmic positivity of **KIT** in the neoplastic cells with sarcomatoid features (a2 400X, b2 400X). Images a3 200X, b3 200X depict diffuse cytoplasmic **PDGFRA** expression in the sarcomatoid part of these two SRCC cases.

### NOTA: EXPRESSIÓ DE PDGFRB EN CARCINOMA RENAL AMB DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE

Pel que fa a l'expressió de PDGFRB en les cèl·lules tumorals: tant el component epitelial com el sarcomatoide van mostrar un baix percentatge de casos positius per aquest marcador. (31,2%) En el component epitelial la majoria de casos positius van presentar un score baix i en el sarcomatoide un score alt. Aquestes diferències no varen ser significatives.

PDGFRB cèl tumorals SCORE (n=16)	Negatiu (%)	Positiu (%)			p*
			Baixa	Alta	
<b>Part Epitelial</b>	11 (68.8)	5 (31.2)	5 (31.3)	0	<b>0.425</b>
<b>Part Sarcomatoide</b>	11 (68.8)	5 (31.2)	2 (12.5)	3 (18.8)	

**Taula 6.3.1.** Expressió de PDGFRB en les cèl·lules tumorals de la part epitelial i sarcomatoide considerant l'score (negatiu, positiu-baix, positiu-alt)

\*Mantel-Haenszel trend test.

Pel que fa a l'expressió de PDGFRB en el component vascular la majoria de casos no van expressar aquest marcador en els vasos ni en el component epitelial ni en el sarcomatoide (62%) Els casos amb vasos positius per PDGFRB van ser-ho de forma focal.

PDGFRB vascular (n=16)	Negatiu (%)	Positiu (%)			p*
			Focal	Difús	
<b>Part Epitelial</b>	10 (62.5)	6 (37.6)	5 (31.3)	1 (6.3)	<b>1</b>
<b>Part Sarcomatoide</b>	10 (62.5)	6 (37.6)	5 (31.3)	1 (6.3)	

**Taula 6.3.2.** Expressió de PDGFRB en la paret vascular de la part epitelial i sarcomatoide

\*Mantel-Haenszel trend test.

# 7. DISCUSSIÓ

## 7.- DISCUSSIÓ

### 7.1.- EXPRESSIÓ DE KIT EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS

KIT s'expressa en el Carcinoma renal **Cromòfob** i en l'**Oncocitoma**. Els altres subtipus de tumors de cèl·lules renals més freqüents (Carcinoma renal de cèl·lula clara i Carcinoma renal papil·lar) no expressen aquesta proteïna.

KIT presenta un patró de positivitat de **membrana** en les cèl·lules tumorals que és concordant amb la naturalesa d'aquesta proteïna com a Receptor transmembrana.

Aquests resultats són **concordants amb l'estudi de Yamazaki et al.** que va documentar sobreregulació de KIT (augment de mRNA) de forma **específica** en el Carcinoma renal Cromòfob i no en el Carcinoma renal de cèl·lula Clara ni el Carcinoma renal papil·lar amb la tècnica d'arrays d'expressió gènica.<sup>102</sup>

Els resultats obtinguts d'expressió proteica de KIT van ser **corroborats** per Chin-Chen Pan et al.<sup>107</sup> amb una sèrie més llarga i més completa de tumors renals. En aquest treball es va estudiar l'expressió immunohistoquímica de KIT en 256 Carcinomes renals de cèl·lula clara, 29 Carcinomes cromòfobs, 25 Carcinomes Papil·lars, 6 Carcinomes de Conductes col·lectors, 6 Carcinomes renals no classificables, 7 Oncocitomes renals, 20 Carcinomes urotelials, 7 Nefroblastomes i 23 Angiomiolipomes. L'expressió de KIT en un 83% de casos de Carcinoma Cromòfob i en un 71% d'Oncocitomes determinada en aquest estudi es pot superposar amb els resultats de la nostra sèrie.

L'expressió diferencial de KIT en els tumors de cèl·lules renals li confereix una gran **utilitat** com a **marcador** immunohistoquímic en la distinció entre els distints subtipus tumorals especialment en els casos que es planteja el dubte entre un Carcinoma renal de cèl·lula clara (KIT negatiu) i un Carcinoma Cromòfob (KIT positiu en un 88% dels casos).

Pensem que el resultat de l'expressió immunohistoquímica de KIT no substitueix la impressió morfològica i que representa una dada més que pot ser d'ajuda en aquest diagnòstic diferencial i que s'ha de complementar amb el resultat d'altres marcadors immunohistoquímics i/o d'altres estudis (ultraestructural, citogenètic...)

El **poder discriminar entre aquestes dues entitats és rellevant** des del punt de vista **pronòstic** ja que la supervivència dels pacients amb Carcinoma Cromòfob és superior a la dels pacients amb Carcinoma renal de Cèl·lula Clara. (Taula 7.1.) De fet, s'ha reportat que la supervivència als 5 anys per casos de Carcinoma renal Cromòfob és del 86,7%-100% mentre que per casos de Carcinoma renal de Cèl·lula Clara és del 68,9%-76%<sup>69 67 68</sup>

Year	Cancer-specific survival rate (SE)		
	Clear cell (N = 1985)	Papillary (N = 270)	Chromophobe (N = 102)
1	86.9 (0.8)	97.3 (1.0)	94.7 (2.3)
3	74.4 (1.0)	90.1 (2.0)	88.1 (3.4)
5	68.9 (1.1)	87.4 (2.2)	86.7 (3.6)
7	64.1 (1.2)	84.2 (2.6)	85.0 (3.9)
10	60.3 (1.3)	81.9 (2.8)	83.3 (4.2)
	1587	239	88
	1153	181	70
	931	153	60
	705	116	51
	470	76	35

**Taula 7.1.** Taxa de supervivència en diferent temps de seguiment post-cirurgia del Carcinoma renal de cèl·lula clara, Carcinoma renal papil·lar i Carcinoma renal cromòfob. Les diferències pel que fa a supervivència entre els tres subtipus van resultar significatives. ( $p < 0,001$ ).<sup>68</sup>

L'alt percentatge de casos positius per KIT tant en Oncocitoma Renal com en Carcinoma Cromòfob renal és **interessant** des d'un punt de vista **histogenètic**.

S'han publicat treballs que parlen d'un **origen comú** d'aquestes dos neoplàsies en les **cèl·lules intercalars dels túbuls col·lectors** <sup>108 109</sup>, i inclús s'hipotetitza que podrien correspondre a un espectre d'una mateixa entitat tumoral. De fet, l'Oncocitoma Renal i el Carcinoma Cromòfob comparteixen trets morfològics, ultraestructurals, citogenètics i com hem vist l'expressió proteica de KIT. En la pràctica diagnòstica es planteja molts cops el diagnòstic diferencial entre el Carcinoma cromòfob variant eosinòfila i l'Oncocitoma.

Tot i els trets comuns i les hipòtesis que apunten a una mateixa filiació d'aquestes dos neoplàsies, existeixen també trets diferencials entre elles. En aquest sentit la última classificació de la OMS considera l'Oncocitoma renal i el Carcinoma Cromòfob com dos subtipus histològics distints amb característiques clinicopatològiques pròpies.

El **mecanisme** pel qual té lloc aquesta **sobrerregulació de KIT** en Carcinoma Cromòfob i Oncocitoma renal **està encara per establir**.

Alguns estudis han desestimat que l'expressió de KIT estigui associada a mutacions en els exons 9,11,13 i 17 del gen KIT. <sup>110 107</sup> Així doncs en aquests dos tumors KIT no segueix el mecanisme molecular ni patogenètic que té en els Tumors de l'Estroma Gastrointestinal (GIST).

Per altra banda no s'ha estudiat si KIT està en una forma activa i **es desconeix si participa en l'oncogènesi d'aquests subtipus tumorals**.

Des d'un punt de vista pronòstic, l'Oncocitoma renal es considera un tumor benigne i el Carcinoma renal Cromòfob un tumor amb baix potencial maligne i amb millor pronòstic respecte als altres subtipus.

Tot i així s'han descrit i es troben casos **de Carcinoma Cromòfob agressius i metastàtics**. <sup>111</sup>

Ens podríem **plantejar si** l'expressió de **KIT** en aquest subtipus tumoral podria **representar una diana terapèutica** per aquells pacients amb Carcinoma Cromòfob recidivant o disseminat i amb una evolució clínica desfavorable.

