



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**DETECCIÓN Y VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA
RELACIÓN BIDIRECCIONAL ENTRE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y CÁNCER RENAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. MANCIO CÁRDENAS ARIJAHIR ALEXIS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CARLO CÉSAR CORTÉS GONZÁLEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MARZO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**DETECCIÓN Y VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA
RELACIÓN BIDIRECCIONAL ENTRE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y CÁNCER RENAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. MANCIO CÁRDENAS ARIJAHIR ALEXIS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CARLO CÉSAR CORTÉS GONZÁLEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MARZO, 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/252/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 16 de enero de 2023 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **MANCIO CÁRDENAS ARIJAHIR ALEXIS** con número de cuenta 312062585 con la tesis titulada **“DETECCIÓN Y VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA RELACIÓN BIDIRECCIONAL ENTRE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y CÁNCER RENAL”**, realizada bajo la dirección del **DR. CARLO CÉSAR CORTÉS GONZÁLEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Vocal: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Vocal: DRA. MARÍA DE JESÚS CHÁVEZ CANALES
Vocal: DR. CRISTIAN GABRIEL OLIVERIO ARRIAGA CANON
Secretario: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de marzo de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos Institucionales

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM**, por facilitarme el conocimiento adquirido durante mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología **CONACYT**, por la beca recibida durante los semestres 2021-1 a 2022-2; con el número de CVU 1085180. Sin la cual no habría podido concluir mis estudios de maestría.

Al **CONACYT** por el financiamiento del proyecto CB-243380; y a la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación **SECTEI**, por el financiamiento recibido a través del proyecto SECTEI/276/2019.

Al Dr. Carlo César Cortés González por su tutoría y confianza brindada en este periodo de maestría. Al comité tutor integrado por la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval y la Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas, por su tutoría, consejos y atención durante mi aprendizaje.

Agradecimientos personales

A mi familia, por seguir apoyándome en este camino y en la segunda etapa para cumplir mi sueño.

A mis padres, por ser el hombro y el bastón en el que me sostengo para seguir adelante; por las enseñanzas de vida y superación personal que me impulsan y me inspiran a conseguir mis metas.

A mis seres más cercanos: Sonia, Samantha, Atzin, Xchel, Eduardo, César y Rubí. Por hacer estos dos años más llevaderos, con experiencias, cultura y conocimiento. Por apoyarme, escucharme y estar en los momentos más felices y también en los más cansinos de la vida.

A todo el grupo de laboratorio del Dr. Carlo César Cortés González que estuvo durante toda la maestría y los que llegaron al final, por haber establecido un vínculo de compañerismo y de aprendizaje mutuo. Hicieron la estancia en el laboratorio más amena. Un agradecimiento especial a Zacgnihte por su apoyo en los últimos experimentos de la tesis.

*“[...] en el mundo real hay tres bandos:
los unos que viven, los otros que lo intentan...
los terceros solo sueñan.”*

- Santiago Balmes Sanfeliu, 2012.

*“Cuando se medita sobre la vida, es preciso fuera de ella,
dejar en suspenso y sin ejecutividad todos sus movimientos interiores,
y desde el exterior, verla fluir como desde la orilla
se observa el turbulento galope del torrente”*

- José Ortega y Gasset, 1921.

I. ÍNDICE

II. Resumen	1
III. Abstract	3
IV. Introducción	5
Cáncer Renal	5
Factores de riesgo para desarrollar cáncer renal.....	7
Biomarcadores de Cáncer Renal.....	8
Comorbilidades del Cáncer Renal	15
Enfermedad Renal Crónica	17
Factores de Riesgo para desarrollar Enfermedad Renal Crónica	19
Enfermedad Renal Crónica y Fibrosis.....	21
Biomarcadores de Enfermedad Renal Crónica	24
Relación entre Cáncer Renal y Enfermedad Crónica	27
V. Antecedentes directos	32
VI. Planteamiento del problema	35
VII. Hipótesis	35
VIII. Objetivos	36
Objetivo general	36
Objetivos particulares	36
IX. Metodología.....	37
Reclutamiento de pacientes con CCR.....	37
Toma y recolección de muestras	37
Estudios histopatológicos.....	38
Ensayos de Inmunohistoquímica	39
Ensayos de Western Blot.....	40
Extracción de RNA total a partir de tejido renal.....	40
Síntesis de cDNA (RT-PCR) a partir de RNA total extraído de tejido renal	41
Determinación de biomarcadores por RT-qPCR.....	41
Análisis estadístico	42
X. Resultados	43
XI. Discusión.....	92
XII. Conclusiones	100

XIII. Referencias Bibliográficas	103
XIV. Apéndice (Datos crudos)	114

II. Resumen

Introducción. El carcinoma de células renales (CCR) ocupa el décimo y 13° lugar en incidencia en hombres y mujeres, respectivamente, a nivel mundial (*Global Cancer Observatory*). El incremento de hasta un 4% en los últimos años, mantiene una tasa de mortalidad con más de un tercio de los pacientes con CCR en estadio avanzado. Dentro de los 5 subtipos histológicos de CCR, el carcinoma renal de células claras (ccRCC) representa el 75-80% de todos los casos. Casi todos los casos familiares del ccRCC (5-10%) provienen de una delección e inactivación heredada en el gen supresor de tumores *Von Hippel-Lindau* (VHL). Dado este enlace estrecho a la tumorigénesis del cáncer renal y la presencia o ausencia de una mutación de VHL se ha propuesto como un marcador predictivo y de mal pronóstico para el ccRCC. Aunado al valor diagnóstico y pronóstico de VHL, se han reportado diferentes moléculas que demuestran tener significancia como biomarcadores en CCR. A pesar de los recientes reportes sobre el descubrimiento de nuevos marcadores y terapias antitumorales, los pacientes con CCR pueden sufrir diferentes comorbilidades. Entre ellas, una de las más frecuentes es la enfermedad renal crónica (ERC), la cual alcanza un 20-30% de incidencia. En la actualidad, se reporta que más de la mitad de los pacientes oncológicos presentan una función renal disminuida. Clínicamente, esta enfermedad es producto del deterioro progresivo e irreversible de la función renal con presencia de fibrosis. De acuerdo con las pautas internacionales, los métodos de diagnóstico clínico de ERC se basan en los niveles de creatinina, albúmina y la tasa de filtración glomerular estimada (TFGe). Desafortunadamente, estos parámetros apenas se ven afectados en las primeras etapas. Incluso, estos niveles se pueden ver alterados en los pacientes oncológicos enmascarando la presencia de la ERC. Por esto, existe la necesidad de determinar nuevos marcadores diagnóstico y pronóstico de la ERC más sensibles y así, mejorar la calidad de vida del paciente oncológico. **Objetivo.** Determinar e identificar un panel de biomarcadores de la ERC y de CCR asociados a la relación bidireccional entre enfermedad renal crónica y cáncer renal. **Metodología.** Mediante una cohorte retrospectiva de pacientes diagnosticados con CCR en el Instituto Nacional de Cancerología durante el periodo 2017-2019, se obtuvieron muestras de tejido tumoral y tejido adyacente validados histopatológicamente. Un panel de biomarcadores validados y propuestos de ERC y CCR serán determinados mediante inmunoensayos tipo IHC, Western Blot y qRT-PCR. El análisis entre la cantidad y presencia de cada panel de biomarcadores durante el seguimiento del paciente con CCR permitirá identificar una posible asociación bidireccional entre ERC y CCR. **Resultados.** Como un primer acercamiento para entender la relación de la fibrosis con la ERC, se evaluó el grado de fibrosis en ambos tipos de tejidos. En este ensayo se encontró un mayor grado

de fibrosis en el tejido adyacente al tumor (TN) en comparación con el tejido tumoral (TC). Además, el mayor grado de fibrosis en TN se asoció a un mayor riesgo de desarrollar ERC. Por otro lado, el tejido tumoral presentó un menor grado de fibrosis en el tamaño tumoral T3 y la progresión. En cuanto a los marcadores tumorales, la proteína PAX8 mostró un aumento en la expresión proteica conforme el tamaño tumoral; encontrándose esta misma tendencia en el Grado Fuhrman. La expresión proteica de la proteína VHL permitió diferenciar TC de TN, ya que se observó una menor expresión en TC. Esta misma tendencia se observó en la presencia de metástasis en los pacientes con CCR. La proteína HSF1 mostró una tendencia a aumentar en TC, además se encontró aumentada en un mayor Grado Fuhrman. La expresión proteica de su gen blanco, Hsp90; mostró diferentes asociaciones según la isoforma evaluada. Por su parte, la isoforma Hsp90 β mostró una disminución en el grupo de metástasis; sugiriendo ser una molécula supresora del cáncer. La otra isoforma más abundante, Hsp90 α mostró una baja expresión en TC. Sin embargo, el gen de esta proteína, HSP90AA1, se encontró sobreexpresada en TC, sugiriendo que ambas biomoléculas pueden participar de manera diferente en la biología del cáncer. Ambas isoformas de Hsp90 mostraron un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer. Los marcadores de ERC evaluados mostraron ser de interés, ya que Hsp72 mostró un cambio de localización en TN en comparación con TC, donde solo se encontró en núcleo, resultando en una mayor expresión en TN. La proteína KIM-1, una de las más evaluadas en la ERC, mostró una tendencia a aumentar en los pacientes con una TFGe <90mL/min. Finalmente, la proteína TGF- β , implicada en la formación de fibrosis, se encontró aumentada en el grupo de los pacientes con menor TFGe. Sugiriendo que estas moléculas, la fibrosis y la TFGe, pueden ser importantes para el diagnóstico y pronóstico de la ERC. Los resultados sugieren que estas moléculas pueden conformar un panel de marcadores importantes para la evaluación y próxima validación en la clínica mediante biopsias líquidas para estudiar tanto la ERC, como la CCR y su posible relación bidireccional.

III. Abstract

Introduction. Renal Cell Carcinoma (RCC) stands for the 10th and 13th incidence place in men and women, respectively (*Global Cancer Observatory*). RCC has the highest mortality rate amongst genitourinary cancers. Between the 5 histological subtypes, Clear Cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC) is the most common subtype with 75-80% of the total cases. Almost all the familiar cases of ccRCC comes from a loss of heterozygosity in the Von Hippel Lindau (VHL) disease gene. Moreover, nearly all the spontaneous cases of ccRCC have a mutation of this gene in early phases. Due to this link between the CCR tumorigenesis and the VHL inactivating mutation, the protein (pVHL) has become a biomarker for prognosis of the ccRCC. Other molecules have been reported as biomarkers for CCR; those, among others, are the VHL target HIF-1 α , and his target gene VEGF. These molecules have a prognosis, diagnostic and therapeutic value in the treatment of CCR. Some interesting emerging molecules as biomarkers are the Hsp90 family, which participate in the proper folding and functioning of many “client” proteins including VHL, HIF-1 α and VEGF. These proteins have a role in many diseases. Hsp90 has even been called “the cancer chaperone”. The CCR’s first line treatment is the nephrectomy. Although many patients don’t recur within 18 months after the nephrectomy, many patients develop Chronic Kidney Disease (CKD) if not already suffer at the moment of the surgery. This disease is a common comorbidity in oncological patients, representing 20-30% of the cases. CKD is a progressive deterioration of the functional nephrons, and fibrosis is an underlying event in the disease. The diagnostic method of the CKD includes the serum creatinine and albumin and the estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR). Unfortunately, these parameters only change in the last phases of the disease. Although the relationship between CCR and CKD seems to be incidental, other explanations are considered. The strongest relation appears between the decrease of the eGFR and the ccRCC. This finding widens the possible mechanisms to study the biological fundamentals of the CCR and CKD relationship (Onconeurology). Therefore, it is necessary to identify and determine a biomarker panel for both CCR and CKD associated to the

relationship between these diseases. **Methods.** With paraffine embedded tissues we determine the suggested biomarkers through IHQ and WB and analyze the association between relative expression and clinical variables of interest. **Results.** As a first approach to understand the relation between fibrosis and CKD we analyzed the fibrosis percentage in both tissues: normal tissue (TN) and tumoral tissue (TC). We found an augmented fibrosis in TN when compared to TC. Moreover, this augmented fibrosis was associated to a greater risk to suffer and develop CKD. On the other hand, TC showed a low percentage of fibrosis when assayed the tumoral size (according to TNM classification) T3 and the cancer progression. These findings suggest that fibrosis is a preventive event that stops the tumor development. Referring to the molecules analyzed, PAX8 showed an increased expression level as the tumor size increase. The same tendency was observed in the Fuhrman Grade variable; suggesting that an increased level of PAX8 is associated to an advanced grade of disease. pVHL can distinguish TC from TN with a lower expression in TC. This low expression was observed in the patients with metastasis at diagnosis. HSF1 protein showed an increased level in TC, but there wasn't a significative difference when compared to TN because this tissue is altered due to the nearby to TC and tissue fibrosis. HSF1 also was increased in a higher Fuhrman grade suggesting these levels are associated to a poor prognosis. It has been reported that his main target gene Hsp90 has many implications for cancer and these activities depends on the isoform evaluated. In this study, Hsp90 β showed a low expression level on the patients with metastasis, suggesting this Hsp90 isoform could be a suppressor of cancer due to his role in the adaptation to response to cellular stress. These molecules showed an important role in the prognosis and cancer progression; therefore, we encourage the evaluation and validation of these molecules in the clinic through a less invasive technique as liquid biopsies.

IV. Introducción

Cáncer Renal

El Carcinoma Renal (CR) es un tipo de cáncer originado del epitelio tubular renal, que genera >90% de los tipos de cáncer en el riñón.¹ Este es el tipo de cáncer número 10 de incidencia en hombres a nivel mundial (*Cancer Today*), aunque esta incidencia ha incrementado en los últimos años, creciendo 2-4% cada año. La incidencia en hombres es aproximadamente dos veces mayor a la de las mujeres (2:1).² El carcinoma renal es el tercer tipo de cáncer genitourinario más común en Estados Unidos y presenta una tasa de mortalidad alta con más de un tercio de los pacientes que padecen la enfermedad pueden fallecer por el cáncer renal.³ Todas estas implicaciones hacen al cáncer renal un grave problema de salud pública.

La alta tasa de mortalidad se presenta debido a que más del 50% de los casos de CR se detectan de manera incidental, donde los pacientes refieren dolor en el costado, hematuria y una masa abdominal palpable menos frecuente que en el pasado. La sospecha de CR debe sugerir exámenes de laboratorio de creatinina sérica, hemoglobina, conteo de leucocitos y plaquetas, relación de linfocitos/neutrófilos, lactato deshidrogenasa, proteína C-reactiva y calcio sérico. Algunas de estas pruebas pueden predecir la sobrevivencia y son usados para evaluar el riesgo dentro de los diferentes sistemas de puntuación pronóstica.⁴ Sin embargo, en la actualidad para el diagnóstico del cáncer renal se realizan técnicas de imagen como la resonancia magnética, exámenes de sangre y principalmente, se utiliza una biopsia del tejido dañado para confirmar el diagnóstico del cáncer renal.

Diversos estudios han mostrado que el carcinoma de células renales se genera a partir de células especializadas distribuidas por toda la nefrona. Existen diferentes subtipos histológicos de los cuales el carcinoma renal de células claras (ccRCC) representa el 75-80% de los casos, el cual surge de las células epiteliales del túbulo proximal.²

El carcinoma renal de células claras puede ser esporádico (96%) o familiar (4%). La mayoría de los casos familiares del ccRCC provienen de una delección heredada en el gen supresor de tumores *Von Hippel-Lindau* (VHL) en el cromosoma 3p.⁵ Esta delección e inactivación del gen supresor VHL es, también, la alteración genética más común en el ccRC esporádico.⁶ Los estudios que demuestran que la inactivación de VHL es común en el ccRCC esporádico y que el único *loci* donde se ha detectado una delección cromosómica en el cáncer renal es en el 3p, sugieren que la alteración de VHL puede ser el evento iniciador en la mayoría de los casos esporádicos de ccRCC.²

La proteína VHL funciona como parte de una ubiquitin ligasa E3, la cual ubiquitina a la familia de proteínas de HIF y las marca para la degradación por el proteasoma.⁷ En ausencia de pVHL funcional, HIF se puede acumular y translocar al núcleo donde actúa como factor de transcripción para genes de respuesta a hipoxia que pueden relacionarse con el crecimiento y proliferación celular.⁸ Por lo tanto, esta pérdida funcional de pVHL se ha asociado como un evento importante en el crecimiento y desarrollo del ccRCC.^{9,10} Dado este enlace estrecho a la tumorigénesis del cáncer renal, la presencia o ausencia de una mutación de VHL se ha propuesto como un marcador predictivo o pronóstico para esta enfermedad.¹¹

Factores de riesgo para desarrollar cáncer renal

La causa exacta del cáncer renal no se conoce, pero el tabaquismo es considerado un factor de riesgo causal de la enfermedad por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), aunque el riesgo asociado al tabaquismo es relativamente modesto.¹² Comparado a los no fumadores, el riesgo aumenta cerca de 50% en hombres y 20% en mujeres fumadoras.¹³ Se piensa que el tabaquismo incrementa el riesgo de padecer CR a través de la hipoxia crónica al tejido debido a la exposición al monóxido de carbono.¹⁴ Algunos otros factores de riesgo que se han asociado incluyen la obesidad, ya que se ha estimado que aporta cerca del 40% del CR en Estados Unidos y cerca del 30% en Europa.¹⁵

Ciertos tipos de tumores renales y tratamientos del cáncer han mostrado causar hipertensión. Existe suficiente evidencia para demostrar que la hipertensión predispone al desarrollo del cáncer renal.^{16,17} El uso de diuréticos y otros medicamentos anti-hipertensivos se ha asociado con un riesgo elevado de CR, pero un efecto independiente de la hipertensión por sí misma no se ha establecido.¹⁸ Otro factor predisponente del CR es la diabetes mellitus, la cual se ha ligado en varios estudios de cohortes de pacientes, pero su papel independiente de la obesidad y la hipertensión no se ha demostrado de manera concluyente.^{12,18,19} Además, se ha reportado que los pacientes con una enfermedad renal de etapa terminal tienen un riesgo incrementado de padecer CR mientras reciben sesiones de hemodiálisis por un largo tiempo, o bien, después de un trasplante renal.²⁰

Algunos datos han asociado la actividad física al riesgo de padecer CR, varios estudios que han examinado este problema reportaron una asociación inversa.²¹ La actividad física ha mostrado reducir la masa corporal y la presión sanguínea, aumenta la sensibilidad a la insulina y reduce la inflamación crónica y el estrés oxidativo, cambios que pueden contribuir a reducir el riesgo de CR.²² En estudios de cohortes se ha observado que las dietas ricas en frutas y vegetales están inversamente relacionadas al riesgo de CR en estudios con cohortes, pero las asociaciones con los nutrientes antioxidantes en estos alimentos, como la vitamina A, C y E y los carotenoides, están mezcladas.²³

Finalmente, del 2 al 4% del CR hereditario proviene de una delección en el gen de VHL que provoca la enfermedad de *Von Hippel-Lindau*, la cual se caracteriza por la aparición de tumores en diferentes órganos del cuerpo, tales como los hemangioblastomas, feocromocitomas y el cáncer renal de células claras.^{10,24}

Biomarcadores de Cáncer Renal

Un reto particular en el tratamiento del CR es la heterogeneidad de la enfermedad, ya que una masa renal puede ir de benigna y clínicamente irrelevante hasta agresivo con un alto potencial de metástasis.²⁵ Para los urólogos, radiólogos y oncólogos es de importancia clínica categorizar y tratar adecuadamente el tumor renal. Por lo tanto, se requiere diagnosticar de manera oportuna al paciente oncológico y los biomarcadores ofrecen una oportunidad única de mejorar el cuidado de los pacientes con cáncer renal.³

A grandes rasgos, los biomarcadores son definidos como características objetivas, cuantificables de procesos biológicos que miden un estado fisiológico y pueden ser usados como puntos finales para predecir desenlaces.²⁶ Los biomarcadores se pueden clasificar basándose en sus parámetros, incluyendo biomarcadores diagnósticos. Desde hace algunos años, existe un arreglo de biomarcadores utilizados en la clínica que puede ayudar a individualizar el cuidado de los pacientes con cáncer renal.²⁷

Marcadores de imagen

Uno de los principales objetivos de estos biomarcadores es reflejar de manera no invasiva la histología del tejido renal, mientras se evita el sobret ratamiento de subtipos de tumores clínicamente irrelevantes y masas renales benignas.²⁸ Las técnicas de imagen de tomografía de emisión de positrones (PET), que usan varios rastreadores han sido estudiados como biomarcadores pronósticos y predictivos de CR.²⁹ Uno de los biomarcadores de imagen recientemente explorado es la anhidrasa carbónica, una proteína que está sobreexpresada en vías mutadas de VHL como el ccRCC pero con baja expresión en la parénquima renal normal y no-ccRCC.³⁰ Se utiliza un anticuerpo marcado radiactivamente como un rastreador de imagen.