En aquest sentit, no hi ha suficients dades en la literatura que recolzin aquesta possibilitat.

Per proposar una molècula com a diana terapèutica cal en primer lloc demostrar la implicació en la seva patogènia. Fins al moment no hi ha cap estudi que sostingui el paper actiu de KIT en l'oncogènesi del Carcinoma Cromòfob renal.



## 7.2.- EXPRESSIÓ DE PDGFR EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS.

### 7.2.1. VALOR DIAGNÒSTIC DE PDGFR EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS

Pel que fa a l'expressió de **PDGFRA en cèl·lules tumorals**; els nostres resultats posen de manifest que PDGFRA s'expressa poc en Carcinoma renal de cèl·lula clara (38%), Carcinoma renal papil·lar tipus 1 (36%), Carcinoma renal papil·lar tipus 2 (25%) i Oncocitoma renal (32%) i més en Carcinoma renal de conductes col·lectors (50%), Carcinoma renal cromòfob (70%) i Carcinoma tubular mucinós amb cèl·lules fusiformes (80%). Tot i això, **no** hi ha suficients diferències pel que fa a l'expressió de PDGFRA entre les entitats tumorals per considerar-lo un **marcador** que ajudi en el **diagnòstic** diferencial entre els distints subtipus de tumors de cèl·lules renals (Taula 6.2.1).

Pel que fa a l'expressió de **PDGFRB en cèl·lules tumorals**, la majoria de tumors de cèl·lules renals tenen un percentatge baix de casos positius per aquest marcador que oscil·la entre el 17% de casos positius en Carcinoma renal de cèl·lula clara i un 40% de casos positius en Oncocitoma renal. L' score predominant en tots els subtipus tumorals és l'1. (Taula 6.2.1).

Aquestes dades **tampoc** sostenen l'ús de PDGFRB com a **marcador** útil en el **diagnòstic** diferencial entre els diferents subtipus de tumors de cèl·lules renals.

Únicament els Tumors mucinosos tubulars amb cèl·lules fusiformes expressen PDGFRB en les cèl·lules tumorals en un alt nombre de casos (80%) amb un score 1 en tots ells. Tot i ser aquesta expressió diferent respecte als altres subtipus no es pot considerar rellevant donat el baix nombre de tumors mucinosos tubulars amb cèl·lules fusiformes considerats en la nostra serie.

Una dada que resulta molt interessant és l'expressió diferencial de **PDGFRB vascular** entre el **Carcinoma renal de cèl·lula clara** i el reste de subtipus tumorals ( $p < 0.05$ ). De fet, el Carcinoma renal de cèl·lula clara és l'únic subtipus que mostra expressió vascular per aquest marcador en un percentatge rellevant dels casos. L'expressió de PDGFRB vascular únicament en Carcinoma renal de cèl·lula clara planteja el seu possible valor com a marcador diagnòstic en aquest subtipus tumoral. Tot i això, considerem que aquesta proposta no és suficientment sòlida ja que sols un 50% de casos l'expressen. (Taula 6.2.1).

## 7.2.2. SIGNIFICAT BIOLÒGIC DE L' EXPRESSIÓ DE PDGFR EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS AMB ESPECIAL ATENCIÓ AL CARCINOMA RENAL DE CÈL·LULA CLARA

El PDGFR com ja hem comentat, és un receptor transmembrana encarregat de transduir senyals de l'exterior a l'interior de la cèl·lula. La **unió amb el seu lligand** (PDGF) fa que aquest receptor es dimeritzi, s'autofosforili i adquireixi activitat tirosina-quinasa capaç de promoure una sèrie de **cascades de transmissió de senyal de creixement i diferenciació cel·lular**.<sup>5</sup> Concretament aquest receptor s'ha implicat en proliferació de cèl·lules tumorals, fibroblasts i perícits<sup>11 10 112</sup> Es considera que PDGFR té **potencial oncogènic** ja que la seva activació desmesurada pot conduir a la transformació neoplàstica de la cèl·lula.

Es coneixen dos isoformes d'aquest receptor: l'alfa i la beta.

L'isoforma beta té un paper fonamental en els perícits on promou el seu creixement i l'acció de recobrir les cèl·lules endotelials.<sup>113</sup> Aquests fets són crucials pel desenvolupament de capil·lars funcionals en condicions fisiològiques.

A més a més, diferents treballs han descrit la participació d'aquesta isoforma del PDGFR i del seu lligand PDGF-BB en l'angiogènesi tumoral.<sup>114</sup> S'ha demostrat que la sobreproducció de PDGF per cèl·lules tumorals s'associa a un augment en el nombre de perícits, fet que estimula l'angiogènesi i el creixement tumoral.<sup>11</sup>

Fins al moment **no s'ha reportat cap estudi que impliqui PDGFR en la patogènia del Carcinoma renal papil·lar, Carcinoma Cromòfob, Oncocitoma renal, Carcinoma de conductes col·lectors i Carcinoma renal no-classificable,** .

**Ahora, considerant els nostres resultats d'expressió proteica majoritàriament negativa o baixa per PDGFRA i PDGFRB en aquests subtipus tumorals,** hipotetitzem que és poc probable que les dues isoformes d'aquest receptor tirosina-quinasa tinguin algun paper com a mediadors de creixement tumoral en aquestes entitats tumorals. **Tot i així caldrien altres estudis per justificar de forma més sòlida aquesta hipòtesi.**

**Tot i l'alt nombre de casos de Carcinoma tubular mucinós amb cèl·lules fusiformes amb expressió de PDGFRA i PDGFRB en cèl·lules tumorals, no es pot establir cap relació consistent entre aquest subtipus tumoral i l'expressió d'aquests marcadors pels pocs casos considerats en la nostra sèrie (5 casos).**

**PDGF s'ha implicat en la patogènia del Carcinoma renal de cèl·lula clara.** En aquest subtipus tumoral la pèrdua de funció de la proteïna VHL per mutacions, metilació o delecció fa que el factor de transcripció HIF-1-alfa no sigui degradat pel proteasoma, s'acumuli i promogui la transcripció en la cèl·lula tumoral de PDGF entre altres factors de creixement.<sup>41</sup>

**El paper PDGF com a factor de creixement que actui de forma autocrina sobre la cèl·lula tumoral estimulant així el seu creixement, és discutible en aquest subtipus tumoral.**

En el nostre estudi hem observat una expressió negativa i baixa majoritària per PDGFRA i PDGFRB en les cèl·lules tumorals de Carcinoma renal de cèl·lula clara. Aquests resultats no afavoreixen un paper actiu d'aquests receptors com a mediadors del creixement de la cèl·lula neoplàstica. Pensem però que caldrien altres estudis per sustentar aquesta hipòtesi de forma més sòlida.

**El paper de PDGF com a factor de creixement que actui de forma paracrina sobre les cèl·lules de la paret vascular promovent així el seu creixement i l'angiogènesi, és possible.**

De fet molts estudis parlen del paper de PDGF com un dels mediador de l'angiogènesi en el Carcinoma renal de cèl·lula clara que contribueix al fenotip tant vascularitzat d'aquest subtipus tumoral.<sup>21</sup>

L'expressió de PDGFRB en la paret vascular en Carcinoma renal de cèl·lula clara documentada en el nostre estudi per tècnica immunohistoquímica sobre mostres tissulars **ratifica la idea d'un loop paracrí** entre la cèl·lula tumoral que produiria PDGF lligand i la cèl·lula de la paret vascular (endoteli o pericit) que expressa aquesta isoforma del receptor. Per confirmar aquesta hipòtesis sobre teixit pensem que caldria analitzar l'expressió de PDGF en les cèl·lules tumorals i l'activació de PDGFR en les cèl·lules de la paret dels vasos (detecció de forma fosforilada)

Tal i com hem anotat anteriorment i sosté la literatura, els pericits són les cèl·lules de la paret vascular que expressen PDGFRB i que medien l'acció de PDGF.<sup>113,115</sup> Tot i així en el nostre treball sols hem observat expressió de PDGFRB en la paret vascular no podent discriminar quin tipus cel·lular expressa aquest marcador. Pensem que valdria la pena demostrar que són realment els pericits el tipus cel·lular que expressa PDGFRB en els casos de Carcinoma renal de cèl·lula clara amb expressió vascular d'aquest marcador. En aquest sentit, pensem que caldria fer estudis de coexpressió de PDGFRB i marcadors pericitaris (per exemple: actina) per valorar-ho.

Els nostres resultats d'expressió vascular de PDGFRB en carcinoma renal de cèl·lula clara es poden **emmarcar dins del corrent que predica el paper actiu de l'estroma en l'oncogènesi i l'existència d'una comunicació estreta i constant entre les cèl·lules tumorals i les cèl·lules de l'entorn** (cèl·lules endotelials, pericits, fibroblasts, cèl·lules inflamatòries...) <sup>1</sup>

### 7.2.3. VALOR TERAPÈUTIC DE PDGFR EN CARCINOMA RENAL DE CÈL·LULA CLARA

PDGF i PDGFR s'han proposat com a **dianes terapèutiques** en el carcinoma renal de cèl·lula clara per dos motius. En primer lloc perquè participen en la **patogènesi** d'aquest subtipus tumoral i per tant, la seva inhibició implicaria un bloqueig del creixement tumoral. En segon lloc perquè s'han dissenyat i validat **fàrmacs inhibidors selectius proteics** de PDGFR que ja s'estan implementant pel tractament de pacients amb Carcinoma renal metastàtic.<sup>112</sup> (Taula 7.2.3.)

Fàrmac	Dianes
STI157 (Imatinib)*	Bcl-Abl, c-kit , PDGFR
SU6668	VEGFR, PDGFR FGFR
SU11248(Sunitinib)	PDGFR, VEGFR, KIT, FLT-3
SU101 (Lefuonamide)	PDGFR, EGFR, FGFR
BAY 43-9006 (Sorafenib) *	c-raf, b raf, VEGFR, PDGFRB
SU5416 (Semaxanib)	FLK/KDR, PDGFR
PKC412 (Midostaurin)	PKC, VEGFR, PDGFR, CKIT
CPD860	PDGFR
CP-673, 451	PDGFR
PTK787 (Vatalanib)	VEGFR, PDGFR CKIT

**Taula 7.2.3.** Inhibidors del receptor de PDGF en desenvolupament clínic

Com ja hem comentat i apunten molts estudis, la inhibició de PDGFR en carcinoma renal de cèl·lula clara promou un efecte antiangiogènic. Es postula que la inhibició de PDGFR bloquejaria el creixement dels pericits i la maduració dels vasos.<sup>21</sup>

En el carcinoma renal de cèl·lula clara VEGF també actua com un promotor de l'angiogènesi. Es tracta també d'un factor de creixement sobreexpressat per la inhibició de la funció del gen VHL. VEGF actua directament sobre les cèl·lules endotelials promovent el seu creixement.

La inhibició de l'angiogènesi es considera un abordatge terapèutic contra el càncer que bloqueja l'aport vascular de nutrients al tumor.<sup>116</sup>

En el carcinoma renal de cèl·lula clara aquesta estratègia té una gran rellevància per paper crucial de l'angiogènesi mediada per VEGF i PDGF en la patogènia d'aquesta entitat.

Models preclínic documenten un efecte beneficiós de la inhibició conjunta de PDGFR i VEGF en Carcinoma renal.<sup>117</sup>

A més a més un estudi pre-clínic publicat recentment, demostra que la sobreexpressió de PDGF-D en una línia cel·lular de carcinoma renal (SN12-C) implantada ortotòpicament en un ratolí immunodeficient, promou el creixement tumoral, l'angiogènesi i el desenvolupament de metastasi a través de l'activació PDGFRB. En aquest mateix article també es documenta com la inhibició de l'expressió de PDGF-D per RNA d'interferència (shRNAi) i el bloqueig de PDGFRB per Gleevec arriben a inhibir el creixement i les metastasis pulmonars de les cèl·lules carcinoma renal implantades en aquest model animal.<sup>99</sup>

Aquests principis s'han traslladat a la clínica. I s'han dut a terme assajos clínics en pacients amb carcinoma renal metastàtic amb fàrmacs inhibidors proteics de PDGFR que han obtingut resultats esperançadors.

Entre els molts fàrmacs inhibidors proteics assajats destaquem pels seus resultats el Sunitinib i el Sorafenib.

En un assaig clínic en fase III el Sunitinib (SUTENT SU11248)\_(inhibidor multiquinasa selectiu que bloqueja VEGFR-2, PDGFR-beta, FLT3 i KIT) comparat amb interferó alfa va aconseguir una supervivència mitja lliure de progressió superior i significativa (11 mesos) respecte l'interferó alfa (5 mesos) (P<0,001). El Sunitinib també es va associar amb una major resposta objectiva respecte l'interferó alfa 31% vs 6% (p<0,001) i a una millor qualitat de vida dels pacients.<sup>93</sup>

Davant els resultats obtinguts en aquests assajos clínics, el **Gener del l'any 2006** la FDA va aprovar el Sunitinib pel tractament del Càncer renal metastàtic.

En un assaig clínic en fase III randomitzat de Sorafenib (BAY43-9006) (inhibidor multiquinasa que actua sobre les proteïnes VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-beta, Raf kinase, FLT3 i c-KIT) vs placebo en pacients amb càncer renal sense resposta a la teràpia sistèmica biològica (IFN-a o interleuquina-2) es va demostrar que el Sorafenib perllongava la supervivència lliure de malaltia 5,5 mesos comparat amb placebo 2,8 mesos. (p<0.00001)

El Sorafenib es va aprovar el **Desembre del 2005 per la FDA** pel tractament del Carcinoma renal metastàtic.<sup>89</sup>

Tot i la implementació del Sunitinib i Sorafenib, entre altres fàrmacs, pel tractament dels pacients amb Carcinoma renal metastàtic, no s'han establert encara **marcadors de resposta a aquestes noves teràpies biològiques** ni metodologies que poguessin indicar la droga més selectiva i eficaç per un determinat pacient.

Es pensa que la biologia de cada tumor dictamina el seu comportament i sensibilitat a fàrmacs inhibidors proteics. En aquesta direcció s'està fent un gran esforç per buscar molècules i establir metodologies (estudi mutacional, estudi d'expressió proteica...) que permetin predir la resposta a un determinat tractament.

L'objectiu d'aquesta recerca és establir un "perfil de sensibilitat" a les teràpies biològiques individualitzada per cada pacient. D'aquesta manera es podria indicar quins són els fàrmacs més eficaços per combatre la malaltia i es podria evitar l'exposició a drogues costoses i no exemptes de toxicitat a aquells pacients que no respondran a una determinada teràpia.

En aquesta línia s'està proposant l'expressió immunohistoquímica de proteïnes amb implicació patogènica i que són dianes terapèutiques com possibles marcadors de resposta a tractament. Pensem que l'expressió vascular de PDGFRB podria considerar-se un bon candidat a marcador terapèutic.

Els nostres resultats d'expressió vascular de PDGFRB en carcinoma renal de cèl·lula clara ens fan plantejar si els tumors que més expressen aquest marcador són els que podrien ser més sensibles a les teràpies inhibidores d'aquesta tirosina-quinasa. Per contrastar aquesta hipòtesi caldria un treball conjunt amb assajos clínics de pacients amb càncer renal metastàtic tractats amb inhibidors proteics de PDGFRB. D'aquesta manera es podria valorar si existeix o no una relació entre expressió vascular d'aquest marcador amb resposta al tractament.

#### 7.2.4. VALOR PRONÒSTIC DE PDGFR EN CARCINOMA RENAL DE CÈL·LULA CLARA

Quan es consideren tots els tumors de cèl·lules renals agrupats, l'expressió de PDGFRA i PDGFRB en les cèl·lules tumorals no té significació pronòstica (Figures 6.2.5 i 6.2.6).

Per contra, els resultats de l'estudi estadístic de supervivència considerant l'expressió vascular de PDGFRB són significatius i un tant desconcertants (Figura 6.2.7.). S'observa com l'expressió negativa i difusa de PDGFRB vascular s'associa a una millor supervivència que l'expressió vascular focal ( $p < 0.05$ ).