Biomarcadores séricos y urinarios

Las citocinas y factores angiogénicos representan un área importante de investigación con el potencial de identificar biomarcadores fáciles de obtener y clínicamente relevantes. Los biomarcadores urinarios y las biopsias líquidas con

DNA circulante del tumor (ctDNA) son áreas de investigación constante.²⁷ El factor de crecimiento endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés) juega un papel importante en la angiogénesis del CR, además de ser un blanco de la mayoría de los fármacos aprobados por la FDA para el uso en CR metastásico.²⁷ Se ha investigado el uso de los niveles séricos basales de VEGF como un biomarcador pronóstico para la respuesta al tratamiento basado en inmunoterapia y quimioterapia contra VEGF.^{1,31-}

33

Otros marcadores que se probaron en el estudio de seguimiento usando la misma población de pacientes encontró que altos niveles basales plasmáticos de CA-IX (anhidrasa carbónica IX), TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteinasas) y Ras p21 resultaron pronósticos para una supervivencia reducida en pacientes con CR metastásico.³⁴

La Interleucina 6 (IL-6) es otro biomarcador prometedor, ya que existe evidencia que es secretado por células de CR cuando son expuestas a hipoxia.³⁵ En estudios de fase II y III del fármaco pazopanib se encontró que los niveles séricos bajos del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), IL-6 e IL-8 correlacionaron con mayor encogimiento del tumor con la terapia de pazopanib. Adicionalmente, IL-6 baja y alta E-selectina fueron asociadas con una supervivencia libre de progresión prolongada (PFS por sus siglas en inglés).³⁶

Algunos marcadores urinarios que han mostrado resultados prometedores son las proteínas acuaporina 1 (AQP-1) y perilipina-2 (PLIN2), encontrando en un estudio que estas proteínas presentaban mayores niveles en pacientes con cáncer renal papilar en comparación con pacientes sanos.³⁷ Otros biomarcadores urinarios

novedosos es el puntaje de glicosaminoglicanos (GAG), ya que los GAG están sobrerregulados transcripcionalmente en el CR metastásico.³⁸

Biomarcadores en biopsias líquidas

El ctDNA obtenido de sangre periférica recientemente ha emergido como otro biomarcador prometedor. Establecer el perfil genético del tumor a través del muestreo del tejido es limitado por el sesgo del muestreo, la dificultad para obtenerlo y el riesgo al paciente. Por el contrario, el muestreo de ctDNA es ventajoso porque no es invasivo y permite varias medidas para el monitoreo de la genómica del tumor o la respuesta al tratamiento.³ En un análisis de secuenciación de genes blanco en cuatro muestras de tumor de pacientes con CR metastásico localmente avanzado se encontró una mutación genética relacionada con el CR (genes de la proteína de unión a clorofila, CHL; proteína asociada a BRCA1, BAP1; proteína polibromo 1, PBRM1 o proteína neurofibromina, NF) en cada tumor. Posteriormente, en un procedimiento realizado previo a la nefrectomía se encontró una mutación (VHL) de las cuatro detectadas previamente. De manera importante, los niveles de ctDNA disminuyeron a un nivel indetectable después de la nefrectomía.³⁹

Biomarcadores tisulares

De manera histológica, la clasificación de los tumores renales se basa en las características morfológicas, inmunohistoquímicas y cromosomales. Mientras que la mayoría de los tumores renales pueden ser subtipificados solo por la morfología, las tinciones inmunohistoquímicas (IHQ) pueden proveer información diagnóstica adicional.³ El parénquima renal normal y la mayoría de las neoplasias renales

expresan los factores de transcripción PAX8 y PAX2. Por lo tanto, estas moléculas son marcadores útiles para ayudar en la identificación de lesiones metastásicas. PAX2 es menos sensible que PAX8, aunque es más específico. Ambos pueden ser negativos en tumores de alto grado y son negativos en angiomiolipoma.⁴⁰ Algunos de los tipos más comunes de CR son positivos para vimentina, una tinción que es más conocida como marcador mesenquimal. A pesar de no ser lesiones mesenquimales, el ccRCC y el pRCC (carcinoma renal papilar) son de los pocos carcinomas que expresan citoqueratinas y vimentina.⁴⁰⁻⁴² Otros marcadores inmunohistoquímicos que pueden ser útiles en el diagnóstico diferencial de los tumores renales incluye CA-IX, la cual es una proteína transmembranal que puede identificar el ccRCC cuando la morfología no es obvia. Es positiva en ccRCC y generalmente negativa en todos los otros tipos de CR.⁴²

La familia de proteínas de HIF está sobrerregulada cuando la función de VHL se ha perdido o es anormal, tal como en el ccRCC. En un estudio en tumores primarios se encontró que la expresión aumentada de HIF-1 α se asoció con la diferenciación a ccRCC y sarcomatoide. Además, las moléculas inducibles por HIF: CA-IX, GLUT-1 y VEGF se encontraban incrementadas en el CR sarcomatoide.^{43,44} De manera similar, en otro estudio con tumores de ccRCC a través de la técnica de Western Blot, los niveles de expresión de HIF-1 α correlacionaron con una variedad de variables clínicas y patológicas. El análisis de supervivencia demostró una asociación significativa entre una alta expresión de HIF-1 α y la supervivencia en ccRCC.

Biomarcadores moleculares y genéticos

Mientras la mayoría de los casos de CR son esporádicos, algunos son asociados con condiciones hereditarias o síndromes genéticos. El CR más común, el ccRCC, generalmente involucra al gen VHL. Los pacientes con el síndrome de VHL presentan ccRCC bilateral multifocal, así como manifestaciones en otros sistemas por todo el cuerpo.⁴⁵ Otras mutaciones asociadas al CR incluyen a los genes PBRM1; dominio SET 2, SETD2; desmetilasa 5C, KDM5C; el homólogo de fosfatasa y tensina, PTEN; BAP1; el gen de la proteína blanco de Rapamicina, MTOR y TP53.

En conclusión, se han estudiado diferentes tipos de biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del tratamiento del CR. Sin embargo, pocos se han establecido en la clínica. Por ejemplo, en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) se toma como factor pronóstico el tipo histológico del tumor, el nivel de hemoglobina, LDH y el calcio sérico. En cuanto a marcadores moleculares, la proteína CA-IX, VEGFR) el factor de crecimiento endotelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor inducible por hipoxia (HIF-1 α); se han propuesto como factores pronósticos, sin embargo, no existe una estandarización para la determinación de estos factores (Oncoguía Cáncer Renal, INCan).

En una guía de práctica clínica de la ESMO (*European Society of Medical Oncology*)⁴ para el cáncer renal se mencionan firmas genéticas que pueden detectar diferentes grupos de riesgo en el CR.⁴⁶ Además, recientemente un panel de 16 genes ha mostrado mejorar la predicción de la supervivencia libre de recurrencia en

CR localizado en comparación con el puntaje SSIGN.⁴⁶ Estos datos sugieren que el análisis moléculas puede añadir un beneficio adicional a los parámetros clínicos ya establecidos. Sin embargo, hoy en día, no hay marcadores moleculares específicos que se recomienden para el uso clínico.⁴

Se puede pensar que el principal factor que influye en el establecimiento de estos biomarcadores diagnóstico, pronóstico y de seguimiento es la heterogeneidad de los tumores y el diferente abordaje de los pacientes. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, varias moléculas y técnicas de diagnóstico se han asociado a los diferentes tipos y etapas del CR, es por esto que el estudio del establecimiento de biomarcadores de CR sigue siendo reto a alcanzar, aunque la búsqueda de un solo biomarcador no es suficiente para el establecimiento en la clínica, el objetivo de muchos grupos de estudio es poder integrar los diferentes marcadores para ayudar en el diagnóstico y manejo del paciente con CR. En la **Tabla 1** se presentan algunos de los biomarcadores moleculares más estudiados con base en una revisión bibliográfica en la base de datos de PubMed en junio 2022.

Marcador	Relevancia Clínica	Determinación	Referencia
pVHL+	Progresión y desarrollo del ccRCC	PCR, secuenciación	Kim E (2018) <i>Front Ped</i>
VEGF+	Niveles del mRNA elevados en CCR	PCR	Li X. (2021) <i>Exp Therap Med</i>
TIMP-1+	Respuesta al tratamiento quimioterapéutico	ELISA	Shou Y (2022) <i>Front Genet</i>
Vimentina+	Valor pronóstico en CCR metastásico	IHQ	Tan PH (2020) <i>Front Oncol</i>
PAX8+	Identificación de metástasis	IHQ	Shen SS (2012) <i>Arch Pathol Lab Med</i>
AQP-1*	Diferenciación del CCR en pacientes sanos	ELISA	Morrissey JJ (2015) <i>JAMA Oncol</i>
GAG*	Sobreexpresado en CCR metastásico	Electroforesis Capilar	Gatto F (2016) <i>Front Oncol</i>
HIF-1 α *	Asociado a la disminución del tumor en xenoinjertos de ccRCC	IHQ	Schödel J (2016) <i>Eur Urol</i>
Hsp90*	Sobreexpresión en ccRCC y asociación con CCR metastásico	IHQ	Romero-Mandujano A. (2017) <i>Man in Prep</i>

Tabla 1. Biomarcadores estudiados y propuestos para el uso en la clínica. Se indican los marcadores presentados en diferentes estudios que muestran una asociación con el tipo y/o estadio clínico del CCR. (+) Biomarcadores estudiados y de asociación establecida en pacientes con CCR. (*) Marcadores propuestos en estudios clínicos en pacientes con CCR metastásico.

Comorbilidades del Cáncer Renal

La primera línea de terapia del ccRCC en etapas tempranas es la nefrectomía, la cual consiste en la remoción completa o parcial del riñón afectado. Aunado a esto, los pacientes con ccRCC pueden recibir terapias adyuvantes como la quimioterapia y/o radioterapia. En etapas más avanzadas del cáncer se han utilizado distintos tratamientos como la inmunoterapia ampliando el panorama terapéutico del tratamiento del cáncer renal. Sin embargo, los pacientes en etapas tempranas que reciben la primera línea de terapia (nefrectomía) pueden sufrir diferentes comorbilidades como resultado de las terapias contra el cáncer.^{1,47-49}

Recientemente se han reportado diferentes estudios que demuestran que la terapia anticáncer puede generar daños al riñón adyacente. Un estudio donde se evaluó la respuesta al tipo de nefrectomía en pacientes con ccRCC en etapas tempranas demostró que los pacientes que recibían nefrectomía radical mostraban una disminución en la función renal a largo plazo en comparación con los pacientes que recibían la nefrectomía parcial.⁵⁰ En cuanto a los otros tipos de terapia, también se ha demostrado que los pacientes sufren una disminución en la función renal debido a la radioterapia, la quimioterapia e incluso debido a la inmunoterapia.^{28,31,51,52}

A pesar de que el tratamiento anticáncer es un factor importante para la disminución de la función renal del paciente oncológico, otros reportes muestran que los pacientes con cáncer pueden tener una disminución de la función renal debido a la enfermedad. Así mismo, se han detectado pacientes que presentan una función renal disminuida previo al diagnóstico del cáncer.^{53,54} En 2014 Patel et. al. evaluaron las comorbilidades más frecuentes en pacientes con cáncer renal en etapas tempranas. Se encontró que la comorbilidad más común fue la falla cardíaca congestiva y en segundo lugar la Enfermedad Renal Crónica.⁵⁵

Esta asociación entre el cáncer y las enfermedades que afectan al riñón ha sido ampliamente estudiada en la última década, generando un nuevo campo de investigación conocido como la Onconefrología, la cual se encarga de desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las enfermedades renales en los pacientes oncológicos.^{47,51,52,56,57} Debido a esto, surge el interés de estudiar la Enfermedad Renal Crónica como un primer acercamiento a entender la su relación con el cáncer.

Enfermedad Renal Crónica

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) se define como la disminución de la Tasa de Filtración Glomerular (TFG) $<90\text{mL}/\text{min}$ por 1.73m^2 . A nivel tisular, involucra una destrucción progresiva del parénquima renal y la pérdida de nefronas funcionales.⁵⁸⁻

⁶⁰ La ERC es una comorbilidad y factor de riesgo del cáncer renal, constituyendo actualmente un problema de salud pública, tanto en México como en el mundo, debido al incremento en su incidencia y prevalencia.^{61,62} El Sistema de datos de enfermedad renal en Estados Unidos reporta que México tiene la mayor incidencia de enfermedad renal crónica (ERC) comparado con el resto del mundo, con un crecimiento de 122% de 2000 a 2013. Se estima que para el 2020, la ERC será la tercera causa de muerte en países de bajo y medio ingreso económico (como México) sólo después de la diabetes mellitus tipo 2 y la hipertensión arterial sistémica.^{63,64}

La pérdida de las nefronas funcionales desencadena eventos moleculares y celulares responsables de compensar el crecimiento de las nefronas restantes.⁶⁵ El desarrollo de la ERC involucra la separación de los podocitos de la membrana basal y su pérdida con la orina, por lo tanto, la determinación de la presencia de algunas proteínas estructurales conectadas con la barrera de filtración glomerular puede ser de ayuda en el diagnóstico de las enfermedades renales.⁶⁶ La pérdida de la función en el curso de la ERC también está asociada con la fibrosis intersticial y la inflamación. El diagnóstico temprano de la enfermedad es un paso importante en la prevención de las complicaciones de la ERC.⁵⁸

De acuerdo con las pautas internacionales, los métodos de diagnóstico clínico de ERC se basan en los niveles de creatinina y albúmina y la disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG) $<60\text{mg/mL}/1.73\text{m}^2$. Desafortunadamente, estos parámetros apenas se ven afectados en las primeras etapas, y su variabilidad intrínseca inherente solo permite la identificación de etapas intermedias y avanzadas cuando la esperanza de vida se ha acortado y el tratamiento representa una inversión financiera significativa.^{58,67,68} En este contexto, se diseñan estrategias y herramientas tecnológicas para buscar biomarcadores sensibles, específicos y poco invasivos; donde, la obtención de biopsias líquidas y detección por PCR digital son herramientas promisorias en la investigación traslacional.

La Enfermedad Renal Crónica se clasifica en 5 etapas diferentes con subestadios, de acuerdo con el valor de la Tasa de Filtración Glomerular estimada. Presentando un primer nivel a valores menores de $90\text{mg/mL}/1.73\text{m}^2$, con al menos tres meses de evolución. En la siguiente **Tabla** se presentan la clasificación de las diferentes etapas de la ERC de acuerdo con la *American Society of Nephrology* (ASN).

Etapa	Tasa de Filtración Glomerular estimada (eTFG) [mg/mL/1.73m ²]	Observaciones
1	90	TFG normal c/proteinuria
2	60-89	Caída de la TFG relacionada con la edad
3A	30-59	Bajo riesgo de progresión a falla renal
3B	30-59	Bajo riesgo de progresión a falla renal
4	15-29	Alto riesgo de progresión a falla renal
5	15-29	Alto riesgo de progresión a falla renal
5D	<15	Falla renal
5T	<15	Falla renal

Tabla 2. Clasificación de la ERC de acuerdo con la American Society of Nephrology (ASN).

Factores de Riesgo para desarrollar Enfermedad Renal Crónica

La ERC tiene un componente hereditario,⁶⁹ en estudios de asociación del genoma completo para identificar locus susceptibles para la tasa de filtración glomerular, creatinina sérica estimada, cistatina C y ERC en participante europeos de cuatro poblaciones se encontró que las mutaciones de uromodulina estaban asociadas con diferencias en la función renal. Otra mutación identificada está relacionada a APOL1.⁷⁰ Un patrón autosómico recesivo de herencia es demostrado y asociado con un mayor riesgo de ESRD (*End Stage Renal Disease*). El involucramiento de los genes del sistema renina-angiotensina parece ser relevante en la ERC. En un estudio con 135 pacientes con ERC y 270 controles sanos se genotipificaron polimorfismos para el angiotensinógeno, la enzima convertidora de angiotensina I y el receptor de angiotensina II tipo 1. Se encontraron asociaciones significativas entre los polimorfismos y los pacientes con ERC.⁷¹

La función renal disminuye con la edad tanto en hombres como en mujeres. Entre la población más anciana, más de la mitad de los sujetos evaluados tienen ERC de etapa 3-5 de acuerdo con las guías de la K/DOQI (National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) Así, la población más anciana está más propensa a desarrollar ERC después de varias lesiones renales.⁷² Uno de los factores de riesgo más fuertes, aunque modificables, para la ESRD en el siglo 21 es la obesidad.⁷³ La hipertrofia glomerular y la hiperfiltración puede acelerar el daño renal al incrementar la tensión de la pared capilar del glomérulo y disminuir la densidad de podocitos.

Un estudio epidemiológico de Suecia demostró el papel de la obesidad en la ERC,⁷⁴ En este estudio se analizaron pacientes con ERC y se asoció el sobrepeso (IMC \geq 25 kg/m²) a los 20 años con un riesgo significativo tres veces mayor para la ERC en comparación con el IMC $<$ 25 kg/m². La obesidad (IMC \geq 30) entre hombres y la obesidad mórbida (IMC \geq 35) entre mujeres en cualquier edad se asoció a un incremento de tres a cuatro veces más en el riesgo de ERC. Además, la obesidad puede contribuir a la patogénesis del daño renal a través de la inflamación, estrés oxidativo, disfunción endotelial, estado protrombótico e hipervolemia.⁷⁵

El tabaquismo puede incrementar el riesgo de ERC a través del estado proinflamatorio, estrés oxidativo, cambio protrombótico, disfunción endotelial, glomeruloesclerosis y atrofia tubular.⁷⁵ El alcohol y las drogas recreacionales han sido ligadas a la progresión del ERC así como un uso excesivo de analgésicos y la exposición a metales pesados.⁷⁶ La diabetes Mellitus (DM) es la causa principal de ERC y ESRD tanto en ciudades desarrolladas como en vías de desarrollo.⁷⁷ Los mecanismos que llevan a la enfermedad renal en diabetes incluyen la lesión por hiperfiltración, glicosilación de productos finales avanzada y especies reactivas de oxígeno.⁷⁸ A nivel molecular, numerosas citocinas, factores de crecimiento y hormonas como TGF- β y angiotensina II causan cambios patológicos asociados con la nefropatía diabética.

La hipertensión ha sido definida como factor de riesgo para ERC y ESRD y aporta el 27% de todos los pacientes de ESRD en Estados Unidos y 28% de los pacientes con hemodiálisis en Turquía.^{68,78} La hipertensión sistémica es transmitida a presión capilar intraglomerular llevando a glomeruloesclerosis y pérdida de la función renal.