La manca d'expressió vascular de PDGFRB en Carcinoma renal Cromòfob, Carcinoma Papil·lar i Carcinoma mucinós tubular amb cèl·lules fusiformes, tots ells amb un pronòstic més favorable que el Carcinoma renal de cèl·lula clara, podria estar condicionant aquests resultats de supervivència.

En canvi, quan es contempla sols el subtipus Carcinoma renal de cèl·lula clara:, una alta expressió de PDGFRA en les cèl·lules tumorals s'associa a una pitjor evolució clínica (amb un temps a la progressió i a la mort més curts) respecte als tumors que presenten una baixa expressió de PDGFRA (Figura 6.2.8.). El perquè d'aquest fet es desconeix.

Ahora l'expressió de PDGFRA i PDGFRB en les cèl·lules tumorals es correlaciona amb el grau Fuhrman de forma significativa essent els tumors amb major grau Fuhrman els que presenten un nombre major de casos amb expressió alta per aquests marcadors (Taula 6.2.2.) En el cas de PDGFRA, els nostres resultats són concordants amb l'estudi de Sulzbacher et al que va documentar que l'expressió de PDGFRA era significativament superior en els carcinomes renals de cèl·lula clara de grau Fuhrman 3 i 4 respecte els de grau 1 i 2. (p 0,02)

Quan es contempla sols el subtipus Carcinoma renal de cèl·lula clara, els casos amb expressió negativa o focal de PDGFRB vascular tenen una tendència tot i que no significativa a un pitjor pronòstic. En canvi els tumors amb expressió vascular difusa per PDGFRB tenen una tendència a una millor evolució (Figures 6.2.10. i 6.2.11.)

Queda sobre la taula si aquestes tendències són fruit de l'atzar o podrien indicar algun event biològic que correlaciones menor expressió vascular de PDGFRB amb més agressivitat tumoral i pitjor pronòstic.

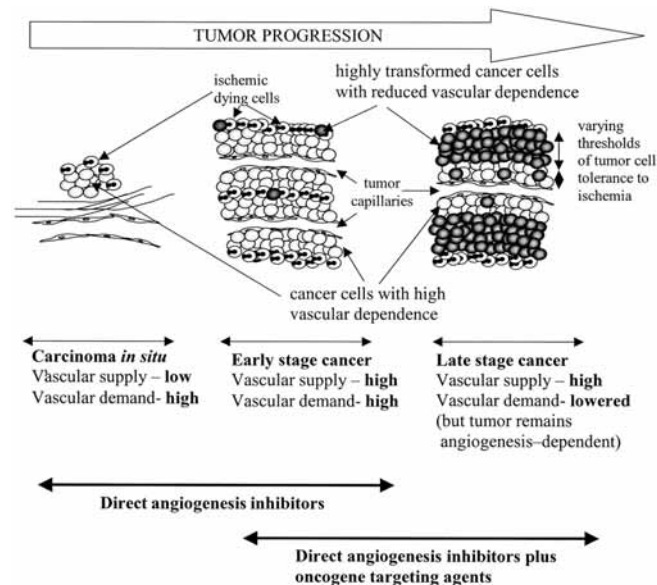
Si l'expressió vascular de PDGFRB s'associa a una promoció de l'angiogènesi i teòricament a un major creixement tumoral, perquè els tumors amb una expressió difusa de PDGFRB evolucionen més favorablement?

En la literatura trobem un estudi que proposa un model en el qual a mesura que el tumor guanya en agressivitat esdevé més independent de l'angiogènesi per créixer.<sup>118</sup> (veure figura 7.2.4.)

A la llum d'aquest model els nostres resultats podrien indicar que els tumors menys agressius i més dependents de l'angiogènesi podrien expressar més PDGFRB en la paret vascular.

En canvi, podriem pensar que els tumors més agressius i amb pitjor pronòstic serien els més independents de l'angiogènesi i expressarien menys PDGFRB en la paret vascular.

Pensem que caldrien altres estudis per contrastar aquestes hipòtesis i per valorar el sentit biològic que podria tenir la major o menor expressió vascular d'aquest marcador en Carcinoma renal de cèl·lula clara.



**Figura 7.2.4.**Figura que il·lustra la relació entre les cèl·lules tumorals i la vasculatura durant la progressió tumoral proposada per Rak et al.<sup>118</sup>

### 7.3.- EXPRESSIÓ I ESTUDI MUTACIONAL DE KIT I PDGFR EN CARCINOMA RENAL AMB DIFERENCIACIÓ SARCOMATOIDE.

El nostre estudi ha evidenciat una **sobreexpressió proteica de KIT i PDGFRA en la part sarcomatoide** (94,7% casos positius per KIT i 81,2% casos positius per PDGFRA) respecte a la part epitelial (16% casos positius per KIT i 43,7% casos positius per PDGFRA) dels carcinomes renals amb aquesta desdiferenciació.<sup>119</sup>

En canvi la isoforma beta de PDGFR (PDGFRB) no es sobreexpressa en el component sarcomatoide (31,2% casos positius en la part sarcomatoide versus 31,2% casos positius en la part epitelial).

**Dos grups més han estudiat l'expressió de KIT en Carcinoma renal amb diferenciació sarcomatoide** amb resultats molt diferents respecte als nostres.<sup>120 121</sup>

En una comunicació al Congrés Americà d'Anatomia Patològica del 2005 (USCAP) Bishu et al en una serie de 25 casos de Carcinoma renal amb diferenciació sarcomatoide va documentar expressió de KIT en la part sarcomatoide de 7 casos (**28%**).

En un altre treball, Sengupta et al es van estudiar 123 casos de Carcinoma renal amb diferenciació sarcomatoide i sols en un **4,1%** d'ells es va observar expressió per KIT.

Aquesta diferència de percentatge entre els nostres resultats i els obtinguts per aquests dos altres autors ens va fer revisar i comparar els protocols immunohistoquímics dels tres treballs. L'anticòs emprat fou el mateix pels tres grups KIT (DAKO, A 4502) La dilució utilitzada per Segupta et al fou de 1/600 i en el nostre estudi de 1/100. La dilució emprada per Bishu et al no es va reportar. En els tres treballs els controls positiu i negatiu es van dur a terme correctament. La diferència en la dilució de l'anticòs primari entre el nostre estudi i el de Segupta podria justificar les diferències en el percentatge de casos positius observats.

En el nostre cas l'ús d'una concentració més elevada per KIT augmentaria la sensibilitat de la tècnica per detectar aquesta proteïna en teixit.

A partir d'aquests resultats ens vam plantejar si **la sobreexpressió de KIT i PDGFRA en la part sarcomatoide podria estar relacionada amb aquesta diferenciació**. Per contrastar aquesta possibilitat caldria realitzar altres estudis per determinar si aquestes proteïnes intervenen en la transformació d'un fenotip i morfologia epitelial devers un de sarcomatoide en el carcinoma renal.

Per altra banda, la sobreexpressió de KIT i PDGFRA en la part sarcomatoide d'aquests tumors posa sobre la taula **el seu possible ús com a dianes terapèutiques** ja que ambdues proteïnes poden ser inhibides per les teràpies biològiques.

Com ja hem comentat, el carcinoma renal amb diferenciació sarcomatoide no té un tractament efectiu i és un tumor molt agressiu amb una supervivència mitja d'entre 6 i 19 mesos. Els règims quimioteràpics assajats en els últims anys han estat poc exitosos i s'estan buscant nous abordatges terapèutics per aquests malalts.<sup>62,64</sup>

Des de l'aprovació l'any 2001 de l'Imatinib com una teràpia efectiva pel tractament de pacients amb GIST i LMC, s'han anat succeint nombrosos estudis caracteritzant l'expressió de les dianes de l'Imatinib (KIT, PDGFR fonamentalment) en diferents tumors amb la idea d'expandir l'ús d'aquest tractament per altres neoplasies.<sup>122</sup>

Si bé es pensava que l'expressió d'aquestes tirosina-quinases en els tumors (per exemple KIT) era suficient per proposar el tractament amb els seus corresponents fàrmacs inhibidors proteics (per exemple Imatinib), en l'actualitat no s'accepta aquest supòsit.