La hipertensión generalmente es diagnosticada entre los 25 a 45 años, pero la disfunción renal no se desarrolla hasta que el paciente mantenga al menos 10 años de hipertensión incontrolada.⁷⁸

Enfermedad Renal Crónica y Fibrosis

Como se mencionó anteriormente, la ERC se ha asociado a la fibrosis intersticial como principal proceso patológico que subyace a la progresión de la ERC y finalmente lleva a la ESRD, siendo el indicador más fuerte de la progresión de la enfermedad,⁷⁹ incluso cuando la enfermedad primaria es de origen glomerular.⁸⁰ La fibrosis se define como la acumulación y remodelamiento desregulado de la Matriz Extracelular (ECM)^{79,81,82} afectando todos los compartimentos principales del riñón: glomérulos, túbulos y vasculatura.⁷⁹

La fibrosis renal es el resultado de una falla en el proceso de reparación de una herida que ocurre después de un daño inicial.^{79,82} La fisiopatología de la fibrosis renal puede ser dividida en cuatro fases: 1) activación celular y fase de lesión o iniciadora; 2) fase de señalización fibrogénica o activación; 3) fase de fibrogénesis o ejecución; y 4) fase destructiva o progresión. Estas fases son llevadas a cabo por diferentes células y moléculas que intervienen en el proceso.⁷⁹

Hoy en día, la biopsia renal es el único método para detectar la fibrosis renal. Es un proceso invasivo con complicaciones posibles.⁸³ Las técnicas de imagen, como el ultrasonido pueden mostrar señales de diferenciación corticomedular, la cual es un marcador sensible pero no específico de la ERC.⁸⁴ Algunas moléculas involucradas en la inflamación o en la señalización que llevan al establecimiento de la fibrosis

han sido estudiadas como posibles marcadores de fibrosis renal.⁷⁹ Aunque el propósito de estos marcadores es detectar una respuesta aguda a la lesión, algunos también han sido evaluados como marcadores tempranos de ERC. Estas moléculas incluyen el receptor del factor de necrosis tumoral II (TNFRII), TGF- β 1.⁸⁵ Siendo esta la molécula más importante en el desarrollo de la fibrosis intersticial.^{81,82,86}

Se ha aceptado el papel de los miofibroblastos en la fibrosis renal, sin embargo, existe una gran ambigüedad en el establecimiento del origen de estas células.⁸² Estudios innovadores han revelado que las células epiteliales también pueden presentar características de tipo fibroblastos en varias enfermedades renales, apoyando la teoría de la transición epitelio mesénquima (EMT).⁸⁷ Por lo tanto, la EMT tubular es un proceso por el cual las células tubulares renales pierden sus características fenotípicas epiteliales y adquiere unas nuevas, las cuales son características de las células mesenquimales. Por lo que estas células exhiben una capacidad de transformación después de las cuales pueden producir ECM.⁸²

Reportes recientes en biopsias renales apoyan que existen células tubulares con características de EMT en pacientes con enfermedad tubular crónica.⁸² En un trabajo en 133 biopsias renales humanas de varias enfermedades renales, independientemente de las lesiones histológicas, se encontró que la EMT de las células epiteliales tubulares estaba presente en muchas muestras y la extensión de la EMT correlacionaba con el grado del daño intersticial.⁸⁸

La EMT es regulada por muchos factores de crecimiento, citocinas, hormonas y otras moléculas de varias maneras. Entre todos los factores que han sido implicados, el principal parece ser TGF- β 1. Este mediador actúa principalmente a

través de la activación de la señalización de *Smad*, las cuales son responsables de la síntesis de proteínas necesarias para la modificación de la EMT.⁸² Además, constituye el blanco de diferentes tipos de estímulos como la hipoxia, que sobrerregula la actividad transcripcional del promotor de TGF- β 1 en varios tipos de células, actuando como un estímulo fisiológico potente para la síntesis de colágeno.⁸⁹ Otro estímulo que lleva a un incremento en la expresión de TGF- β 1 es representado por Angiotensina I,⁹⁰ el cual también induce la síntesis de colágeno y fibronectina, interactuando con el receptor de angiotensina II tipo 1.⁹¹

TGF- β 1 liberada por las células renales o células infiltradas del riñón dañado modera la reacción inflamatoria y contribuye a la reparación del daño.⁸⁶ En el tejido dañado, los macrófagos activados producen citocinas como TGF- β y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), los cuales estimulan la formación de miofibroblastos de los fibroblastos intersticiales residentes. Estos miofibroblastos, bajo la acción de TGF- β y CTGF, sintetizan una gran cantidad de proteínas de la matriz como fibronectina y colágeno tipo 1 y 3, además, previenen la degradación de estas proteínas al sintetizar inhibidores de proteasas como el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) y TIMP.⁸⁶

En conclusión, la ERC puede presentar fibrosis intersticial, lo que representaría una fuente de biomarcadores adicionales a los ya establecidos y que se revisarán a continuación.

Biomarcadores de Enfermedad Renal Crónica

La TFG y una excreción aumentada de proteínas urinarias y albúmina así como altos grados de atrofia túbulo intersticial y fibrosis están asociados con una pobre prognosis de la ERC.^{58,92} En etapas tempranas, los síntomas de la ERC generalmente no se observan. Una reducción significativa de la función renal es la primera señal obvia de la enfermedad. Si se diagnostica de manera temprana (etapas 1 a 3), la progresión de la ERC puede ser alterada y se pueden reducir las alteraciones.⁵⁸ Es por esto que existe una necesidad de establecer biomarcadores de siguiente generación. Debido al desarrollo de la genómica, epigenética, transcriptómica, proteómica y metabolómica, la introducción de técnicas novedosas permitirá la identificación de biomarcadores nuevos en las enfermedades renales.⁹³

La proteína uromodulina (también conocida como proteína *Tamm-Horsfall*) es una glicoproteína que probablemente está involucrada en la protección de las células tubulares de infecciones del tracto urinario ascendente involucradas en la pielonefritis crónica y urolitiasis.⁹⁴⁻⁹⁶ Los niveles de la proteína uromodulina en orina es abundante. Esta es liberada por las células tubulares hacia el intersticio, sin embargo, su papel fisiológico permanece desconocido.⁹⁷ Uromodulina ha sido propuesta como un biomarcador prometedor por el número de nefronas intactas, lo que indica masa renal más que función renal. Las concentraciones proteicas de uromodulina disminuyen gradualmente con el empeoramiento de la función renal. En pacientes con etapas avanzadas de ERC, la uromodulina cae más de 10 veces.⁹⁶

La molécula de lesión renal 1 (KIM-1, por sus siglas en inglés) es un tipo de proteína transmembranal tipo 1. Ha mostrado estar sobrerregulada en células epiteliales desdiferenciadas del túbulo proximal en el riñón después de isquemia o un daño tóxico.^{98,99} No es detectable en riñones sanos ni en orina. La sobrerregulación de KIM-1 es una consecuencia del daño al túbulo proximal en la nefrona.¹⁰⁰ La lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL, lipocalina o lipocalina 2, LCN) es una de las primeras moléculas que desencadenan el desarrollo del riñón, convirtiendo las células mesenquimales embrionarias en células epiteliales formadoras de túbulos y las nefronas completas.^{101,102} Es expresada por las células epiteliales tubulares en respuesta a lesiones y daño tubulointersticial, el cual ocurre frecuentemente en el curso de la progresión de la enfermedad renal.^{79,103–105}

La proteína de unión a ácidos grasos de tipo hígado (L-FABP) es una proteína expresada en el túbulo proximal del riñón.¹⁰⁴ La expresión aumentada y la excreción urinaria han sido descritos en modelos animales, así como humanos con enfermedad renal aguda.¹⁰⁶ Aunque su función precisa es desconocida, L-FABP en el riñón ha sido postulada para representar un antioxidante endógeno capaz de suprimir el daño tubulointersticial.¹⁰⁷ En un estudio clínico que incluyó 120 pacientes con ERC no diabéticos se evaluaron los niveles de L-FABP como marcador de ERC. Los niveles urinarios de L-FABP correlacionó con las proteinuria y los niveles de creatinina séricos. Además, los niveles de L-FABP eran significativamente más altos en el grupo de pacientes con ERC de etapa media que evolucionaron a una enfermedad más grave.

La proteína de choque térmico de 70 kDa, Hsp72 se ha evaluado como biomarcador de lesión renal aguda (LRA). En un estudio del grupo de la Dra. Bobadilla se evaluaron los niveles del mRNA y de la proteína de Hsp72 tanto en riñones como en orina de ratas con LRA, encontrando que los niveles incrementaban gradualmente con la magnitud de la LRA.¹⁰⁸ La Hsp27, también se ha evaluado en pacientes con obstrucción de la unión uretero-pélvica encontrando que estas obstrucciones se caracterizaban por fibrosis tubulointersticial y estrés oxidativo, concluyendo que los patrones de expresión de Hsp27 correlacionaban con la duración de la obstrucción y que Hsp27 era inducida como una respuesta adaptativa durante las obstrucciones de las uniones uretero-pélvicas.^{109,110}

Los biomarcadores mencionados anteriormente se resumen en la **Tabla 3**.

Marcador	Relevancia Clínica	Determinación	Referencia
Uromodulina+	Protección de las células epiteliales tubulares	Concentración sérica	Prajczer S. (2010) <i>Dial Transplant</i>
KIM-1+	Molécula de daño renal	RTq-PCR	Humphreys B.D. (2013) <i>J Clin Invest</i>
NGAL+	Relacionado a la progresión de la ERC	Microarreglos	Nakagawa S. (2015) <i>PLoS ONE</i>
L-FABP*	Marcador de evolución de la ERC	ELISA	Portilla D. (2008) <i>Kidney Int</i>
Hsp72*	Incrementada en pacientes con Enfermedad Renal Aguda.	RTq-PCR	Barrera-Chimal J. (2010) <i>EMBO Mol Med</i>
Hsp27*	Retrasa la lesión tubular y mantiene los niveles proteicos de E-cadherina	IHQ	Vidyasagar A. (2012) <i>Fibr Tiss Rep</i>
TFG-β*	Aumenta la síntesis de proteínas de la Matriz Extracelular (ECM)	RT-PCR, inmunodetección	Varios estudios

Tabla 3. Biomarcadores estudiados y propuestos para el uso en la clínica. Se indican los marcadores presentados en diferentes estudios que muestran una asociación con la etapa de la ERC y su progresión. (+) marcadores estudiados y de asociación establecida. (*) marcadores propuestos para el análisis de asociación.

Relación entre Cáncer Renal y Enfermedad Crónica

Además de las comorbilidades ya bien establecidas, los pacientes con ERC pueden tener un mayor riesgo de desarrollar carcinoma de células renales (CCR), cuya incidencia también ha estado aumentando en las últimas décadas. El artículo de Lowrance et al. 2014, informa sobre la relación entre la tasa de filtración glomerular estimada (eTFG) y riesgo de CCR. Aunque la asociación observada entre ERC y el riesgo de CCR puede ser realmente causal, varias explicaciones alternativas merecen consideración. Estos estudios, respaldan el papel etiológico de la insuficiencia renal en el desarrollo de CCR.⁵² La asociación más fuerte entre la TFGe y el cáncer renal de células claras en comparación con el cáncer renal de células no claras pueden dilucidar aún más los fundamentos biológicos de la asociación de la ERC y el cáncer renal (OncoNefrología).⁵¹

Otros estudios han reportado que los pacientes oncológicos ya presentaban una ERC preexistente. En estudios de enfermedad renal y medicación anticáncer (IRMA, por sus siglas en inglés) se observó que más de la mitad de los pacientes con una malignidad activa presentaron una TFG <90mL/min por 1.73m².^{54,57,111} Resultados similares se han reportado en otros países confirmando que la ERC es una característica relativamente común en los pacientes con cáncer, sin importar el tipo de malignidad.⁵⁷ Interesantemente, la relación entre el riñón y el cáncer parece ser bidireccional. Por ejemplo, la ERC preexistente puede impactar en la biodisponibilidad y/o seguridad de los fármacos antineoplásicos, llevando a diferentes y subóptimas opciones de tratamiento. Por otro lado, es posible que los

efectos renales de un fármaco antineoplásico novedoso puedan llevar a una lesión renal progresiva o empeorar la ERC preexistente.¹¹²

En un estudio con una cohorte retrospectiva se evaluó la asociación entre la TFG y el riesgo de cáncer incidental, encontrando que una TFG disminuida se asociaba con un incremento en el riesgo de cáncer renal.⁵¹ Además, la ERC, confiere una mortalidad aumentada específica de cáncer en pacientes con cáncer del riñón y del tracto urinario.⁵³

En estudios recientes de seguimientos de pacientes después de la nefrectomía se ha reportado que en algunos casos el tipo de resección influye en la TFG residual, presentado resultados contradictorios donde la nefrectomía parcial ha mostrado no afectar la función renal mientras que la nefrectomía radical mostró un daño renal en los pacientes estudiados. En otros estudios la nefrectomía parcial ha mostrado mayor daño renal por el estrés crónico que ha sufrido el riñón residual.^{50,113}

Varios posibles mecanismos biológicos pueden ayudar a explicar la asociación entre el nivel de función renal y el desarrollo de cáncer renal. La disfunción renal produce un estado de inflamación crónica y estrés oxidativo, donde, dicho microambiente inflamatorio puede desempeñar un papel en el desarrollo del cáncer.^{50,113} Se ha planteado que la formación de ECM fibrótica rompe la polaridad de las células y estimula su proliferación, creando condiciones para el establecimiento y desarrollo del cáncer.¹¹⁴

El mecanismo de la fibrosis ha sido un tema controversial, ya que ha mostrado tener una doble participación en el desarrollo del cáncer. Por un lado, existe amplia

evidencia en la literatura a favor de la participación de la transición fibroblasto/miofibroblasto en la interacción entre las células epiteliales y el estroma que está detrás de la fibrosis, llevando a cabo transformación neoplásica y el proceso de progresión. Por lo tanto, la presencia de lesiones fibróticas incrementa el riesgo de cáncer en varios tejidos incluyendo pulmón, hígado y mama.⁸⁶

Otro aspecto que tienen en común la fibrosis y el cáncer es el proceso de EMT, el cual determina cambios significativos en la morfología y comportamiento de las células epiteliales, transformándolas en miofibroblastos e interviene no solo durante el desarrollo embrionario sino también en los procesos patológicos como la progresión tumoral y la fibrosis.^{115,116}

Evidencia experimental está a favor de la participación de TGF- β en el desarrollo y, sobre todo, en la progresión metastásica de las enfermedades neoplásicas.⁸⁶ Se ha mostrado que TGF- β incrementa los niveles de la metaloproteinasa MMP-2 de la colagenasa de la matriz a través de diferentes vías de señalización.¹¹⁷

La fibrosis constituye la vía final de diferentes tipos de lesiones renales. Además, se han reportado diferentes estudios que presentan la existencia de una correlación entre fibrosis y el cáncer. Incluso, parece que la fibrosis en alguna manera predispone a la transformación neoplásica del parénquima involucrado.⁸⁶

Sin embargo, también existe otra hipótesis que contradice lo anteriormente mencionado y postula que es posible que la fibrosis pueda proveer un tipo de protección contra el desarrollo del cáncer como consecuencia de una intensa proliferación que caracteriza cualquier proceso inflamatorio.⁸⁶ La flogosis representa

este proceso protector encargado de eliminar la fuente del daño y sus consecuencias, reparando e incluso regenerando el tejido dañado con células del mismo tipo o por la formación de una cicatriz a través del reemplazo de células del parénquima con tejido conectivo (fibrosis).⁸⁶ Parece ser que a través de la evolución los vertebrados han perdido la capacidad regenerativa después de un daño al órgano o tejido. Esto puede ser útil para organismos superiores donde la pérdida de la función del órgano podría ser una mejor alternativa que la regeneración del tejido, ya que el mantenimiento de células pluripotentes parece ser incompatible con la vida prolongada del organismo. Incluso, la producción y proliferación de células pluripotentes pueden resultar en la formación de un tumor, desarrollo de y la posible muerte del organismo.¹¹⁸

Por esta razón, la fibrosis podría estar involucrada en los mecanismos que relacionan a la ERC y el CR mediante la reparación del tejido dañado, donde después de una lesión progresiva del tejido, en este caso la nefrona, puede resultar ya sea en fibrosis, generando la enfermedad renal crónica y posteriormente llevar al desarrollo del cáncer, o directamente generar una neoplasia renal. Y por otro lado, durante el desarrollo del cáncer puede tener un papel protector, ya que no permitiría el desarrollo del tumor. Esta “elección” de las células involucra moléculas endógenas y del microambiente que rodea a la lesión, donde una firma de marcadores moleculares podría desencadenar en fibrosis o cáncer renal, este hecho se presenta en la **Imagen 1**, donde se muestra la relación entre el CR y la ERC a partir del daño renal.

Sin embargo, la fibrosis puede ser uno de varios mecanismos involucrados en esta relación bidireccional, por lo que estos y otros mecanismos merecen un estudio adicional para definir mejor la asociación entre la función renal y el riesgo de cáncer específico del sitio. Estudios genómicos pueden contribuir a una mejor identificación de pacientes con mayor riesgo de ERC y/o una mayor carga de enfermedad, al diseñar mejores perfiles de riesgo genético-epigenético. Una mejor comprensión de las variaciones interindividuales en la progresión y el resultado en la ERC es un primer paso para llevar la medicina de precisión al cuidado renal, tanto en el ámbito preventivo como terapéutico.

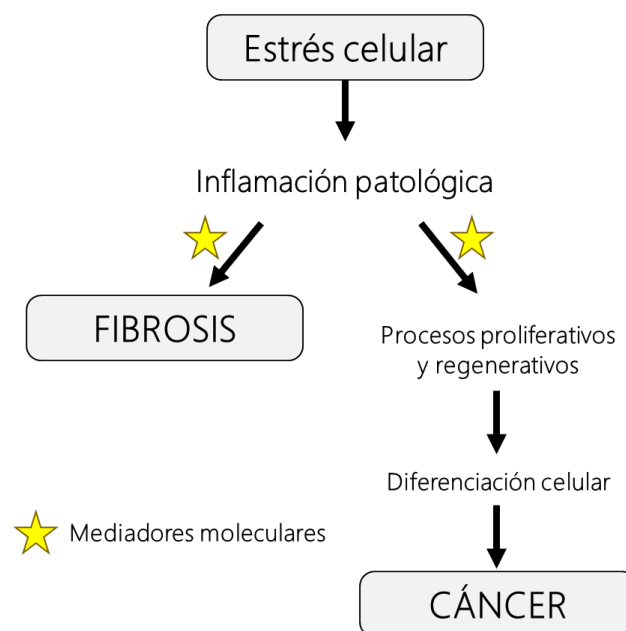


Imagen 1. Desviaciones de las lesiones constantes. Esquema traducido a partir de Cernaro V., Lacquanti A., et. al. (2012) *Nephrol Dial Transplant*

V. Antecedentes directos

En un primer acercamiento a la evaluación de la funcionalidad del riñón residual en pacientes con cáncer renal, a los cuales se les practicó una nefrectomía como primera línea de tratamiento, se realizó un análisis de la evolución de la Tasa de Filtración Glomerular estimada (TFGe). Este valor se calculó mediante la fórmula de MDRD. Se evaluaron 119 pacientes de una cohorte retrospectiva diagnosticados con Carcinoma Renal de Células Claras (ccRCC) en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Esta cohorte resulta de un protocolo clínico aprobado por el comité de ética e investigación del INCan con clave INCAN/CI/322/16 e INCAN/CI/388/16 durante el periodo 2017-2019.

La fórmula de MDRD retoma los datos de concentraciones séricas de albúmina, creatinina y urea; así como la edad y género del paciente. Con los datos obtenidos se pudo clasificar a los pacientes en las diferentes etapas de la Enfermedad Renal Crónica antes, 3 y 12 meses después de la nefrectomía. Los pacientes presentaron una evolución de la TFG desde la Etapa 1 con un valor mayor a $90 \text{ ml/min} * 1.72\text{m}^2$, donde los pacientes no muestran signos claros de la ERC, presentando una funcionalidad aparentemente “normal”; hasta la Etapa 4 y 5 con valores menores a $30 \text{ ml/min} * 1.72\text{m}^2$, donde los pacientes requieren un tratamiento específico como la diálisis o trasplante renal. Esta evolución de los pacientes evaluados en la cohorte se observa en la **Imagen 2A**.