De fet molts assajos clínics amb Imatinib en tumors amb expressió de les seves dianes moleculars (per exemple carcinoma pulmonar de cèl.lula petita o adenocarcinoma de pròstata) no han aconseguit respostes clíniques.<sup>123 124 22</sup>

En aquest moment, es considera que la teràpia amb inhibidors proteics sols és efectiva en aquells tumors on s'estan bloquejant proteïnes que tenen un rol essencial en la seva



oncogènesis. Per tant, no es pot inferir sensibilitat a l'Imatinib només en base a l'expressió immunohistoquímica de les seves dianes moleculars.

**Per tant es sosté la següent correlació: expressió d una proteïna diana- implicació en oncogènesis - i resposta efectiva a un fàrmac inhibidor selectiu proteic.**

**En el GIST per exemple, el KIT es sobreexpressa i també participa en la seva patogènia.**

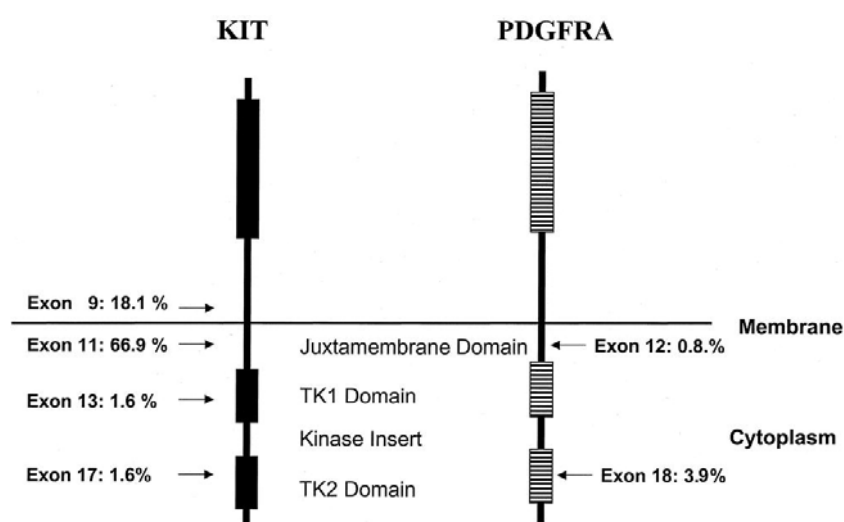
**De fet, mutacions en el seu proto-oncogen condicionen una activació constitutiva de la proteïna que condueix a la transformació neoplàstica. En aquest cas la teràpia amb Imatinib és efectiva.**<sup>125</sup>

Amb aquest rerafons i en analogia amb el GIST ens vam preguntar si la sobreexpressió de PDGFRA i KIT en la diferenciació sarcomatoide s'associava a mutacions en els seus proto-oncogens. Vam considerar rellevant explorar aquesta hipòtesis ja que si es confirmava el PDGFRA i el KIT podrien adquirir un valor com a dianes terapèutiques en aquests tumors.

En el nostre estudi ens vam centrar en l'anàlisi mutacional dels dominis jxtamembrana i catalítics de KIT i PDGFRA on s'han trobat les mutacions amb guany de funció en el GIST. (Figura 7.3)

<sup>25,106 14 125</sup>

Ens vam fixar especialment en els exons 9 i 11 de KIT que són els que presenten mutacions associades amb més alta resposta al tractament amb Imatinib.<sup>25</sup>



**Figura 7.3.** En aquest esquema es representa de forma esquemàtica l'estructura de KIT i PDGFRA amb els seus diferents dominis. Es troba anotat en percentatge els dominis on s'han descrit les mutacions amb guany de funció en el GIST.<sup>25</sup>

A partir del nostre estudi podem concloure que les mutacions no són el mecanisme subjacent a la sobreexpressió de KIT i PDGFRA en la diferenciació sarcomatoide. El mecanisme pel qual té lloc aquesta sobreexpressió i si aquesta participa en la patogènia d'aquests tumors encara està per definir.

Per tant, en l'actualitat **no es disposa de la suficient evidència científica** per proposar l'Imatinib com a tractament efectiu pels pacients amb Carcinoma renal amb diferenciació Sarcomatoide.

## 7.4. ESTUDIS D'EXPRESSIONI PROTEICA DE DIANES MOLECULARS EN TUMORS DE CÈL·LULES RENALS

### 7.6.1. SITUACIÓ ACTUAL

La comprensió de la patogènia dels diferents subtipus de tumors de cèl·lules renals, especialment del subtipus carcinoma renal de cèl·lula clara, ha permès identificar molècules i alteracions moleculars amb gran potencial pronòstic i terapèutic.

En aquest sentit s'han fet i estan en marxa estudis que avaluen la validesa pronòstica i terapèutica d'alteracions genètiques, perfils d'expressió gènica i proteica amb diferents metodologies. L'estudi d'expressió de proteïnes amb potencial oncogènic i que són dianes terapèutiques en tumors de cèl·lules renals està en aquesta línia.<sup>74,101</sup>

El carcinoma renal presenta una evolució difícil de predir.<sup>126</sup> Tot i els factors pronòstics establerts (pTNM, subtipus tumoral, performance status etc...) es necessiten nous sistemes o paràmetres pronòstics més acurats.<sup>75</sup>

Alguns estudis han proposat l'expressió de proteïnes oncogèniques com CA IX, PTEN, entre d'altres com a paràmetres moleculars amb valor pronòstic útils a incorporar en el seguiment clínic dels malalts amb carcinoma renal.

<sup>72,127</sup>

El carcinoma renal de cèl·lula clara és un dels tipus tumorals on les teràpies biològiques s'han implementat amb gran èxit en base al coneixement de la seva patogènia.

<sup>78,128</sup> <sup>40,82</sup> Els bons resultats amb fàrmacs inhibidors proteics pel tractament de carcinoma renal metastàtic han precipitat recentment l'aprovació per la FDA de Sunitinib (2006) i Sorafenib (2005) pel tractament d'aquests malalts.

En aquest context actualment s'estan buscant marcadors capaços de definir el perfil de sensibilitat d'un tumor per cadascun d'aquests fàrmacs biològics.

L'expressió de proteïnes oncogèniques es torna a proposar com una via per explorar marcadors de resposta a aquests tractaments.

### 7.6.2. LA NOSTRA EXPERIÈNCIA

Amb el rerafons de la necessitat de nous marcadors moleculars que ajudin en l'avaluació pronòstica i maneig terapèutic dels malalts amb càncer renal, aquest treball s'ha fixat en l'expressió proteica en mostres tissulars de tumors renals de dos proteïnes oncogèniques i que són dianes terapèutiques : KIT i PDGFR

Pensem que l'estudi d'expressió proteica per immunohistoquímica sobre mostres tissulars és una metodologia accessible i a partir de la qual es pot treure molta informació ja que:

Ofereix la possibilitat de valorar en quins compartiments cel·lulars i en quins tipus cel·lulars s'expressen les proteïnes que estudiem. Per exemple, hem observat que l'expressió de KIT és fonamentalment de membrana en les cèl·lules tumorals del Carcinoma renal Cromòfob i de l'Oncocitoma renal. També hem evidenciat expressió de PDGFRB en la paret vascular d'alguns casos de Carcinoma renal de cèl·lula clara.

Pot complementar la informació d'altres estudis fets amb altres metodologies. Per exemple Yamazaki et al va demostrar sobreexpressió gènica de KIT en Carcinoma renal Cromòfob i en el nostre estudi la vam documentar per expressió proteica.

Permet correlacionar els valors d'expressió amb paràmetres d'evolució clínica (temps fins a la recurrència, temps fins a la mort...) i estudiar el seu valor pronòstic. Per exemple, hem vist que l'expressió alta de PDGFRA en Carcinoma renal de cèl·lula clara s'associa a un pitjor pronòstic.

Permet correlacionar els valors d'expressió amb resposta a un determinat tractament biològic i estudiar el seu valor terapèutic. Per exemple, hem proposat estudiar si l'expressió vascular de PDGFRB podria estimar la resposta a fàrmacs inhibidors proteics d'aquest receptor.

Ahora pensem que els estudis d'expressió proteica tenen les seves limitacions:

L'expressió d'una proteïna en un tumor no implica participació en l'oncogènesi ni és criteri suficient per plantejar l'eficàcia terapèutica del seu inhibidor proteic. L'expressió immunohistoquímica de KIT en el GIST i l'èxit del tractament amb Imatinib en aquests tumors va conduir a considerar que l'expressió d'aquesta diana molecular era sinònim d'eficàcia a l'Imatinib en altres neoplàsies.