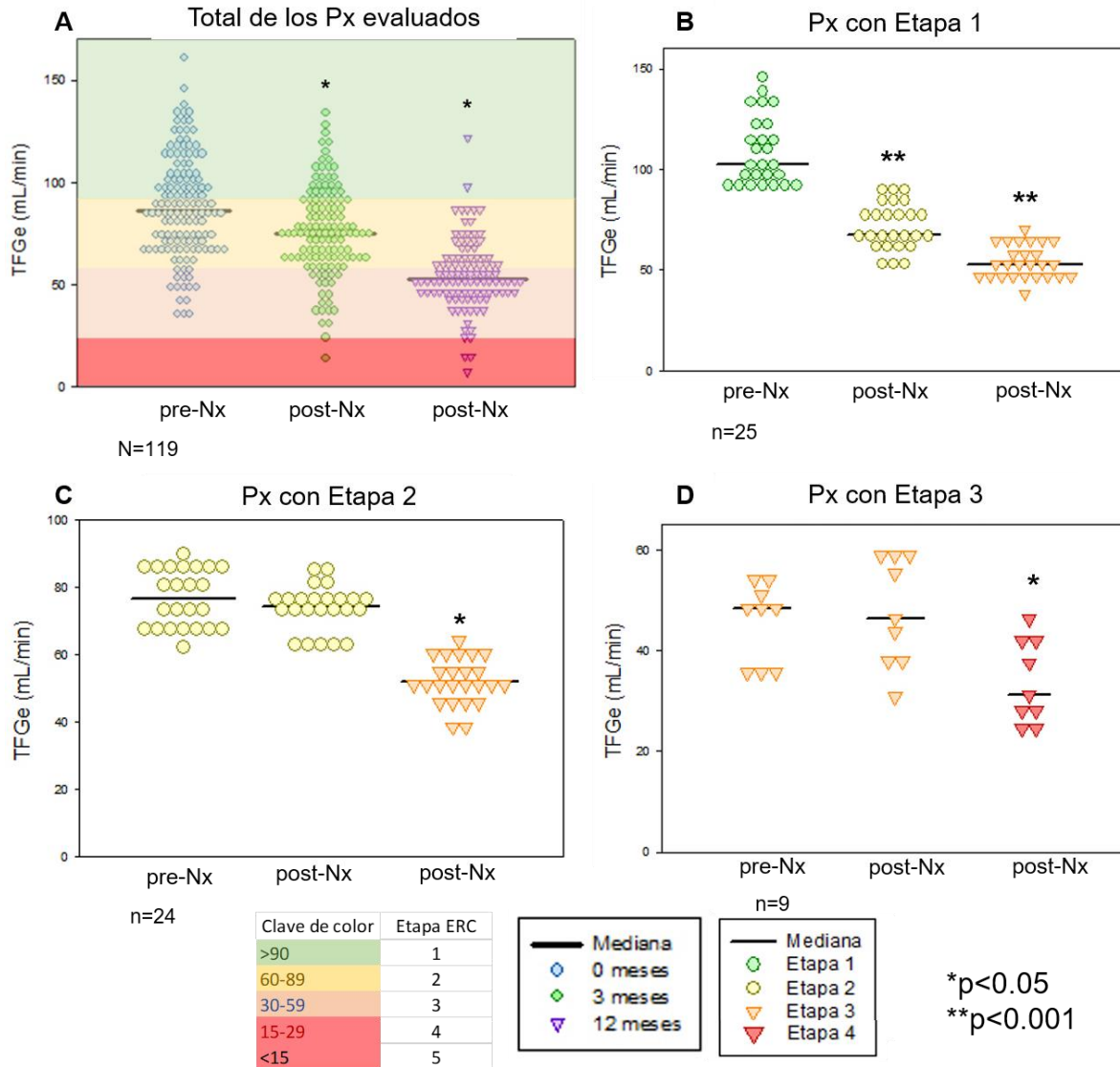


Imagen 2. Evolución de la TFGe en pacientes con cáncer renal nefrectomizados a (3 y 12 meses después de la cirugía). **A)** Evolución global de los pacientes incluidos en el análisis, con una N=119. Los colores representan las diferentes Etapas de la ERC como se indica en el cuadro de anotaciones en la parte inferior izquierda de la imagen. **B, C y D)** subgrupos de pacientes identificados en la cohorte de pacientes. La n analizada se muestra debajo de la gráfica. La notación se presenta en el cuadro inferior derecho. Todas las pruebas estadísticas se realizaron contra 0 meses y una p<0.05 (*) y p<0.001 (*).

A partir de estos resultados se obtuvieron subgrupos de pacientes, donde los pacientes que mostraron una Etapa 1 antes de la nefrectomía disminuía su función renal después de los 3 meses de seguimiento hasta una Etapa 3 como se observa

en la **Imagen 2B**. De manera interesante, los pacientes que presentaban una Etapa 2 y 3 antes de la nefrectomía no mostraron una disminución significativa de la TFG hasta 12 meses después de la cirugía. Esta evolución se puede observar en la **Imagen 2C y 2D**, respectivamente. Adicionalmente, se identificó un grupo pequeño de pacientes que después de los 12 meses de seguimiento presentaban una etapa 4 y/o 5, sugiriendo que estos pacientes podrían fallecer por una falla renal más que por el cáncer (**Imagen 2D**).

VI. Planteamiento del problema

Previamente se ha reportado la asociación entre la Enfermedad Renal Crónica y el Cáncer Renal; sin embargo, no existen biomarcadores que predigan dicha asociación, y menos aún, el mecanismo por el cual el CCR favorece el desarrollo de ERC y viceversa. Como una primera aproximación para comprender la posible la relación entre estas dos patologías, proponemos determinar el comportamiento de marcadores de ERC en pacientes diagnosticados con CCR.

VII. Hipótesis

Los biomarcadores que ayuden al diagnóstico y progresión de la ERC se presentarán en pacientes diagnosticados con ccRCC asociándose a un peor pronóstico y progresión del cáncer, mientras que la ausencia o disminución de los biomarcadores se asociará con un mejor pronóstico.

VIII. Objetivos

Objetivo general

Identificar un panel de biomarcadores diagnóstico y de progresión de la ERC en pacientes con ccRCC post-nefrectomía, y establecer su posible asociación en la relación bidireccional entre enfermedad renal crónica y cáncer renal.

Objetivos particulares

1. Establecer una cohorte retrospectiva de pacientes con CCR sometidos a nefrectomía y generación de una base de datos clínicos e histopatológicos.
2. Determinar parámetros clínicos y tisulares de daño renal en pacientes con CCR en tejido renal tumoral y adyacente; así como, determinar la TFGe en pacientes con CCR.
3. Determinación de marcadores moleculares de ERC y CCR, por qRT-PCR e inmunohistoquímica.
4. Análisis de asociación entre el porcentaje de fibrosis, la TFGe, las variables clínico-histopatológicas que estadifican y pronostican el CCR con los marcadores moleculares obtenidos mediante IHQ.
5. Establecer un panel de biomarcadores de diagnóstico y progresión de la ERC que permita identificar subgrupos de pacientes con CCR que presenten progresión de la enfermedad renal o ausencia de ella.

IX. Metodología

Reclutamiento de pacientes con CCR

Para el análisis de la cohorte retrospectiva de los pacientes diagnosticados con Cáncer Renal, se tomaron bloques de tejido embebidos en parafina de la cohorte de un protocolo clínico aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Cancerología (Clave: ICAN/CI/233/16 e INCAN/CI/388/16) en el periodo 2017-2019. Estos pacientes fueron diagnosticados con Carcinoma Renal de Células Claras (ccRCC) en el INCan y sometidos a nefrectomía. Los que cumplieron los criterios de inclusión, exclusión y eliminación se les tomaron muestras biológicas tales como tejido adyacente al tumor (TN) y tejido tumoral (TC),. De estos pacientes se tomaron diferentes variables clínicas obtenidas de una base de datos validada por el Departamento de Urología del INCan. Estas variables incluyen los valores de albúmina y creatinina sérica, para el cálculo de la TFGe; el estado de la enfermedad del paciente reportado mediante el sistema TNM, donde “T” representa el tamaño del tumor, “N” la invasión a nódulos linfáticos y “M” la presencia de metástasis en el paciente y la supervivencia libre de la enfermedad a 24 meses posterior al diagnóstico del CR.

Toma y recolección de muestras

Después de que el paciente ha sido diagnosticado con Cáncer Renal y de firmar el consentimiento informado, se obtendrán muestra de tejidos de los pacientes, clasificados por el departamento de patología del INCan en dos tipos diferentes:

tejido adyacente al tumor (TN) y tejido tumoral (TC). A partir de estos tejidos, una porción se utilizará para los análisis histopatológicos y otra para su criopreservación.

Estudios histopatológicos

Una porción de las muestras de tejido obtenidas se incluirá en parafina, para posteriormente obtener secciones del tejido utilizando un microtomo de la marca Thermo Fischer Scientific modelo HM325. Se realizarán cortes de 4 μm para las siguientes metodologías. tinción de hematoxilina y eosina, fibrosis e inmunohistoquímicas de los marcadores propuestos. Las imágenes se capturarán con el microscopio AxioScan Z1 (Carl Zeiss) en un objetivo de 20x.

Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E)

Los cortes de 4 μm se colocarán en portaobjetos no cargados. Estos se desparafinarán en un tren de alcoholes en orden ascendente de polaridad sumergiendo las laminillas en cada solvente durante 5min. Posteriormente, se colocarán en solución de Hematoxilina durante 5min y se lavarán con agua corriente. Después, se realizarán diez inmersiones en una solución de Carbonato de litio sobresaturada y se lavarán con agua corriente. Se mantendrán en etanol al 96% para posteriormente realizar tres inmersiones rápidas en eosina y se lavarán inmediatamente con agua corriente y finalmente con etanol al 96%. Para el montaje, las laminillas se mantendrán en Xilol hasta la aplicación de la resina.

Tinción de Rojo de Sirio

Las secciones de 4 µm se prepararán en portaobjetos y se desparafinarán calentándolos a 62°C y posteriormente se sumergirán durante 10 minutos en Xilol, se retirarán y nuevamente se sumergirán 5 min en xilol nuevo, posteriormente se sumergirán en etanol al 96% y finalmente en etanol al 70%. Finalmente se rehidratarán con agua bidestilada y se realizará la tinción como lo indica el protocolo del Rojo de Sirius (*Picro Sirius Red Stain Kit* Abcam ab150681). Las tinciones resultantes se analizarán por microscopía óptica a un objetivo de 40x utilizando el microscopio *AxioScan* de Zeiss y se procesarán con el software Zen 3.1. Finalmente, se determinará el área teñida de color rojo/violáceo utilizando el software ImageJ.

Ensayos de Inmunohistoquímica

Después de obtener los cortes de 4 µm de los tejidos embebidos en parafina de la cohorte retrospectiva se colocarán en portaobjetos cargados. Estas muestras se pasarán por un tren de solventes para desparafinar los tejidos y continuar con la técnica. Se suprimirá la actividad de la peroxidasa endógena agregando peróxido de hidrógeno al 3% a las laminillas. Posteriormente se lavarán con PBS.

Utilizando los reactivos del kit *IHC Select Immunoperoxidase Secondary Detection System* (Millipore, #Cat. DAB500), se siguió el manual incluido variando la concentración de los anticuerpos contra los marcadores a estudiar y el tiempo de incubación de estos. En el **Apéndice 1** se incluye la lista de los anticuerpos utilizados y la concentración de cada uno.

Ensayos de Western Blot

A partir del tejido tumoral renal se extrajeron proteínas totales mediante el buffer Ripa, de estas proteínas se cargaron 15µg para SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon®-P Transfer Membrane (Millipore, #Cat IPVH00010). Las membranas se incubaron durante 1h en buffer TBS-T y solución de bloqueo (BioRad, #Cat #1706404) al 5%. Se utilizó el anticuerpo primario contra GAPDH (**Apéndice 1**), el cual se incubó toda la noche a 4°C. Para la detección se utilizó un anticuerpo secundario Goat vs Rabbit con una incubación de 90 minutos a temperatura ambiente y se utilizó el kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate de (ThermoFischer Scientific #Cat 34580).

Para los demás anticuerpos se siguió el mismo procedimiento utilizando las diluciones indicadas en el **Apéndice 1**.

Extracción de RNA total a partir de tejido renal

La extracción de RNA total se realizó de ambos tipos de tejidos (TN y TC) utilizando el reactivo de *Trizol*, (TRizol Reagent Invitrogen, #Cat. 15596026) siguiendo el protocolo del proveedor. En un tubo eppendorf de fondo plano se colocaron aproximadamente 40 mg de tejido, se añadieron 400µL de trizol y se lisó con un homogeneizador de tejidos (Tissue Ruptor II, QIAgen). Se siguieron los pasos de “aislamiento y lavado” del RNA indicados en el protocolo para finalmente, desechar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en volúmenes de 30-50µL. Las muestras se incubaron a 60°C durante 10 min. Posteriormente, se cuantificaron y se verificó la

pureza del RNA mediante espectrofotometría con el equipo *Multiskan Sky* (Thermo Scientific). Finalmente se verificó la integridad del RNA mediante el corrimiento electroforético en geles de agarosa desnaturalizante al 1.5%.

Síntesis de cDNA (RT-PCR) a partir de RNA total extraído de tejido renal

El RNA total extraído de los tejidos obtenidos (TN y TC) se incubó a 50°C durante 5 min previo a la reacción de transcripción reversa. Usando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, #Cat. 4374966), se siguió el protocolo incluido tomando 1000ng de RNA total.

Determinación de biomarcadores por RT-qPCR

Para la validación de genes candidatos se utilizó el kit *Prime Time® Gene Expression Master Mix* (Integrated DNA technologies Inc., #Cat 1055770) y las sondas Hs.PT.39a.22214847 para el gen ACTB. Las sondas utilizadas para los marcadores de interés se muestran en el **Apéndice 1**. Se siguió el protocolo del kit preparando una mezcla de reacción (master-mix) concentración 10x. Los volúmenes de reacción se distribuyeron en una placa de 96 pozos y posteriormente se agregó el cDNA sintetizado a partir del RNA total obtenido de tejido TN y TC de cada paciente; llegando a un volumen final de 10µL. Las reacciones se incubaron en el termociclador *StepOne Plus* (ThermoFischer Scientific). Cada experimento de qRT-PCR se realizó por triplicado.

Los valores de expresión, considerando el ΔCt se obtuvieron comparando los ciclos obtenidos por cada gen de interés contra el gen control ACTB. Estos datos se

utilizaron para el análisis estadístico posterior, en el cual se investigó la implicación clínica de cada gen en los dos tipos de tejido: tejido adyacente al tumor TN y el tejido tumoral TC.

Análisis estadístico

Las curvas de supervivencia libre de recurrencia se calculan por el método de Kaplan-Meier con la comparación de la prueba de *log-rank*. El estadio TNM, el grado de Fuhrman y el tamaño tumoral se incluyen en el análisis de regresión multivariada. Los análisis estadísticos se realizan con el paquete de software *SigmaPlot* 12.0; donde una $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativa.

El análisis de regresión logística multivariada se utilizará para evaluar el panel de biomarcadores asociados con la ERC incidente al momento del diagnóstico y post-nefrectomía, desarrollada en un periodo de 3-12 meses, considerando: la edad, el sexo y los niveles séricos de albúmina, creatinina y urea para utilizar la fórmula de MDRD4 indicada para la determinación de la TFGe en pacientes oncológicos.

Para el análisis comparativo de la inmunexpresión de los biomarcadores y su asociación con las variables clínicas se utilizarán las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney y para los estadios de la enfermedad la prueba de Kruskal-Wallis.

X. Resultados

Características clínicas e histopatológicas de los pacientes con CCR

En este estudio se incluyeron 50 pacientes diagnosticados con CCR, de los cuales el 58% tenían una edad menor a 57 años, el 62% son hombres y el 42% de los pacientes presenta metástasis al momento del diagnóstico. De manera interesante, la mitad de los pacientes presenta un tamaño tumoral basado en la clasificación TNM de T3. Incluso, el 72% presentó un Grado Fuhrman 3 y 4, sugiriendo que la cohorte padece una etapa avanzada de la enfermedad. Además, el 68% de los pacientes tenía una TFGe <90mL/min previo a la nefrectomía. Un resumen de los datos clínicos de los pacientes se presenta en la **Tabla 1**.

Características Clínico-Histopatológicas		Número de pacientes (n=50)	
Edad	≤57	29	58%
	>57	21	42%
Sexo	M	31	62%
	F	19	38%
Metástasis (TNM)	M0	29	58%
	M1	21	42%
Grado Fuhrman	1 y 2	14	28%
	3 y 4	36	72%
Tamaño Tumoral (TNM)	T1 y T2	25	50%
	T3	25	50%
Progresión (<18 meses)	NP	36	72%
	P	14	28%
Sobrevida (<24 meses)	V	40	80%
	D	10	20%
TFGe	<90mL/min	34	68%
	>90mL/min	16	32%

Tabla 1. Características clínicas e histopatológicas de los pacientes con CCR incluidos en la cohorte retrospectiva. Se presenta el número de pacientes que presenta cada variable clínica de interés. M: Masculino. F: Femenino. M0: Sin metástasis al momento del diagnóstico. M1: Metástasis al momento del diagnóstico. NP: Sin progresión de la enfermedad. P: Progresión. V: Vivos. D: Decesos. TFGe: Tasa de Filtración Glomerular estimada.

Adicionalmente, se realizó un análisis comparativo entre la función renal residual reportada por análisis histológicos y la (TFGe), la cual se calculó por la fórmula de MDRD4. Este reporte es realizado por el departamento de patología del INCan y presenta la clasificación del daño renal de acuerdo con una tinción de H&E del tejido adyacente al tumor. Se clasifica desde 0 como función renal normal, 1 como glomerulonefritis, 2 nefritis túbulo intersticial y 3 como otros (inflamación crónica, quiste simple, pielonefritis, atrofia, etc.).

En la **Figura 1** se muestra la gráfica de *dot plot* del análisis comparativo entre la función renal residual (reportada por el departamento de histopatología del INCan) y la TFGe. En esta figura no se observan diferencias estadísticamente significativas, sugiriendo que la evaluación histológica no es suficiente para determinar la función renal del paciente. Por lo que es necesario evaluar la TFGe ya que nos da una mejor estimación de la función renal del paciente.

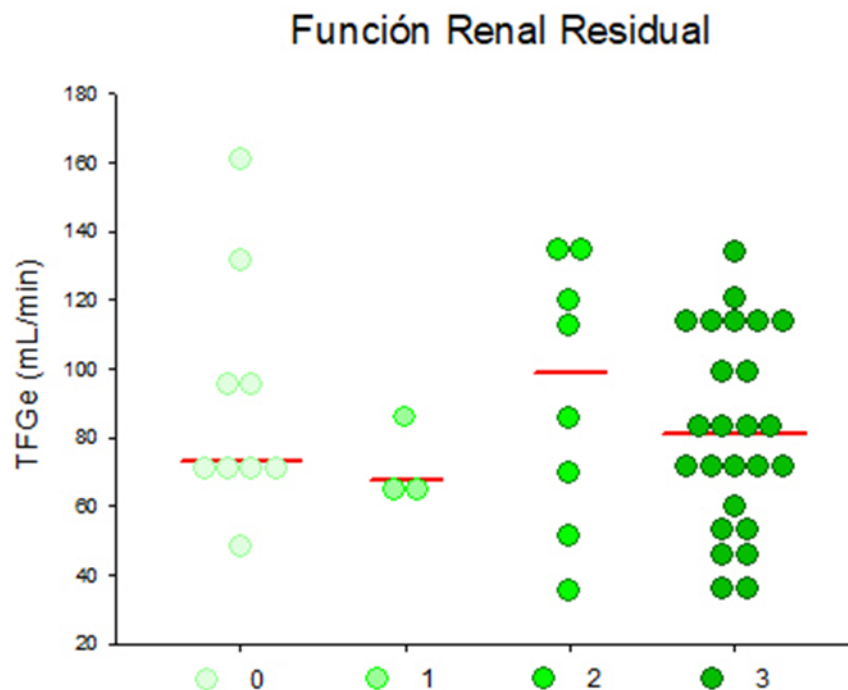


Figura 1. Análisis de la función renal residual reportada por histopatología vs TFGe. Se muestran la gráfica de *dot plot* de la comparación entre la TFGe y la clasificación de la función renal residual reportada por el departamento de patología. 0: función renal normal, 1: glomerulonefritis, 2: nefritis túbulo intersticial, 3: otros (inflamación crónica, quiste simple, pielonefritis, atrofia, etc.).