Actualment es sosté que l'expressió de KIT no és en si mateixa la causa de resposta a l'Imatinib sino un fet derivat de la patogènia del GIST. Mutacions amb guany de funció en el gen KIT condueixen a una activació constitutiva de la proteïna que és responsable de la transformació neoplàstica. Paral·lelament aquest event mutacional condueix a la no degradació i acúmulo de KIT esdevenint-se la sobreexpressió proteica. En l'actualitat es considera que la participació d'una molècula en la patogènesi d'un tumor és el fet essencial per plantejar la seva inhibició amb teràpies biològiques.

En el nostre treball ens hem fet ressò d'aquestes consideracions i hem reavaluat la nostra proposta de tractament amb Imatinib pels pacients amb Carcinoma sarcomatoide renal.

Per altra banda, hem plantejat l'expressió vascular de PDGFRB com un possible marcador terapèutic en el Carcinoma renal de cèl·lula clara. Creiem que caldria valorar en el context d'assajos clínics si aquesta expressió vascular s'associa a resposta als seus corresponents inhibidors proteics. Aquesta proposta no és sosté tant sols en l'expressió immunohistoquímica de PDGFRB vascular si no en la participació de PDGF lligand en la patogènia del Carcinoma renal de cèl·lula clara. A partir dels nostres resultats i la literatura revisada, pensem que l'expressió vascular de PDGFRB media l'angiogènesi en aquest tipus tumoral i representa una diana terapèutica i un potencial marcador de resposta.

Per altra banda, amb la nostra experiència ratifiquem la gran utilitat dels microarrays de teixit. De fet, l'estudi d'expressió de PDGFRA i PDGFRB es va realitzar sobre arrays de teixit, fet que ens va permetre estudiar un gran nombre de tumors renals, disminuir costos, assegurar una homogeneïtat de condicions de processament i també agilitzar la valoració de les mostres. Un desavantatge és que sols petites quantitats de teixit tumoral s'analitzen. Per tant, es podria posar en dubte si els resultats obtinguts es podrien extrapolar als que es tindrien en tall sencer. De totes maneres el representar 3 cores de teixit per cada cas i valorar sols els casos que tenen al menys 2 cores viables, estableix unes condicions de reproductibilitat acceptables.

### 7.6.3. REPTES DE FUTUR

Els avanços en la comprensió de biologia tumoral dels diferents subtipus de Carcinoma renal han permès proposar nous marcadors moleculars amb potencial valor pronòstic i terapèutic.

Davant aquesta realitat el repte immediat passa pel contrast i validació d'aquests marcadors per tal que puguin ser desestimats o incorporats en la pràctica clínica tant aviat com sigui possible.

En aquest procés d'implementació es plantegen moltes preguntes:

Es podran integrar aquests nous marcadors amb els paràmetres pronòstics clàssics per millorar el seguiment i predir el risc de metastasi o bona /mala evolució dels pacients? <sup>129</sup>

Quines seran les metodologies més adequades per definir el tractament target més idoni i eficaç per un determinat pacient amb càncer renal metastàtic? Seran els perfils d'expressió proteica de les dianes en el tumor, els perfils d'expressió gènica o altres? <sup>83</sup>

Serà l'Anatomia patològica la disciplina que definirà a partir del teixit tumoral aquests marcadors moleculars pronòstics i/o terapèutics? O bé seran marcadors sèrics o radiològics els indicadors d'evolució o resposta a tractament ? o bé una combinació de tots ells?

Pensem que l'Anatomia Patològica pot ajudar a respondre aquestes preguntes si té un paper actiu i interlocutor amb la clínica per correlacionar marcadors moleculars del tumor amb evolució del pacient i resposta a les teràpies biològiques en el marc d'assajos clínics.

Per altra banda, no podem oblidar que la biologia tumoral és molt complexa i que calen encara molt esforços des de la recerca bàsica per seguir aprofundint en la patogènia dels diferents subtipus de carcinoma renal.

Tot i que es coneixen molts dels protagonistes que intervenen en la transformació neoplàstica en càncer renal, el futur està obert a la identificació de noves molècules oncogèniques que poden esdevenir noves dianes moleculars. En la mesura en que l'Anatomia patològica estigui atenta a aquests descobriments podrà participar i contribuir en el diàleg translacional entre la biologia del càncer i la seva aplicació clínica.

En el fons de tota aquesta revolució científica i de tota aquesta voluntat per ser capaços de combatre el càncer està el malalt oncològic, principal referent i a qui no es pot perdre de vista per tal que tots els esforços puguin anar dirigits a millorar la seva esperança i qualitat de vida.

# 8. CONCLUSIONS

## 8.- CONCLUSIONS

1. Dins del grup de tumors de cèl·lules renals **KIT** s'expressa selectivament en el **Carcinoma renal Cromòfob** i l'**Oncocitoma** amb un patró de membrana característic.
2. L'expressió immunohistoquímica de **KIT és un marcador útil en el diagnòstic diferencial** entre el Carcinoma renal Cromòfob i el Carcinoma renal de cèl·lula clara
3. L'expressió de **KIT no és útil per discriminar** entre Carcinoma renal cromòfob i Oncocitoma ja que ambdòs tumors presenten aquest marcador en un alt percentatge de casos
4. L'expressió compartida de KIT en Carcinoma renal Cromòfob i Oncocitoma representa una dada a favor de les teories que sostenen un **mateix origen histopatogenètic** d'aquestes dues entitats tumorals.
5. L'expressió proteica de KIT en el Carcinoma renal Cromòfob per tècnica immunohistoquímica **corroborà el treball de Yamazaki** et al que va documentar sobreexpressió gènica de KIT (mRNA) en aquest mateix subtipus tumoral
6. **PDGFRA** no segueix cap patró d'expressió selectiva en els diferents subtipus de tumors de cèl·lules renals que permeti plantejar el seu ús com a marcador diagnòstic.
7. L'expressió alta en cèl·lules tumorals de **PDGFRA** s'associa a un pitjor pronòstic i a un major grau Fuhrman en el Carcinoma renal de cèl·lula clara.
8. L'**expressió vascular de PDGFRB** en alguns casos de Carcinoma renal de **cèl·lula clara** podria estar en relació amb la seva **patogènia** i amb l'existència d'un loop paracrí entre la cèl·lula tumoral productora de PDGF lligand i cèl·lules de la paret vascular amb expressió de PDGFRB.
9. La troballa d'expressió de PDGFRB en la paret vascular, referma el **paper de la isoforma beta del receptor de PDGF en l'angiogènesi** del Carcinoma renal de cèl·lula clara.
10. Els nostres resultats afavoreixen el **valor de PDGFRB com a diana terapèutica en Carcinoma renal de cèl·lula clara** i l'ús d'inhibidors proteics selectius contra aquest receptor amb finalitat antiangiogènica
11. Els nostres resultats plantegen la necessitat de contrastar el valor de PDGFRB com a **marcador terapèutic** en assajos clínics per valorar si l'expressió vascular de PDGFRB es podria associar a una major sensibilitat a fàrmacs inhibidors selectius proteics contra aquest receptor.

12. La **diferenciació sarcomatoide** dels Carcinomes renals **sobreexpressa KIT i PDGFRA** respecte a la part epitelial. No es coneix el mecanisme molecular d'aquesta sobreexpressió ni si aquestes proteïnes tirosina-quinasa poden tenir un paper actiu en aquesta transformació.
13. **Mutacions** amb guany de funció en els exons 9,11,13,17 de KIT i 12, 18 de PDGFRA, característiques de la patogènia del GIST i responsables de l'eficàcia de l'Imatinib **no s'han trobat en la diferenciació sarcomatoide** de carcinomes renals amb sobreexpressió proteica de KIT i PDGFRA. Per tant, considerem que fins al moment no hi ha prou evidència científica per plantejar l'efectivitat del tractament amb Imatinib en els pacients amb Carcinoma renal amb diferenciació sarcomatoide.
14. L'estudi d'**expressió proteica de proteïnes oncogèniques** mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica sobre mostres tissulars de tumors renals és **útil per contrastar el seu potencial valor diagnòstic, pronòstic i terapèutic**.
15. L'**Anatomia Patològica té un paper molt important en l'abordatge translacional del carcinoma renal** ja que pot participar en el **diàleg** entre els coneixements de la biologia tumoral i la seva implementació clínica.
16. L'**Anatomia Patològica pot contribuir decisivament** alhora de definir marcadors moleculars pronòstics i terapèutics per millorar el seguiment i les pautes de tractament biològic dels pacients amb carcinoma renal.