Determinación de fibrosis en los tejidos de pacientes con CCR

Con la finalidad de establecer y confirmar el área del tejido adyacente al tumor (TN) y el tejido tumoral (TC), así como la histología, se realizó una tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E). Se presentan imágenes representativas de la tinción en la **Figura 2**. En estas imágenes se observa una tinción de color rosado en todas las localizaciones básicas donde la eosina se unió (citoplasma, membrana, lumen del túbulo, etc.) mientras que la hematoxilina tiñe de color morado las regiones ácidas (núcleos).

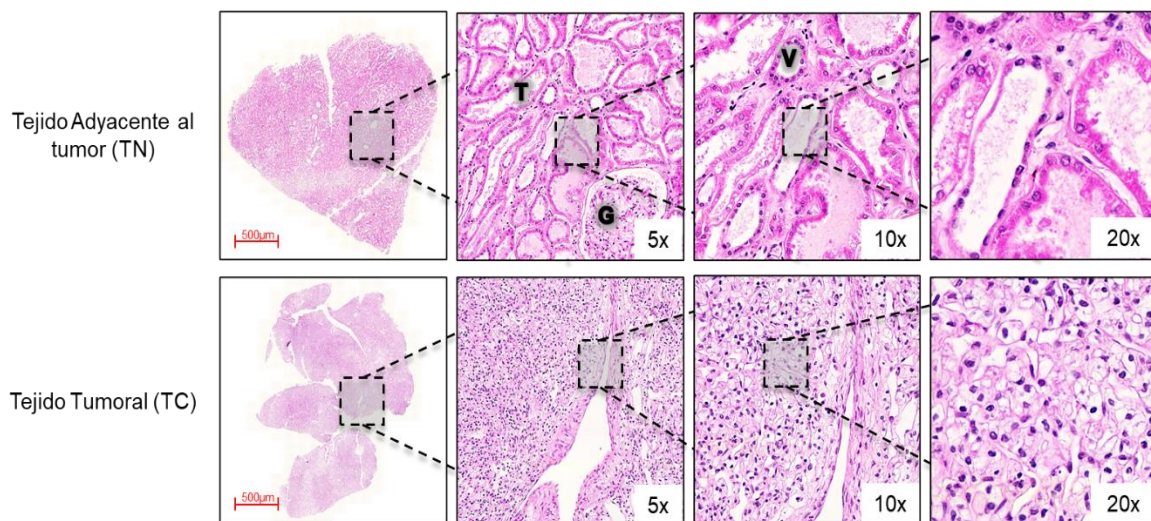


Figura 2. Tinción de H&E de los tejidos de la cohorte retrospectiva. Se muestran las imágenes representativas de la tinción con Hematoxilina y Eosina en el tejido adyacente al tumor (TN) en el panel superior y en el tejido tumoral (TC) en el panel inferior. Debajo de las imágenes se muestra el objetivo con el que fueron capturadas. El color rosa representa las regiones básicas teñidas por la eosina, mientras que el color morado corresponde a las regiones ácidas teñidas por la hematoxilina. T: Túbulos. G: Glomérulo.

Para determinar el grado de fibrosis en ambos tejidos, se llevó a cabo una tinción con Rojo de Sirio utilizando el Kit *Sirus Red* de Abcam en los tejidos de la cohorte retrospectiva. En este ensayo se obtuvo una magnificación de 5, 10 y 20x de aumento, donde se recolectaron imágenes de las diferentes áreas del tejido adyacente al tumor (TN) y el tejido tumoral (TC) mostradas en la **Figura 3**. Posteriormente, se calculó el porcentaje de área de fibrosis teñida en color rojo en

comparación con el área total teñida (tinción roja y amarilla) como se observa en la **Figura 4**.

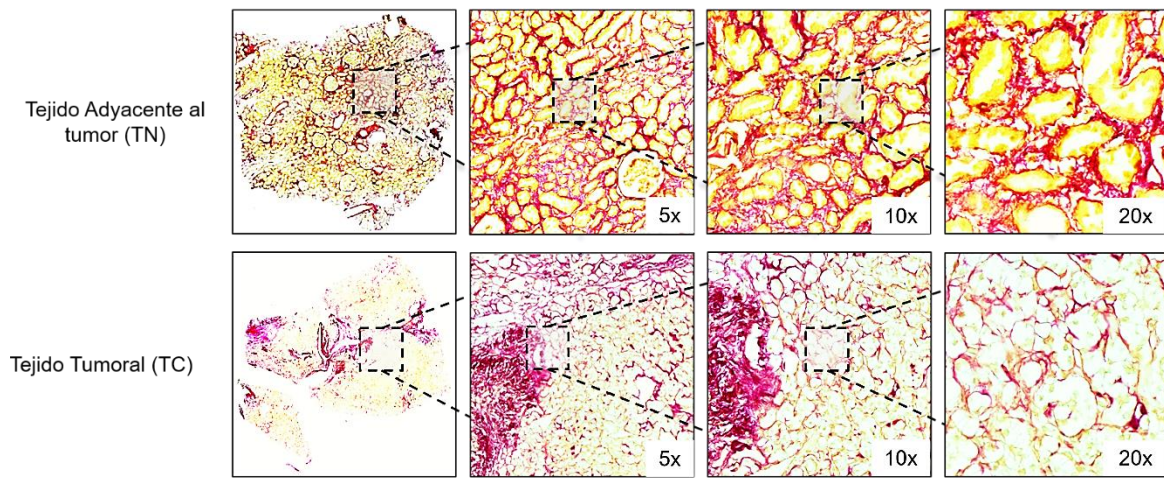


Figura 3. Determinación de fibrosis en los tejidos de la cohorte retrospectiva. Se muestran las imágenes representativas de la tinción con rojo de Sirius en el tejido adyacente al tumor (TN) en el panel superior y en el tejido tumoral (TC) en el panel inferior. Debajo de las imágenes se muestra el objetivo con el que fueron capturadas. El color rojo representa las fibras de colágena I y III teñidas por el compuesto, principalmente de matriz extracelular (ECM) y presencia de lesiones fibróticas.

En la **Figura 3** se presentan las imágenes representativas de las tinciones en ambos tipos de tejidos TN y TC. En esta figura se observan diferentes zonas de la tinción de Rojo de Sirio; la coloración roja representa la intercalación del compuesto en las fibras de colágena I y III, mientras que el amarillo representa el citoplasma o, en este caso, la región luminal de los túbulos renales. En las imágenes de TN se puede observar un arreglo definido de los túbulos en el corte histológico e incluso se puede observar un glomérulo, donde lo circunda una coloración roja correspondiente a matriz extracelular (ECM).

En el tejido tumoral (panel inferior de la **Figura 3**) se observa que la marca amarilla no se presenta indicando el fenotipo del tumor de células claras. En estas imágenes se representa la desorganización característica de un corte de tumoral, donde ya no se observan estructuras funcionales definidas como se tienen en TN.

Con las imágenes anteriores obtenidas en el microscopio y usando el programa *ImageJ*, se calculó el porcentaje de fibrosis como porcentaje del área roja en

relación con el área total de la imagen, tomando al menos 4 zonas representativas del tejido. En la **Figura 4** se presentan los resultados de este análisis donde se muestran las gráficas de barras de los porcentajes de fibrosis en ambos tipos de tejidos en la **Figura 4A** y **4B**. Adicionalmente se realizó un análisis comparativo entre TN y TC donde se presenta una diferencia significativa y un mayor porcentaje de fibrosis en TN.

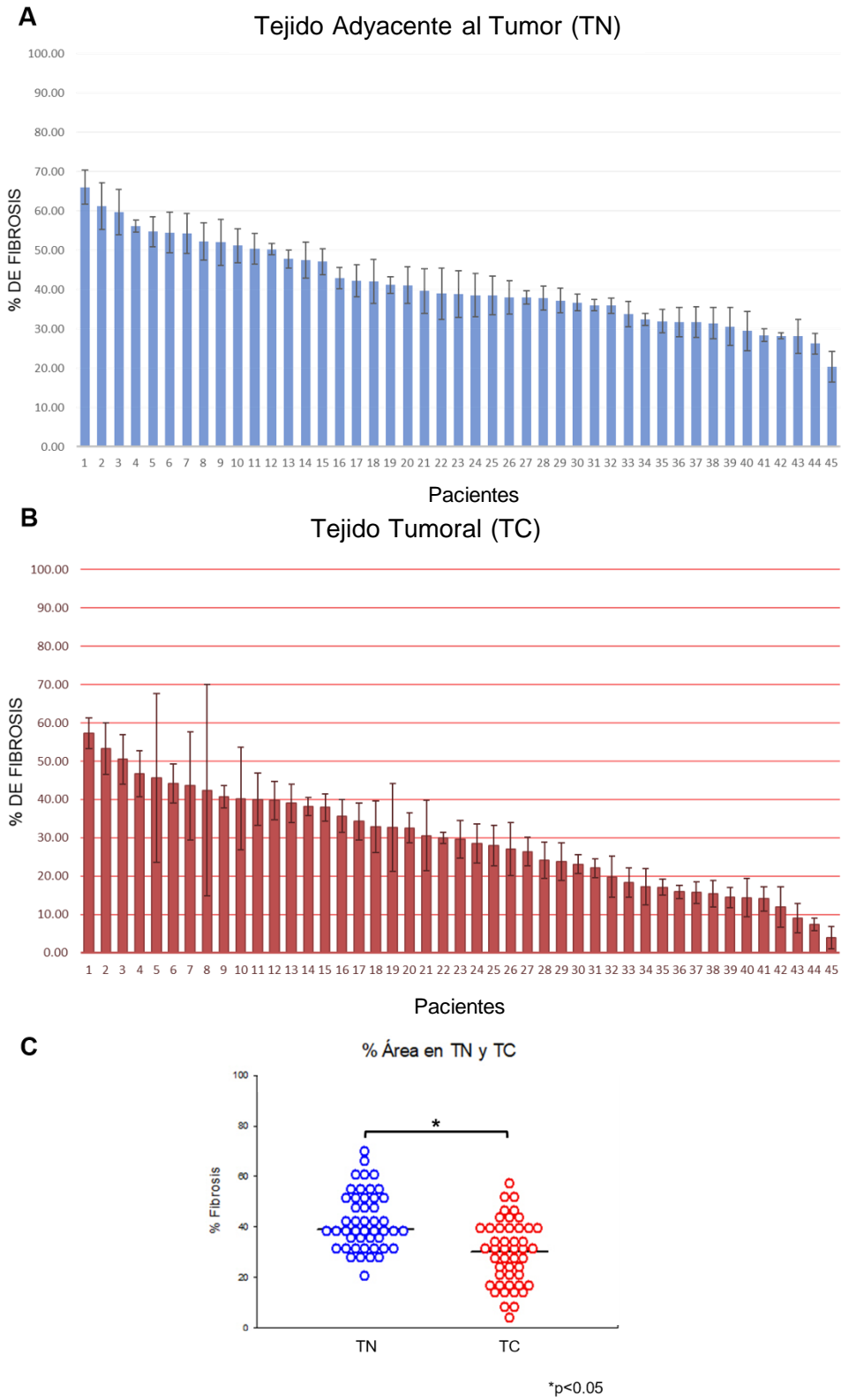


Figura 4. Porcentaje de fibrosis en TN y TC en pacientes con CCR. A y B) Valores de porcentaje de área obtenidos graficados de manera descendente. **C)** Dot plot de los valores obtenidos donde se observa una diferencia significativa con una $p < 0.001$.

Análisis del grado de fibrosis en la cohorte retrospectiva

Con los resultados del porcentaje de fibrosis de cada tejido, se realizó un análisis entre los grupos de pacientes que presentaban una ERC antes de la nefrectomía y los pacientes que mantenían una TFGe mayor a 90mL/min. Las imágenes representativas de cada grupo de pacientes se muestran en la **Figura 5A**. Se encontró que aproximadamente el 57% de los pacientes evaluados presentaban una ERC previa a la nefrectomía reflejada en una disminución en la TFGe menor a 90 mL/min. Además, hubo una diferencia significativa en el porcentaje de fibrosis en ambos grupos como se muestra en la **Figura 5B**. Este mismo análisis se realizó en TC sin mostrar diferencia significativa en el grado de fibrosis y su relación con la ERC, como se presenta en la **Figura 5C**.

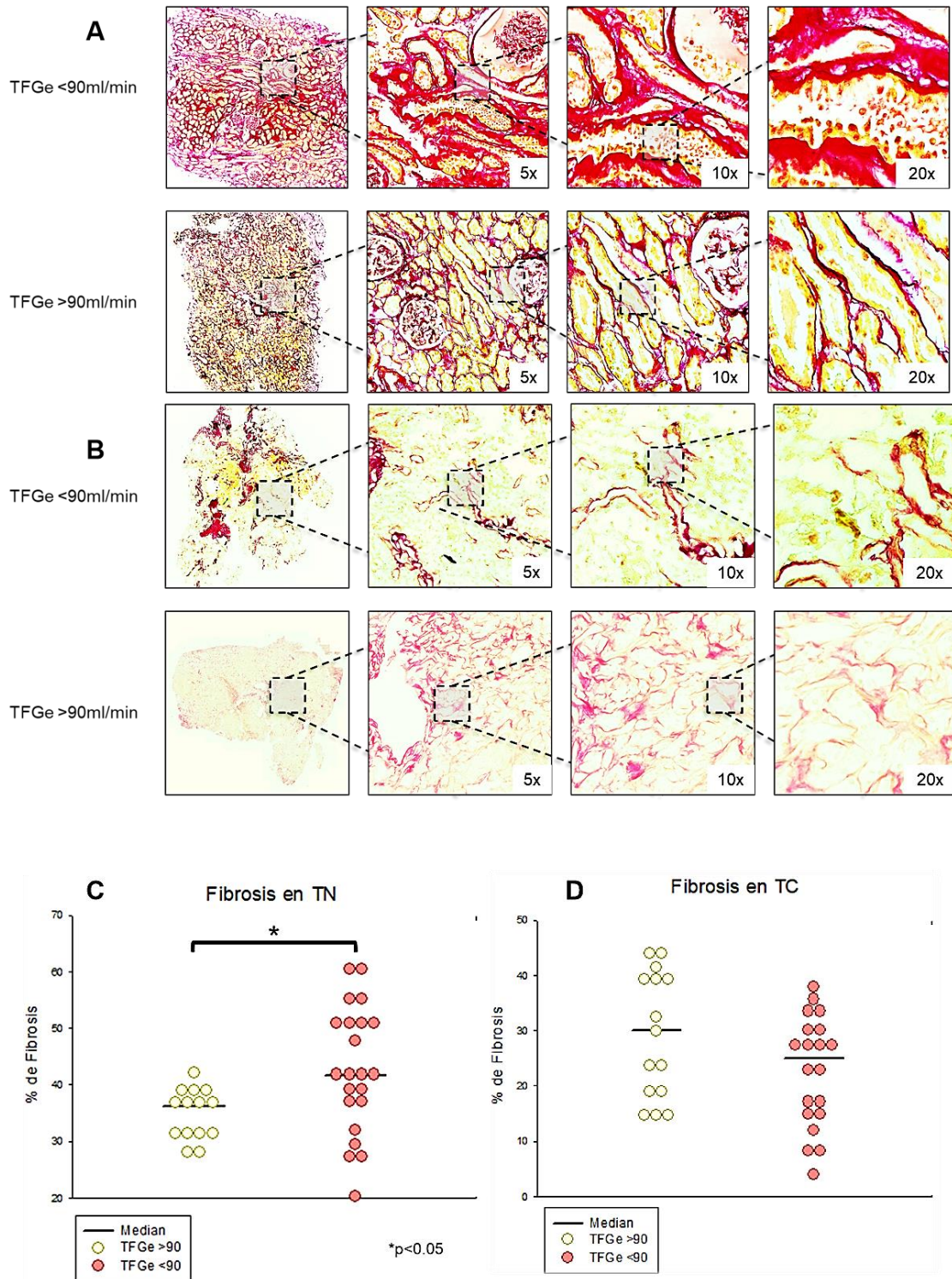


Figura 5. Análisis del grado de fibrosis en TN y TC de la cohorte retrospectiva. A) Se muestran las imágenes representativas de la tinción con rojo de Sirius en TN de acuerdo con la aparición de ERC (TFGe <90mL/min) en el panel superior y la ausencia de ERC (TFGe >90mL/min) en el panel inferior. **B)** Imágenes representativas de la tinción en TC. **C)** Gráfica dotplot de la comparación del grado de fibrosis en TN entre los dos grupos donde se observa una diferencia significativa con una $p < 0.05$. **D)** Gráfica dotplot de la comparación entre el grado de fibrosis en TC entre los dos grupos donde no se observan diferencias significativas. $n = 36$

A pesar de no encontrar relación entre la fibrosis y la aparición de ERC en el tejido tumoral, se investigó si el grado de fibrosis tenía alguna relación con la etapa y/o el desarrollo de la enfermedad en los pacientes con CCR. En la **Figura 6** se presentan las diferentes variables clínicas con las que se asoció a la fibrosis, sin embargo, solamente el tamaño tumoral y la progresión mostraron diferencia significativa de acuerdo con el grado de fibrosis de TC. En estos casos la disminución del porcentaje de fibrosis se asoció a un mayor tamaño tumoral, así como a una progresión de la enfermedad menor a 18 meses después de la nefrectomía. En la **Tabla 2** se presentan los valores de la media del grado de fibrosis para cada grupo, así como su desviación estándar y los valores de “p” para las pruebas estadísticas en cada variable clínica.

Variable clínica		\bar{x}	σ	Valor de p
Metástasis (TNM)	M0	29.64	12.07	0.807
	M1	28.66	14.60	
Grado Fuhrman	2	31.92	11.59	0.592
	3	28.76	15.31	
	4	26.40	10.11	
Tamaño tumoral (TNM)	T1	37.23	6.43	*0.021
	T2	32.04	14.89	
	T3	23.85	12.30	
Progresión (<18 meses)	NP	32.17	13.09	*0.006
	P	20.12	8.25	
Sobrevida (>24 meses)	V	28.86	13.09	0.734
	D	30.48	13.72	

Tabla 2. Análisis de asociación entre las variables clínicas e histopatológicas y el grado de fibrosis. Se presentan los valores de media y desviación estándar del porcentaje de fibrosis en las muestras; así como los valores de p; con una significancia estadística de *p<0.05.

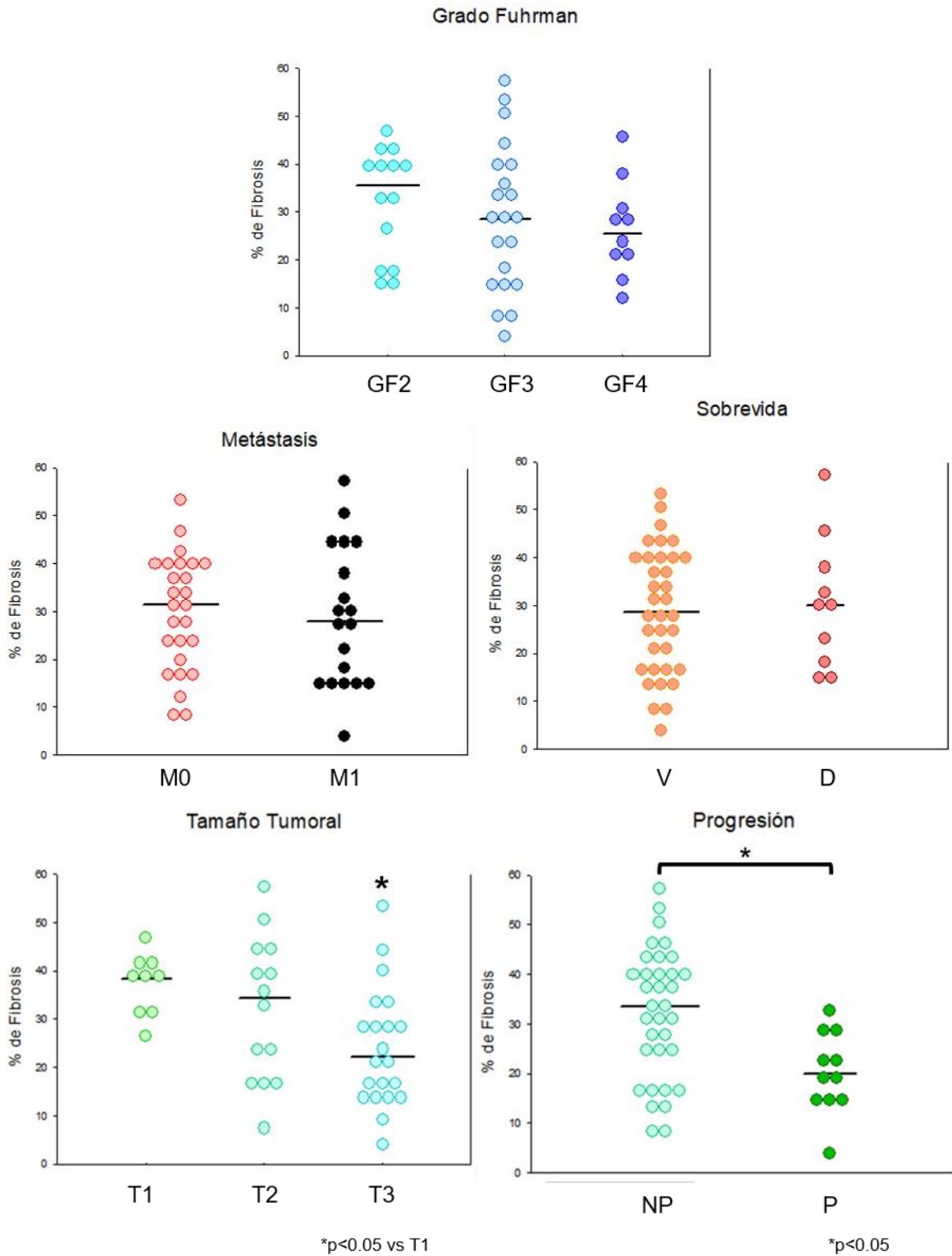


Figura 6. Análisis del porcentaje de fibrosis en TC con las variables clínicas asociadas al CCR. Dot plot de los valores obtenidos donde se observa una diferencia significativa con una $p < 0.05$.

Determinación de marcadores asociados a ERC en pacientes con CCR

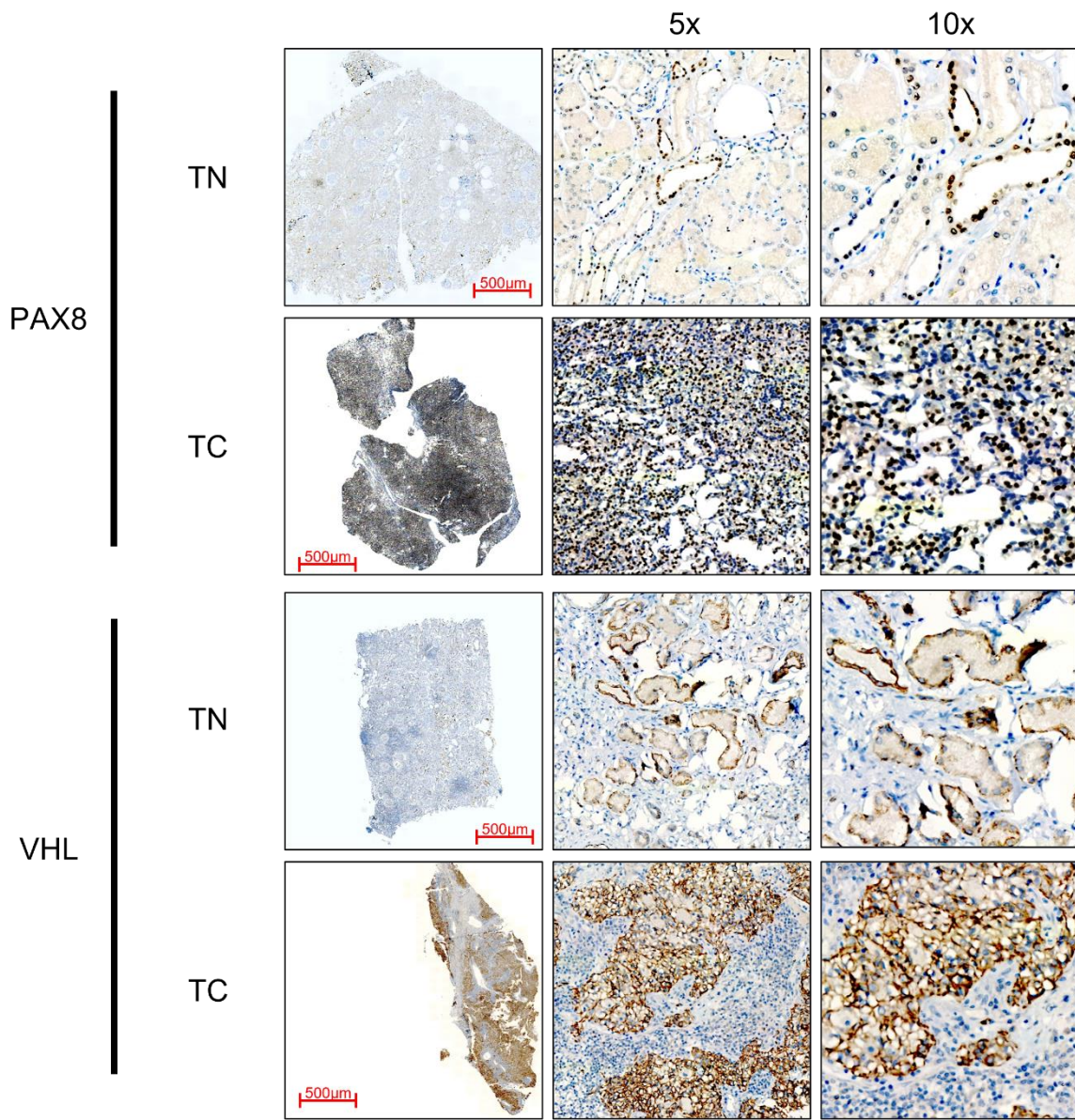
Proteínas asociadas al Cáncer Renal

Con los marcadores propuestos se estandarizaron las inmunohistoquímicas con diferentes concentraciones para cada anticuerpo presentadas en el **Apéndice 1**. Se utilizaron dos sistemas: el sistema automatizado *Ventana* de Roche y el sistema manual del kit *Immunoperoxidase Secondary Detection System* de *Merk Millipore*. En la **Figura 7** se muestran las imágenes representativas de las IHQ de cada anticuerpo contra las proteínas usadas como marcadores en CCR en los dos tipos de tejido TN y TC. Por otro lado, en la **Figura 8** se presentan las imágenes representativas de las IHQ de las proteínas propuestas como marcadores; las cuales están asociadas a la respuesta al estrés celular. Las imágenes fueron tomadas a 20x con un objetivo digital de 5x y 10x (100x y 200x, respectivamente).

En estas imágenes se observa una coloración café/amarillenta que representa las zonas donde el anticuerpo primario se unió a la proteína de interés, sugiriendo una expresión focalizada en diferentes regiones del tejido. En este sentido, observamos que la mayoría de los marcadores presenta principalmente expresión en los túbulos en TN. Así mismo, en TC observamos focos de expresión tanto en citoplasma (contorno de las células claras) como en núcleo, lo que nos indica la condición de heterogeneidad tumoral. Además de encontrar en algunas zonas linfocitos infiltrados, los cuales no presentan expresión de los marcadores como se observa en el caso de VHL en TC (**Figura 7**).

Los resultados de IHQ de la proteína PAX8 (**Figura 7**) mostraron una expresión nuclear en los túbulos de las nefronas. Incluso, parece aumentar su expresión en las células cancerosas. Adicionalmente, se evaluó la expresión de pVHL. Las imágenes en la **Figura 7** revelan una expresión citoplásmica tanto en los túbulos, como en las células cancerosas. Incluso, esta expresión discrimina entre las células tumorales y otros tipos celulares como infiltrados, lo que sugiere que esta proteína mantiene una relación estrecha con el riñón y el ccRCC.

Uno de los blancos de pVHL es HIF-1 α , esta proteína es un factor de transcripción que se ubica principalmente en el núcleo. Los resultados de la **Figura 7** mostraron una localización nuclear en las células cancerosas en mayor proporción al tejido adyacente al tumor. Sin embargo, esta expresión resultó ser muy baja. Adicionalmente se estudió a uno de los efectores de la vía de HIF-1 α , el factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGF. Esta proteína mostró una expresión focalizada y granular en el citoplasma de los túbulos y de las células cancerosas (**Figura 7**).



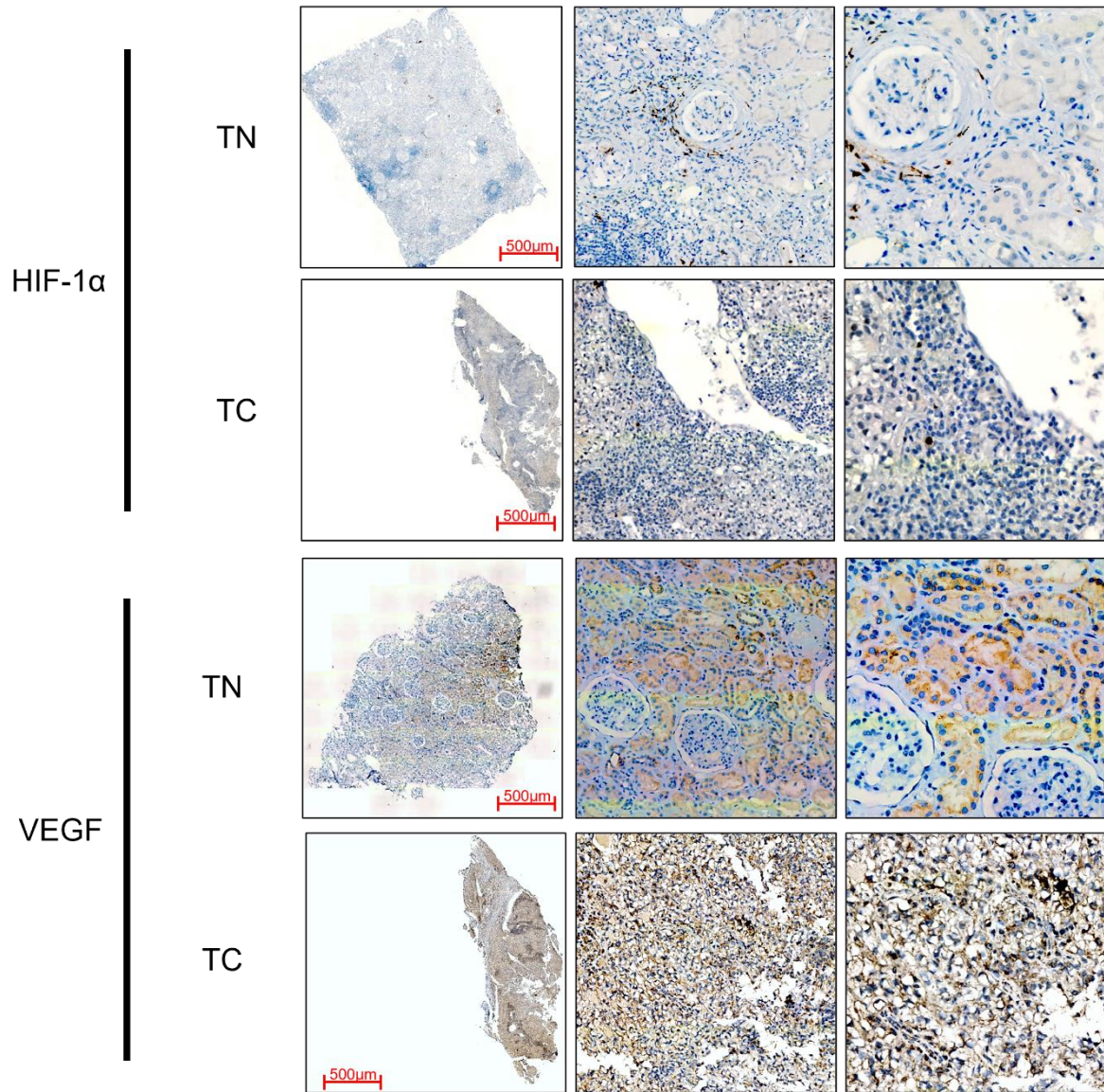


Figura 7. Inmunoexpresión de las moléculas establecidas como marcadores de CCR. Se muestran las imágenes representativas de la expresión por IHQ de las proteínas PAX8, VHL, HIF-1 α y VEGF en TN y TC de pacientes con cáncer renal.

Aunado a los marcadores ya establecidos de CCR, se evaluó la expresión de las proteínas de estrés HSF1, Hsp90 α y Hsp90 β ; las cuales se agruparon como marcadores propuestos de CCR. Las imágenes representativas de cada proteína se muestran en la **Figura 8**. El factor de transcripción HSF1, se encontró expresado en ambos tipos de tejido casi en la misma proporción. De manera interesante, HSF1 también se localizó en el núcleo de los glomerulos y no solo de los túbulos como se había observado con las moléculas evaluadas anteriormente.

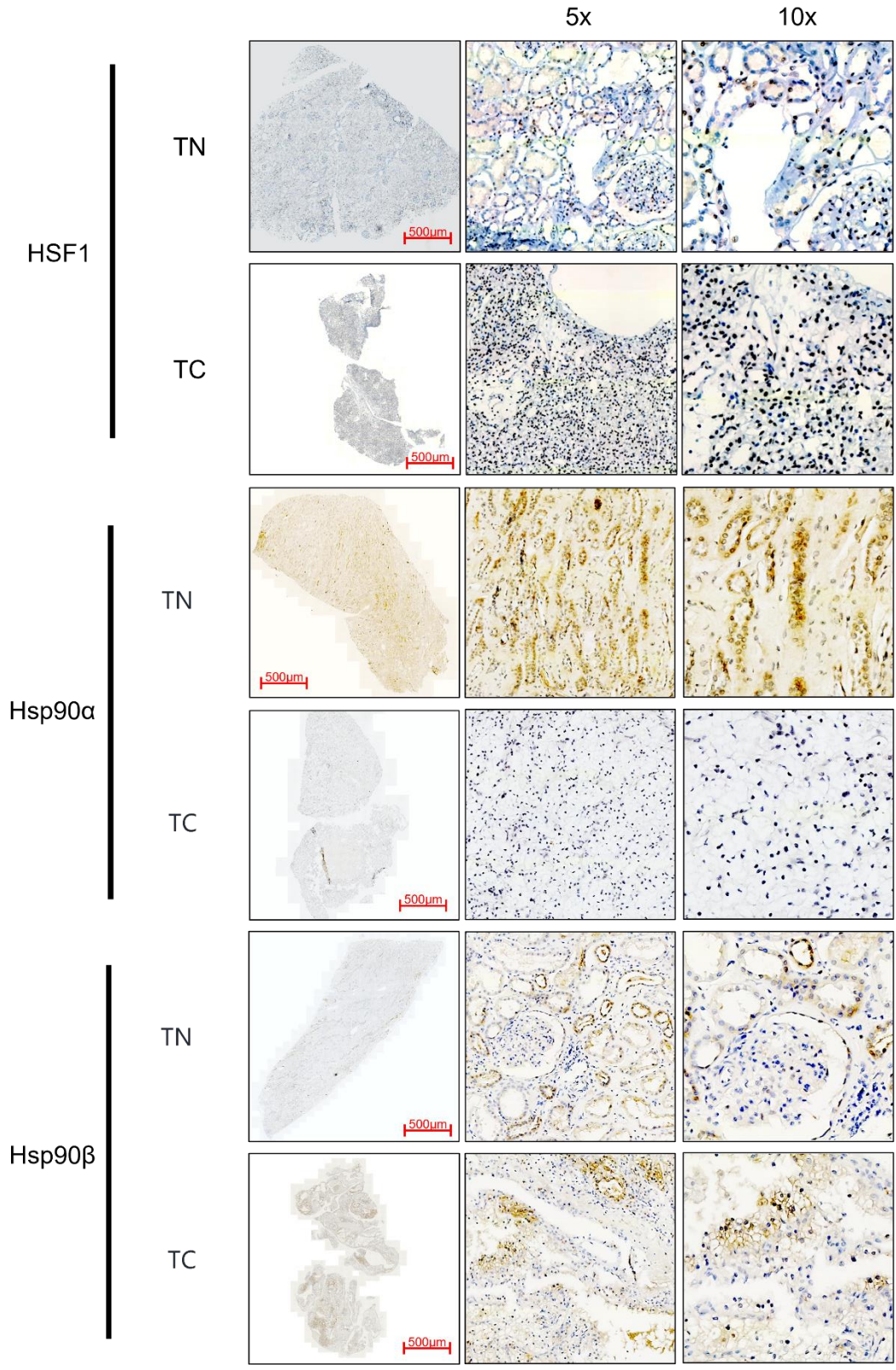


Figura 8. Inmunoexpresión de las moléculas propuestas como marcadores de CCR. Se muestran las imágenes representativas de la expresión por IHQ de las proteínas de estrés HSF1, Hsp90α y Hsp90β en TN y TC de pacientes con cáncer renal.

Las proteínas de choque térmico han mostrado diferentes implicaciones tanto biológicas como clínicas. En este estudio se encontró una expresión y localización diferencial de ambas isoformas estudiadas. La proteína Hsp90 α se encontró principalmente en citoplasma y núcleo de las células de los túbulos de la nefrona, sin embargo, en el tejido tumoral no se detectó esta proteína. Por otro lado, la proteína Hsp90 β mostró una localización principalmente en citoplasma en TN, mientras que, en TC, esta localización cambio a nuclear y citoplasma en proporciones similares.

De manera interesante, el eje del estrés celular se ha estudiado ampliamente en el desarrollo del cáncer, así como en la inflamación y respuesta celular al estrés tal como lo es la Enfermedad Renal Crónica; que como se mencionó previamente, existe una inflamación de los túbulos que desencadena en la aparición de la fibrosis tubulointersticial. Por lo que HSF1 y sus blancos Hsp pueden participar de manera importante en ambas enfermedades.

Proteínas asociadas a la ERC

La determinación de las proteínas asociadas a ERC, se presentan en la **Figura 9**. Para la proteína Hsp72 se realizaron IHQ para determinar su localización y niveles de expresión. Sin embargo, para las proteínas KIM-1 y TGF β , se determinó su expresión mediante WB, ya que su localización se da principalmente en el espacio extracelular y en el caso de TGF β la señal obtenida por IHQ resultó difusa en la ECM (Datos no mostrados).