## **9. BIBLIOGRAFIA**



## 9- BIBLIOGRAFIA

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
2. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001;411:355-365.
3. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103:211-225.
4. Tibes R, Trent J, Kurzrock R. Tyrosine kinase inhibitors and the dawn of molecular cancer therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:357-384.
5. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990;61:203-212.
6. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:1037-1051.
7. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*. 1987;6:3341-3351.
8. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol*. 1994;55:1-96.
9. Funa K, Uramoto H. Regulatory mechanisms for the expression and activity of platelet-derived growth factor receptor. *Acta Biochim Pol*. 2003;50:647-658.
10. Pietras K, Sjoblom T, Rubin K et al. PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell*. 2003;3:439-443.
11. Ostman A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:275-286.
12. Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc*. 2006;81:1241-1257.
13. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 2003;299:708-710.
14. Rubin BP, Singer S, Tsao C et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*. 2001;61:8118-8121.
15. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 1998;279:577-580.
16. Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature*. 2004;432:294-297.
17. Chen EX, Siu LL. Development of molecular targeted anticancer agents: successes, failures and future directions. *Curr Pharm Des*. 2005;11:265-272.
18. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:361-370.
19. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:714-727.
20. Adjei AA, Hidalgo M. Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2005;23:5386-5403.

21. Stadler W. Chromosomes, hypoxia, angiogenesis, and trial design: a brief history of renal cancer drug development. *Clin Cancer Res*. 2007;13:1630-1633.
22. Druker BJ. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv Cancer Res*. 2004;91:1-30.
23. Hughes TP, Kaeda J, Branford S et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;349:1423-1432.
24. Morin MJ. From oncogene to drug: development of small molecule tyrosine kinase inhibitors as anti-tumor and anti-angiogenic agents. *Oncogene*. 2000;19:6574-6583.
25. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol*. 2003;21:4342-4349.
26. Corless CL, Schroeder A, Griffith D et al. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol*. 2005;23:5357-5364.
27. Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med*. 2001;344:1052-1056.
28. Demetri GD, von MM, Blanke CD et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med*. 2002;347:472-480.
29. Pérez-Farinós N, López-Abente G, Pollán M et al. Incidencia y mortalidad por cáncer de riñón en España. Centro Nacional de Epidemiología. Boletín epidemiológico España. vol 10, 9-12. 2002.  
Ref Type: Report
30. Flanigan RC, Campbell SC, Clark JI et al. Metastatic renal cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2003;4:385-390.
31. Bukowski RM, Negrier S, Elson P. Prognostic factors in patients with advanced renal cell carcinoma: development of an international kidney cancer working group. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6310S-6314S.
32. Atkins MB, Regan M, McDermott D. Update on the role of interleukin 2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6342S-6346S.
33. Eble JM, Sauter G, Epstein JC et al. Tumors of the Kidney. *Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs*. 2004; IARC press.
34. Reuter VE. The pathology of renal epithelial neoplasms. *Semin Oncol*. 2006;33:534-543.
35. Zambrano NR, Lubensky IA, Merino MJ et al. Histopathology and molecular genetics of renal tumors toward unification of a classification system. *J Urol*. 1999;162:1246-1258.
36. van den BE, Dijkhuizen T, Oosterhuis JW et al. Cytogenetic classification of renal cell cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;95:103-107.

37. Linehan WM, Pinto PA, Srinivasan R et al. Identification of the genes for kidney cancer: opportunity for disease-specific targeted therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2007;13:671s-679s.
38. Latif F, Tory K, Gnarr J et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*. 1993;260:1317-1320.
39. Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ et al. Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature*. 1988;332:268-269.
40. Linehan WM, Vasselli J, Srinivasan R et al. Genetic basis of cancer of the kidney: disease-specific approaches to therapy. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6282S-6289S.
41. Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13:680s-684s.
42. Sukosd F, Kuroda N, Beothe T et al. Deletion of chromosome 3p14.2-p25 involving the VHL and FHIT genes in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63:455-457.
43. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2005;353:2477-2490.
44. Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6290S-6295S.
45. Fergelot P, Rioux-Leclercq N, Patard JJ. [Molecular pathways of tumour angiogenesis and new targeted therapeutic approaches in renal cancer]. *Prog Urol*. 2005;15:1021-1029.
46. Iliopoulos O, Kibel A, Gray S et al. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med*. 1995;1:822-826.
47. Suzigan S, Lopez-Beltran A, Montironi R et al. Multilocular cystic renal cell carcinoma : a report of 45 cases of a kidney tumor of low malignant potential. *Am J Clin Pathol*. 2006;125:217-222.
48. Delahunt B, Eble JN, McCredie MR et al. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum Pathol*. 2001;32:590-595.
49. Argani P. The evolving story of renal translocation carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2006;126:332-334.
50. Argani P, Lal P, Hutchinson B et al. Aberrant nuclear immunoreactivity for TFE3 in neoplasms with TFE3 gene fusions: a sensitive and specific immunohistochemical assay. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:750-761.
51. Argani P, Ladanyi M. Translocation carcinomas of the kidney. *Clin Lab Med*. 2005;25:363-378.
52. Argani P, Olgac S, Tickoo SK et al. Xp11 translocation renal cell carcinoma in adults: expanded clinical, pathologic, and genetic spectrum. *Am J Surg Pathol*. 2007;31:1149-1160.
53. Argani P, Lae M, Hutchinson B et al. 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*. 2005;29:230-240.

54. Polascik TJ, Cairns P, Epstein JI et al. Distal nephron renal tumors: microsatellite allelotyping. *Cancer Res.* 1996;56:1892-1895.
55. Ferlicot S, Allory Y, Comperat E et al. Mucinous tubular and spindle cell carcinoma: a report of 15 cases and a review of the literature. *Virchows Arch.* 2005;447:978-983.
56. Fine SW, Argani P, DeMarzo AM et al. Expanding the histologic spectrum of mucinous tubular and spindle cell carcinoma of the kidney. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:1554-1560.
57. Brandal P, Lie AK, Bassarova A et al. Genomic aberrations in mucinous tubular and spindle cell renal cell carcinomas. *Mod Pathol.* 2006;19:186-194.
58. Paner GP, Srigley JR, Radhakrishnan A et al. Immunohistochemical analysis of mucinous tubular and spindle cell carcinoma and papillary renal cell carcinoma of the kidney: significant immunophenotypic overlap warrants diagnostic caution. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:13-19.
59. Rakozy C, Schmahl GE, Bogner S et al. Low-grade tubular-mucinous renal neoplasms: morphologic, immunohistochemical, and genetic features. *Mod Pathol.* 2002;15:1162-1171.
60. Karakiewicz PI, Hutterer GC, Trinh QD et al. Unclassified renal cell carcinoma: an analysis of 85 cases. *BJU Int.* 2007;100:802-808.
61. Chevillet JC, Lohse CM, Zincke H et al. Sarcomatoid renal cell carcinoma: an examination of underlying histologic subtype and an analysis of associations with patient outcome. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:435-441.
62. de Peralta-Venturina M, Moch H, Amin M et al. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:275-284.
63. Kuroda N, Toi M, Hiroi M et al. Review of sarcomatoid renal cell carcinoma with focus on clinical and pathobiological aspects. *Histol Histopathol.* 2003;18:551-555.
64. Nanus DM, Garino A, Milowsky MI et al. Active chemotherapy for sarcomatoid and rapidly progressing renal cell carcinoma. *Cancer.* 2004;101:1545-1551.
65. Dal CP, Sciot R, Van PH et al. Chromosome changes in sarcomatoid renal carcinomas are different from those in renal cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;134:38-40.
66. Jiang F, Moch H, Richter J et al. Comparative genomic hybridization reveals frequent chromosome 13q and 4q losses in renal carcinomas with sarcomatoid transformation. *J Pathol.* 1998;185:382-388.
67. Amin MB, Amin MB, Tamboli P et al. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:281-291.
68. Chevillet JC, Lohse CM, Zincke H et al. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:612-624.
69. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N et al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J Clin Oncol.* 2005;23:2763-2771.