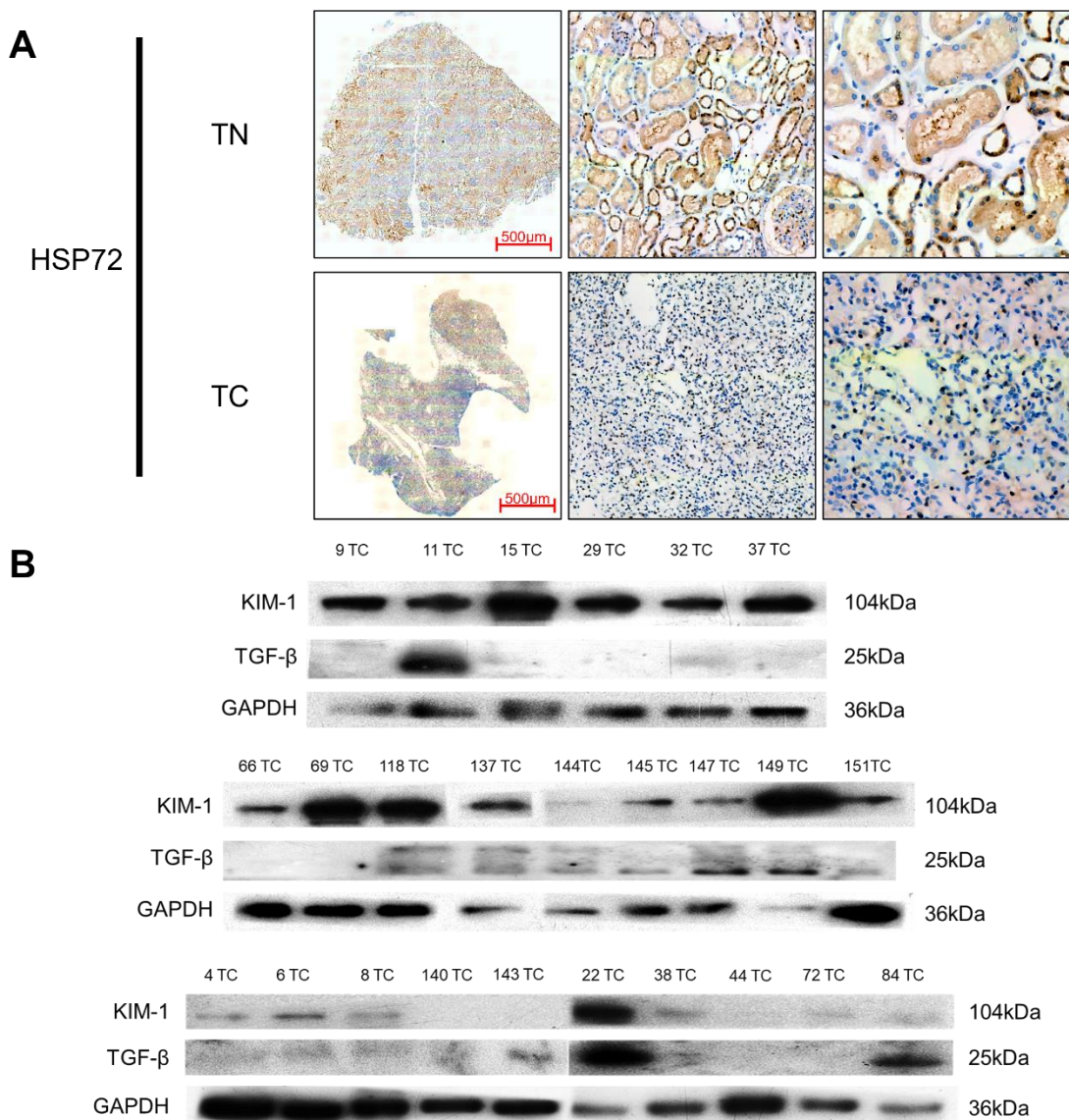


Figura 9. Inmunoexpresión de las moléculas propuestas como marcadores de ERC. Se muestran las imágenes representativas de la expresión por IHQ (**A**) de la proteína de estrés Hsp72 y por Western Blot (**B**) de las proteínas de secreción KIM-1 y TGF- β .

La proteína Hsp72 mantiene una estrecha relación con Hsp90, esto se ve reflejado en la localización y expresión en las células de los túbulos en la **Figura 9A** (panel superior) donde se observa una mayor expresión en citoplasma en algunas células de ciertos túbulos en comparación con otros. Incluso se observa que en el glomérulo la proteína Hsp72 se localiza en el núcleo. Esto también se observa cuando analizamos el tejido tumoral (TC).

Por otro lado, se analizó la proteína KIM-1 mediante Western Blot, de los tejidos tumorales (TC) de los pacientes con CCR. KIM-1 ha sido reportada en biopsias líquidas tales como orina y plasma; por lo que es de interés estudiarla en estos pacientes oncológicos. En la **Figura 9B**, observamos que esta proteína mantiene una expresión variable en todos los casos, incluyendo algunos en los cuales no se detecta la proteína.

Adicionalmente, se evaluó la expresión de la proteína TGF- β , la cual mostró una expresión variable en estos tejidos tumorales. Esta proteína es importante para la síntesis de proteínas de ECM, la formación de fibrosis y, por lo tanto, la aparición de ERC, en estos pacientes oncológicos. TGF- β presenta dos isoformas principales TGF- β 1 y TGF- β 2, las cuales participan en estos procesos. En la **Figura 9B**, podemos observar en algunas muestras dos bandas que sugieren la detección de ambas isoformas. En cuanto a los niveles de expresión, la mayoría de las muestras no presenta niveles detectables de esta proteína.

Al término de la estandarización de las inmunohistoquímicas de las proteínas anteriormente mencionadas, se evaluó la asociación entre los niveles de inmunotinción (expresado como % de área de inmunoexpresión) y las variables clínicas obtenidas de la base de datos de la cohorte.

Análisis de asociación entre la proteína PAX8 y las variables clínicas de CCR

Con los valores del % de inmunoexpresión obtenidos se realizaron gráficas de barras y de *dot plot* para comparar las diferentes variables clínicas con los niveles de expresión de las proteínas analizadas. En la **Figura 10** se presentan las gráficas de barras de los % de inmunoexpresión de PAX8. En el panel superior del lado izquierdo, se presentan los resultados de ambos tipos de tejidos de manera creciente en TN (barras azules). Del lado izquierdo se presenta la relación de TC/TN, donde se observa que la mayoría de los pacientes presentan una expresión mayor en TC.

En el panel inferior se muestran las imágenes de IHQ de los casos representativos de la cohorte. En estas imágenes también se observa una mayor expresión en el tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente al tumor.

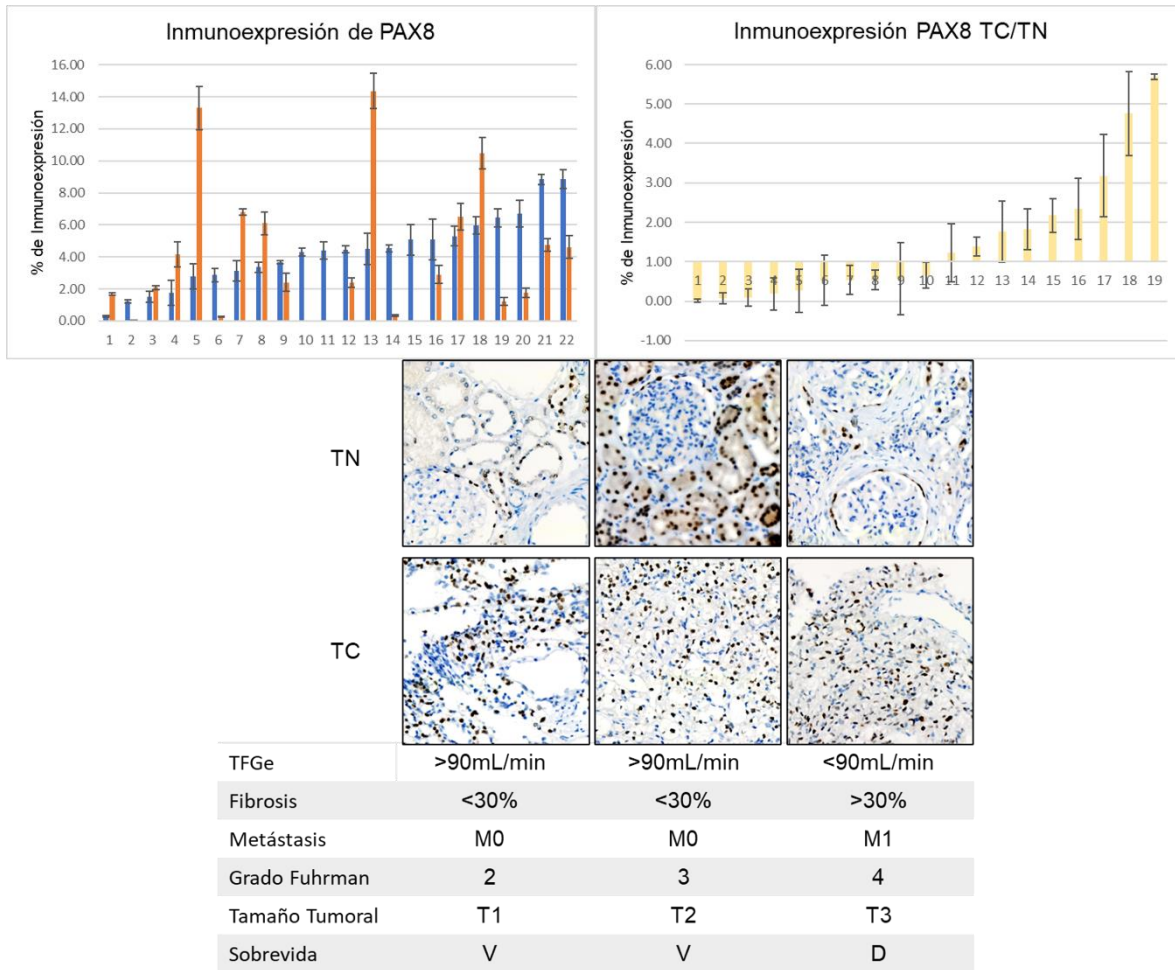


Figura 10. Análisis del % de inmunoexpresión de PAX8 en las muestras de tejido de pacientes con CCR. A) Se muestra una gráfica de barras con el % de inmunotinción en TN (azul) y TC (rojo) en orden creciente respecto a TC. **B)** Imágenes representativas de la inmunodetección de PAX8. En la parte superior se observan diferencias en la inmunotinción. En la parte inferior se agrupan las diferentes variables clínicas más representativas de cada tipo de tejido.

Adicionalmente, se realizó un análisis comparativo entre los niveles de inmunoexpresión de PAX8 y las diferentes variables clínicas de interés. En la **Figura 11** se presentan las gráficas de *dot plot* de estos análisis. A pesar de no encontrar diferencias significativas en la inmunoexpresión de PAX8 en ambos tejidos, se observó una mayor expresión cuando se comparó T3 vs T1 en la variable de Tamaño Tumoral, esta misma tendencia se observó en el Grado Fuhrman. Incluso, se encontró una mayor expresión en los pacientes que presentaban metástasis al momento del diagnóstico, sugiriendo que PAX8 podría estar asociada la progresión del cáncer.

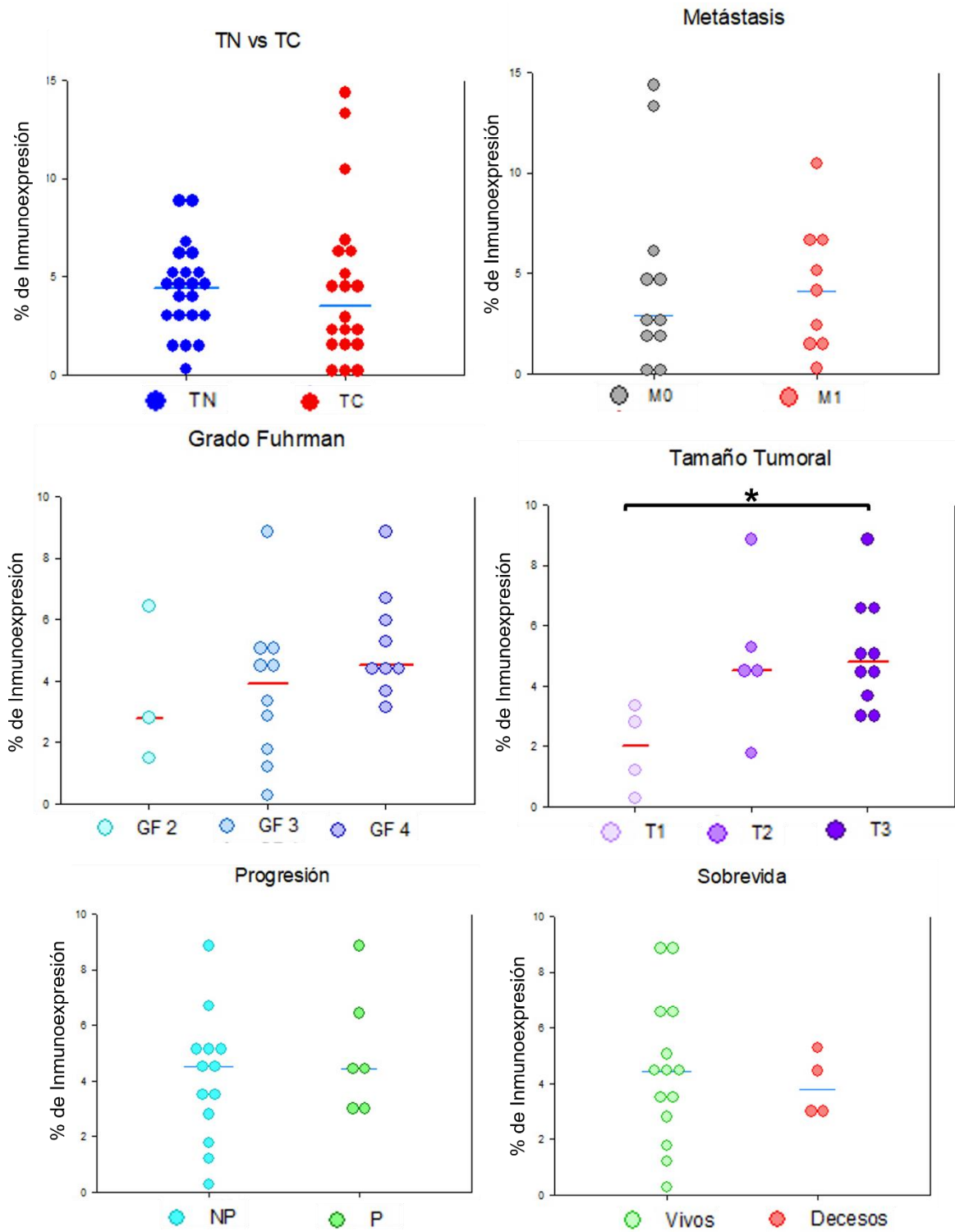
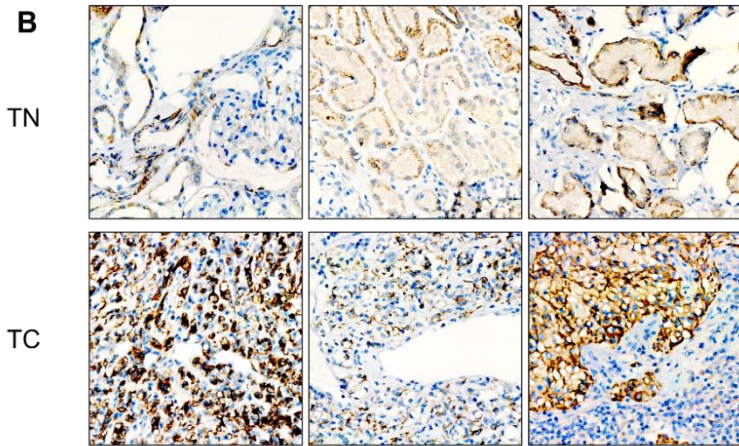
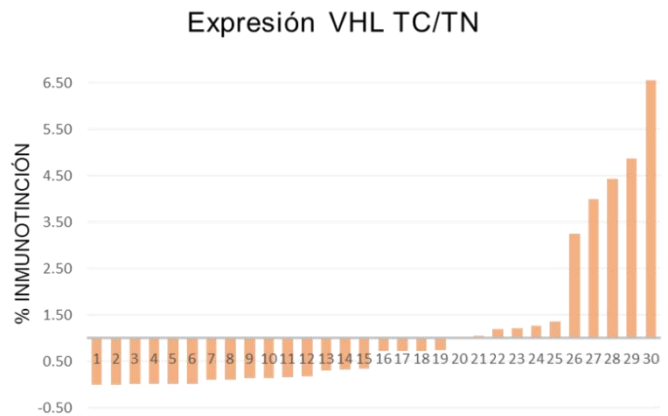
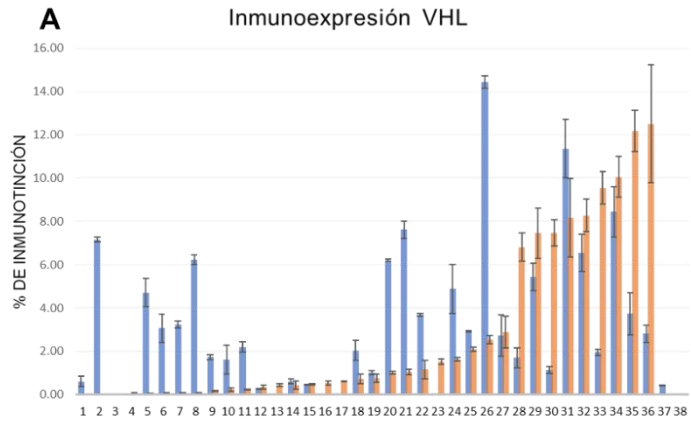


Figura 11. Análisis de la expresión de la proteína PAX8 con las variables clínicas. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre las diferentes variables clínicas asociadas a CCR y la inmunoexpresión de PAX8. * $p < 0.05$

Análisis de asociación entre la proteína VHL y las variables clínicas de CCR

Para el análisis de VHL se llevó a cabo el procedimiento anterior. En la **Figura 12** se presenta la gráfica de barras de la inmunodetección de la proteína VHL en las muestras de cáncer renal en los dos tipos de tejidos. En la **Figura 12A**, en la gráfica superior, se observa una mayor expresión de VHL en TN (barras azules) en comparación con TC (barras rojas). Un resultado similar lo podemos observar en la imagen inferior, donde se graficó el ratio de expresión de TC/TN. Estos resultados sugieren que la mayoría de los pacientes sufre una pérdida del gen VHL como ya se ha reportado anteriormente en los casos de ccRCC.

Adicionalmente, en la **Figura 12B** se observan cambios en la expresión de VHL entre los dos tipos de tejidos. Incluso se puede observar que VHL también es útil para detectar las zonas correspondientes al tumor (microfotografía inferior derecha). Estos resultados sugieren que VHL se encuentra asociada principalmente al desarrollo del tumor, ya que como se ha reportado anteriormente la pérdida del gen se ha asociado al ccRCC.



TFGe	>90mL/min	>90mL/min	<90mL/min
Fibrosis	<30%	<30%	>30%
Metástasis	M0	M0	M1
Grado Fuhrman	2	3	4
Tamaño Tumoral	T1	T2	T3
Sobrevida	V	V	D

Figura 12. Análisis del % de inmunoexpresión de VHL en las muestras de tejido de pacientes con CCR. A) Se muestra una gráfica de barras con el % de inmunotinción en TN (azul) y TC (rojo) en orden creciente respecto a TC. **B)** Imágenes representativas de la inmunodetección de VHL. En la parte superior se observan diferencias en la inmunotinción. En la parte inferior se agrupan las diferentes variables clínicas más representativas de cada tipo de tejido.