70. Motzer RJ, Bacik J, Mariani T et al. Treatment outcome and survival associated with metastatic renal cell carcinoma of non-clear-cell histology. *J Clin Oncol*. 2002;20:2376-2381.
71. Lam JS, Klatte T, Kim HL et al. Prognostic factors and selection for clinical studies of patients with kidney cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;65:235-262.
72. Shuch BM, Lam JS, Belldegrun AS et al. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *Semin Oncol*. 2006;33:563-575.
73. George S, Bukowski RM. Biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2007;7:1737-1747.
74. Lam JS, Leppert JT, Figlin RA et al. Role of molecular markers in the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma. *Urology*. 2005;66:1-9.
75. Kim HL, Seligson D, Liu X et al. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5464-5471.
76. Sudarshan S, Linehan WM. Genetic basis of cancer of the kidney. *Semin Oncol*. 2006;33:544-551.
77. Potti A, George DJ. Tyrosine kinase inhibitors in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6371S-6376S.
78. Mancuso A, Sternberg CN. What's new in the treatment of metastatic kidney cancer? *BJU Int*. 2005;95:1171-1180.
79. van Spronsen DJ, Mulders PF, De Mulder PH. Novel treatments for metastatic renal cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;55:177-191.
80. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:205-216.
81. Jacobsohn KM, Wood CG. Adjuvant therapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol*. 2006;33:576-582.
82. Kim WY, Kaelin WG, Jr. Molecular pathways in renal cell carcinoma--rationale for targeted treatment. *Semin Oncol*. 2006;33:588-595.
83. Atkins MB, Ernstoff MS, Figlin RA et al. Innovations and challenges in renal cell carcinoma: summary statement from the Second Cambridge Conference. *Clin Cancer Res*. 2007;13:667s-670s.
84. Ronnen EA, Kondagunta GV, Ishill N et al. A phase II trial of 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in patients with papillary and clear cell renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*. 2006;24:543-546.
85. Yang JC, Haworth L, Sherry RM et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med*. 2003;349:427-434.
86. Choueiri TK, Bukowski RM, Rini BI. The current role of angiogenesis inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. *Semin Oncol*. 2006;33:596-606.

87. Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K et al. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res.* 1999;5:257-265.
88. Wilhelm SM, Carter C, Tang L et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64:7099-7109.
89. Flaherty KT. Sorafenib in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13:747s-752s.
90. Rini BI, Sosman JA, Motzer RJ. Therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: biology, clinical results and future development. *BJU Int.* 2005;96:286-290.
91. Rini BI, Rathmell WK. Biological aspects and binding strategies of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13:741s-746s.
92. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:16-24.
93. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356:115-124.
94. Chow LQ, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol.* 2007;25:884-896.
95. Rock EP, Goodman V, Jiang JX et al. Food and Drug Administration drug approval summary: Sunitinib malate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma. *Oncologist.* 2007;12:107-113.
96. George DJ. Phase 2 studies of sunitinib and AG013736 in patients with cytokine-refractory renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13:753s-757s.
97. Polite BN, Desai AA, Manchen B et al. Combination therapy of imatinib mesylate and interferon-alpha demonstrates minimal activity and significant toxicity in metastatic renal cell carcinoma: results of a single- institution phase II trial. *Clin Genitourin Cancer.* 2006;4:275-280.
98. Sosman JA, Puzanov I, Atkins MB. Opportunities and obstacles to combination targeted therapy in renal cell cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:764s-769s.
99. Xu L, Tong R, Cochran DM et al. Blocking platelet-derived growth factor-D/platelet-derived growth factor receptor beta signaling inhibits human renal cell carcinoma progression in an orthotopic mouse model. *Cancer Res.* 2005;65:5711-5719.
100. Ramp U, Jaquet K, Reinecke P et al. Functional intactness of stimulatory and inhibitory autocrine loops in human renal carcinoma cell lines of the clear cell type. *J Urol.* 1997;157:2345-2350.
101. Lam JS, Pantuck AJ, Belldegrun AS et al. Protein expression profiles in renal cell carcinoma: staging, prognosis, and patient selection for clinical trials. *Clin Cancer Res.* 2007;13:703s-708s.
102. Yamazaki K, Sakamoto M, Ohta T et al. Overexpression of KIT in chromophobe renal cell carcinoma. *Oncogene.* 2003;22:847-852.

103. Sulzbacher I, Birner P, Traxler M et al. Expression of platelet-derived growth factor-alpha alpha receptor is associated with tumor progression in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2003;120:107-112.
104. Tawfik OW, Kramer B, Shideler B et al. Prognostic significance of CD44, platelet-derived growth factor receptor alpha, and cyclooxygenase 2 expression in renal cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:261-267.
105. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol*. 1997;183:131-133.
106. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ et al. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol*. 2002;20:1692-1703.
107. Pan CC, Chen PC, Chiang H. Overexpression of KIT (CD117) in chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Am J Clin Pathol*. 2004;121:878-883.
108. Ortmann M, Vierbuchen M, Fischer R. Renal oncocytoma. II. Lectin and immunohistochemical features indicating an origin from the collecting duct. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1988;56:175-184.
109. Storkel S, Steart PV, Drenckhahn D et al. The human chromophobe cell renal carcinoma: its probable relation to intercalated cells of the collecting duct. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1989;56:237-245.
110. Haitel A, Susani M, Wick N et al. c-kit overexpression in chromophobe renal cell carcinoma is not associated with c-kit mutation of exons 9 and 11. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:842.
111. Renshaw AA, Henske EP, Loughlin KR et al. Aggressive variants of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer*. 1996;78:1756-1761.
112. Board R, Jayson GC. Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): a target for anticancer therapeutics. *Drug Resist Updat*. 2005;8:75-83.
113. Magnusson PU, Looman C, Ahgren A et al. Platelet-derived growth factor receptor-beta constitutive activity promotes angiogenesis in vivo and in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2142-2149.
114. Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest*. 2003;112:1142-1151.
115. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P et al. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997;277:242-245.
116. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438:967-974.
117. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N et al. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest*. 2003;111:1287-1295.
118. Rak J, Yu JL, Kerbel RS et al. What do oncogenic mutations have to do with angiogenesis/vascular dependence of tumors? *Cancer Res*. 2002;62:1931-1934.
119. Castillo M, Petit A, Mellado B et al. C-kit expression in sarcomatoid renal cell carcinoma: potential therapy with imatinib. *J Urol*. 2004;171:2176-2180.

120. Bishu S, Papavero V, Adley BP et al. C-KIT protein immunoreactivity in renal cell carcinoma with sarcomatoid dedifferentiation. *Modern Pathology* 18[Supplement 1], 132 A. 2005.  
Ref Type: Abstract
121. Sengupta S, Cheville JC, Corless CL et al. Rare expression of KIT and absence of KIT mutations in high grade renal cell carcinoma. *J Urol.* 2006;175:53-56.
122. Sihto H, Sarlomo-Rikala M, Tynninen O et al. KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha tyrosine kinase gene mutations and KIT amplifications in human solid tumors. *J Clin Oncol.* 2005;23:49-57.
123. Burger H, den Bakker MA, Kros JM et al. Activating mutations in c-KIT and PDGFRalpha are exclusively found in gastrointestinal stromal tumors and not in other tumors overexpressing these imatinib mesylate target genes. *Cancer Biol Ther.* 2005;4:1270-1274.
124. von MM. Targeted therapy with imatinib: hits and misses? *J Clin Oncol.* 2005;23:8-10.
125. Hirota S, Isozaki K. Pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int.* 2006;56:1-9.
126. Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrun AS. The changing natural history of renal cell carcinoma. *J Urol.* 2001;166:1611-1623.
127. Shuch B, Li Z, Belldegrun AS. Carbonic anhydrase IX and renal cell carcinoma: prognosis, response to systemic therapy, and future vaccine strategies. *BJU Int.* 2008;101 Suppl 4:25-30.
128. Mellado B, Gascon P. Molecular biology of renal cell carcinoma. *Clin Transl Oncol.* 2006;8:706-710.
129. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature.* 2008;452:548-552.