Con los resultados obtenidos del porcentaje de inmunotinción, se realizaron análisis comparativos con las variables clínicas anteriormente reportadas. En la **Figura 13** se presentan gráficas de *dot plot* del análisis comparativo de la inmunodetección de VHL. En este análisis se presenta una diferencia estadística significativa cuando se compara la expresión de VHL entre TN y TC, observando una disminución de la inmunodetección en TC. Estos resultados se respaldan con lo reportado anteriormente, donde la mayoría de los pacientes con ccRCC presentan una delección del gen de VHL. Incluso esta tendencia a disminuir se presenta en las variables asociadas a etapas avanzadas del cáncer (Grado Fuhrman, Tamaño Tumoral y Metástasis).

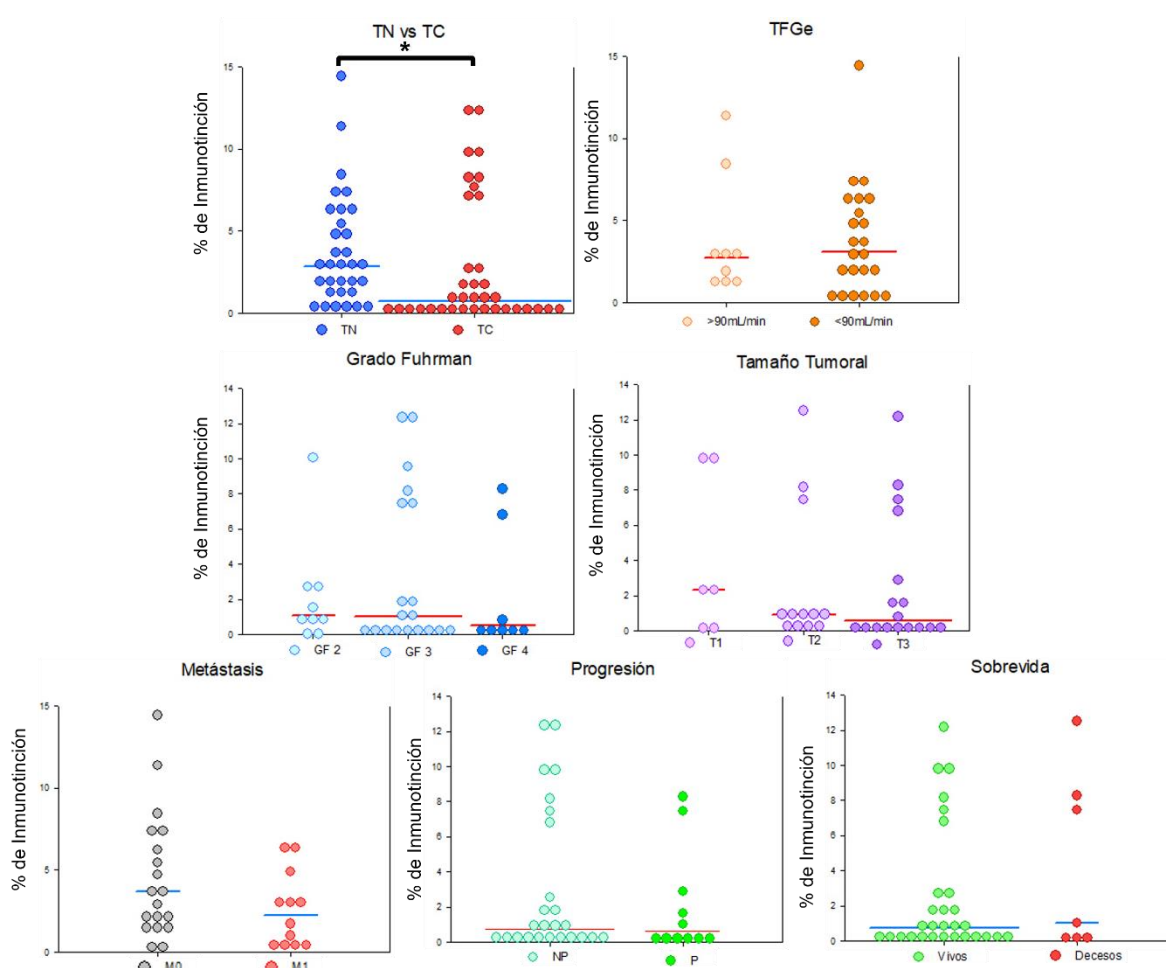


Figura 13. Análisis de la expresión de la proteína VHL con las variables clínicas. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre las diferentes variables clínicas asociadas a CCR y ERC y la inmunoexpresión de VHL. * $p < 0.05$

Finalmente, se realizó el análisis de la inmunodetección en los grupos de fibrosis de ambos tipos de tejidos. En la **Figura 14** se presentan las gráficas de dotplot del análisis correspondiente. En este análisis no se encontraron diferencias entre los grupos. Esto sugiere que VHL no participa en la formación de matriz extracelular.

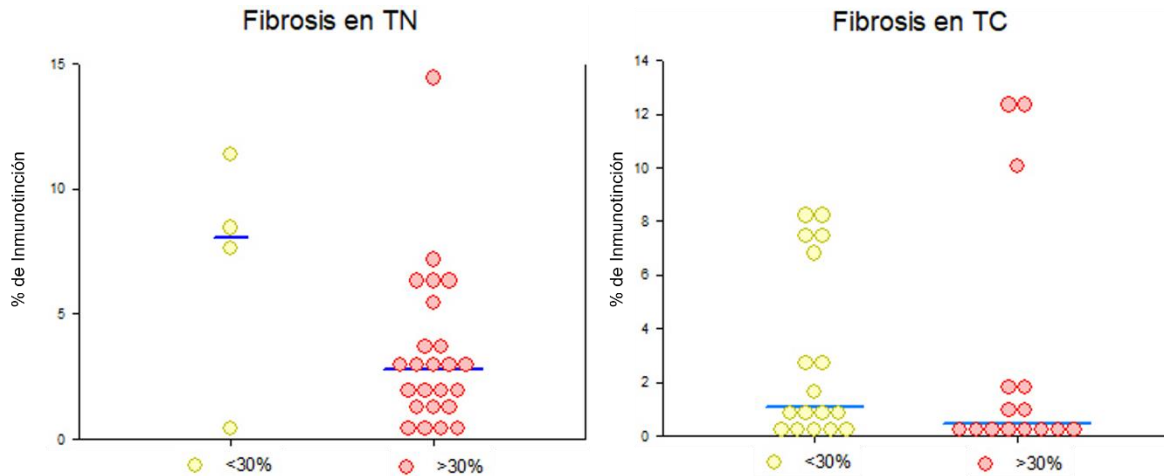
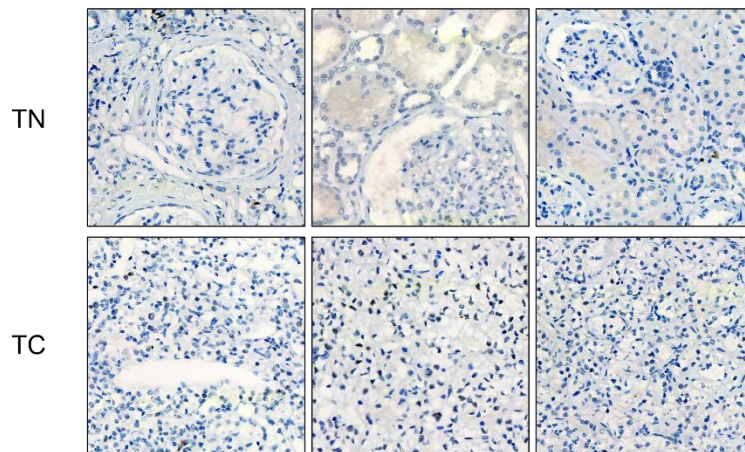
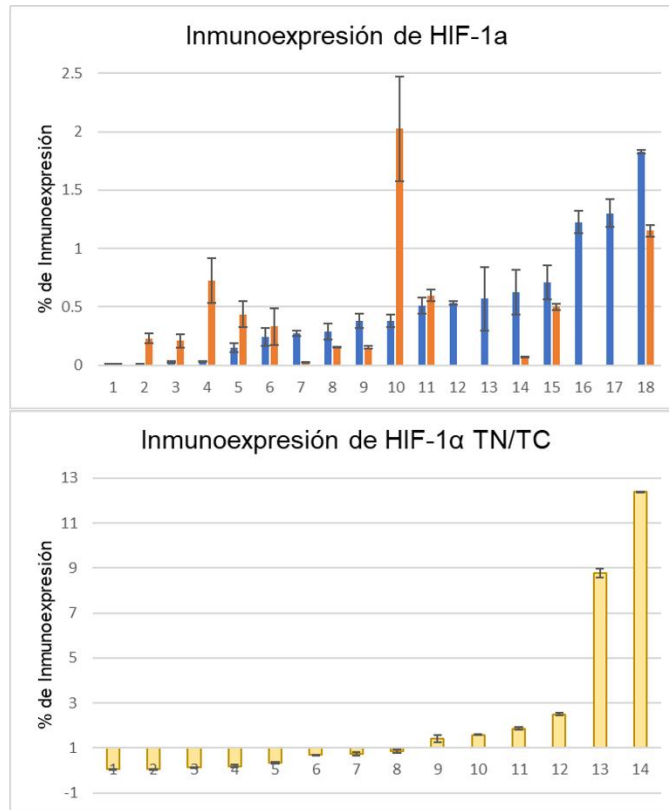


Figura 14. Análisis de la expresión de VHL vs el grado de fibrosis en ambos tipos de tejidos. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre los diferentes grados de fibrosis y la inmunoexpresión de VHL.

Análisis de asociación entre la proteína HIF-1 α y las variables de CCR

El análisis de los porcentajes de expresión de HIF-1 α se presenta en la Figura 15, donde en la gráfica superior se agrupan los resultados obtenidos de en orden ascendente del % de inmunoexpresión en TN (barras azules). Adicionalmente, se presenta una gráfica del radio de expresión de TN/TC, donde observamos que la aproximadamente la mitad de las muestras presenta una expresión aumentada en TN. En el panel inferior observamos que las imágenes de los casos más representativos no muestran diferencias aparentes en la expresión y localización de HIF-1 α , lo que sugiere que esta proteína puede no estar implicada en el desarrollo y progresión de CCR.



TFGe	>90mL/min	>90mL/min	<90mL/min
Fibrosis	<30%	<30%	>30%
Metástasis	M0	M0	M1
Grado Fuhrman	2	3	4
Tamaño Tumoral	T1	T2	T3
Sobrevida	V	V	D

Figura 15. Análisis del % de inmunoexpresión de HIF-1α en las muestras de tejido de pacientes con CCR. A) Se muestra una gráfica de barras con el % de inmunotinción en TN (azul) y TC (rojo) en orden creciente respecto a TN. **B)** Imágenes representativas de la inmunodetección de HIF-1α. En la parte superior se observan diferencias en la inmunotinción. En la parte inferior se agrupan las diferentes variables clínicas más representativas de cada tipo de tejido.

Posteriormente, se realizó el análisis de asociación del porcentaje de inmunoexpresión con las variables clínicas de interés mostrado en la **Figura 16**. En este caso, como se había mencionado anteriormente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, incluso entre los dos tipos de tejidos (TN TC). Sin embargo, estos resultados pueden deberse al tamaño de la muestra, ya que para este análisis se tuvo una “n” de 18 muestras.

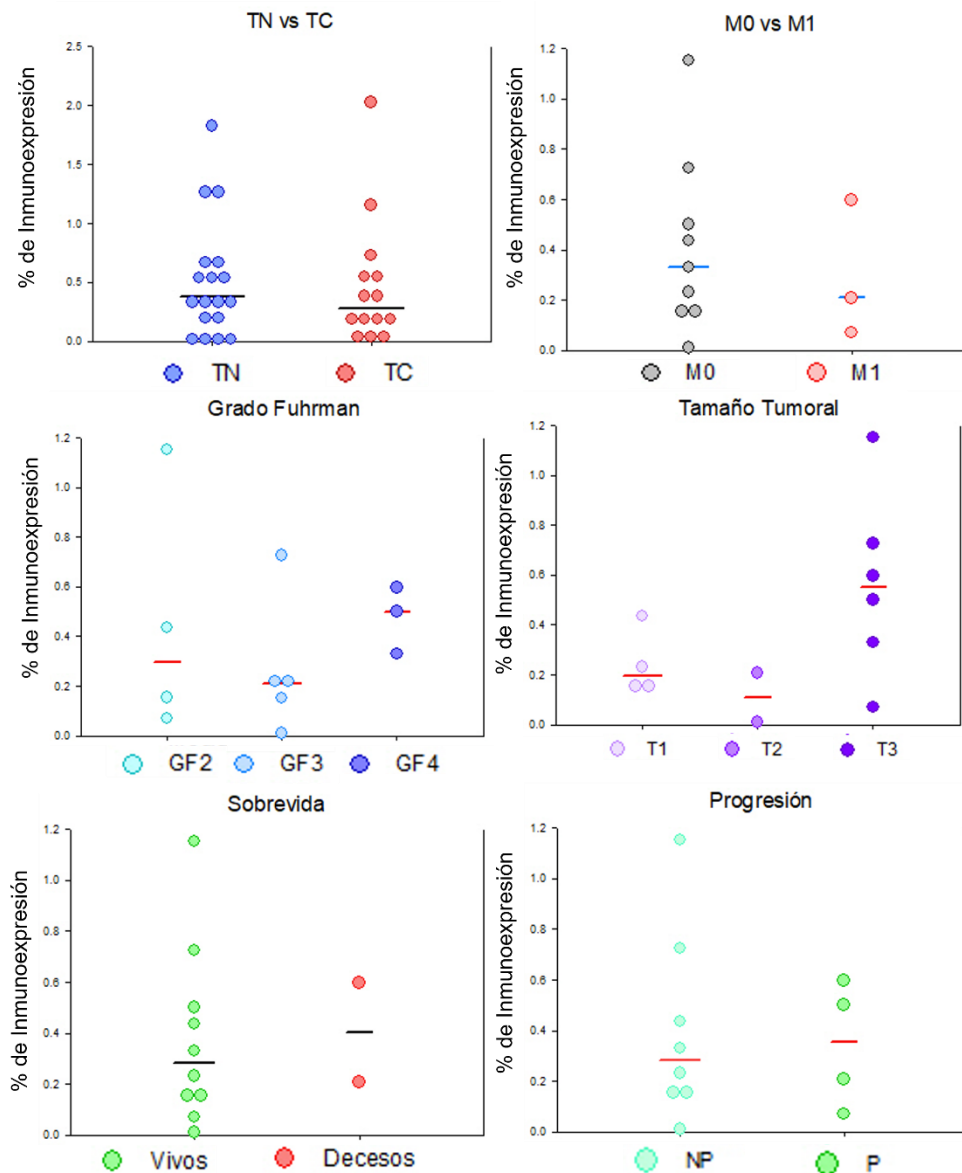


Figura 16. Análisis del % de inmunoexpresión de HIF-1 α con las variables clínicas asociadas a ERC. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre las diferentes variables clínicas asociadas a CCR y la inmunoexpresión de HIF-1 α . *p<0.05

Análisis de asociación entre la proteína VEGF y las variables de CCR

Este análisis mostró una menor expresión de la proteína VEGF en el tejido tumoral, contrario a lo que podría esperarse. Por otro lado, en el tejido adyacente al tumor, se encontró en el citoplasma de los túbulos y en cúmulos pequeños. En la **Figura 17** se presentan las gráficas de los resultados obtenidos en orden creciente en TN. También se presentan las IHQ de los casos representativos y sus variables clínicas más importantes relacionadas al CCR.

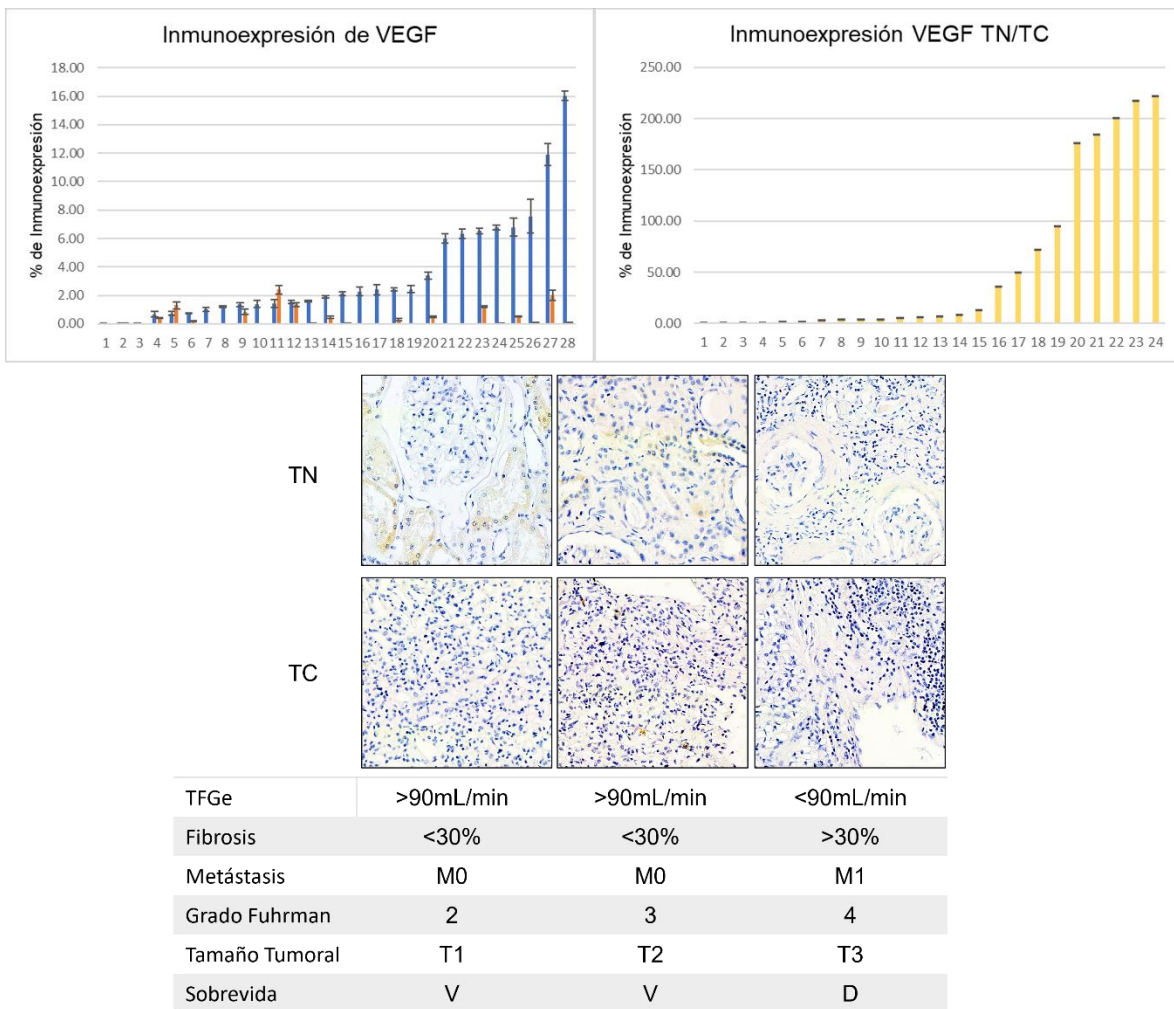


Figura 17. Análisis del % de inmunoexpresión de VEGF en las muestras de tejido de pacientes con CCR. A) Se muestra una gráfica de barras con el % de inmunotinción en TN y TC en orden creciente respecto a TC. **B)** Imágenes representativas de la inmunodetección de VEGF. En la parte superior se observan diferencias en la inmunotinción. En la parte inferior se agrupan las diferentes variables clínicas más importantes de los casos.

En cuanto al análisis contra las variables clínicas de interés, mostrado en la **Figura 18**, la expresión disminuida de VEGF mostró una diferencia significativa en TC en comparación con TN. Sin embargo, no se encontraron más diferencias significativas en las demás variables asociadas al CCR. De manera interesante, se observó una tendencia a disminuir la expresión de VEGF en las gráficas de *dot plot* de Grado Furhman y el Tamaño Tumoral.

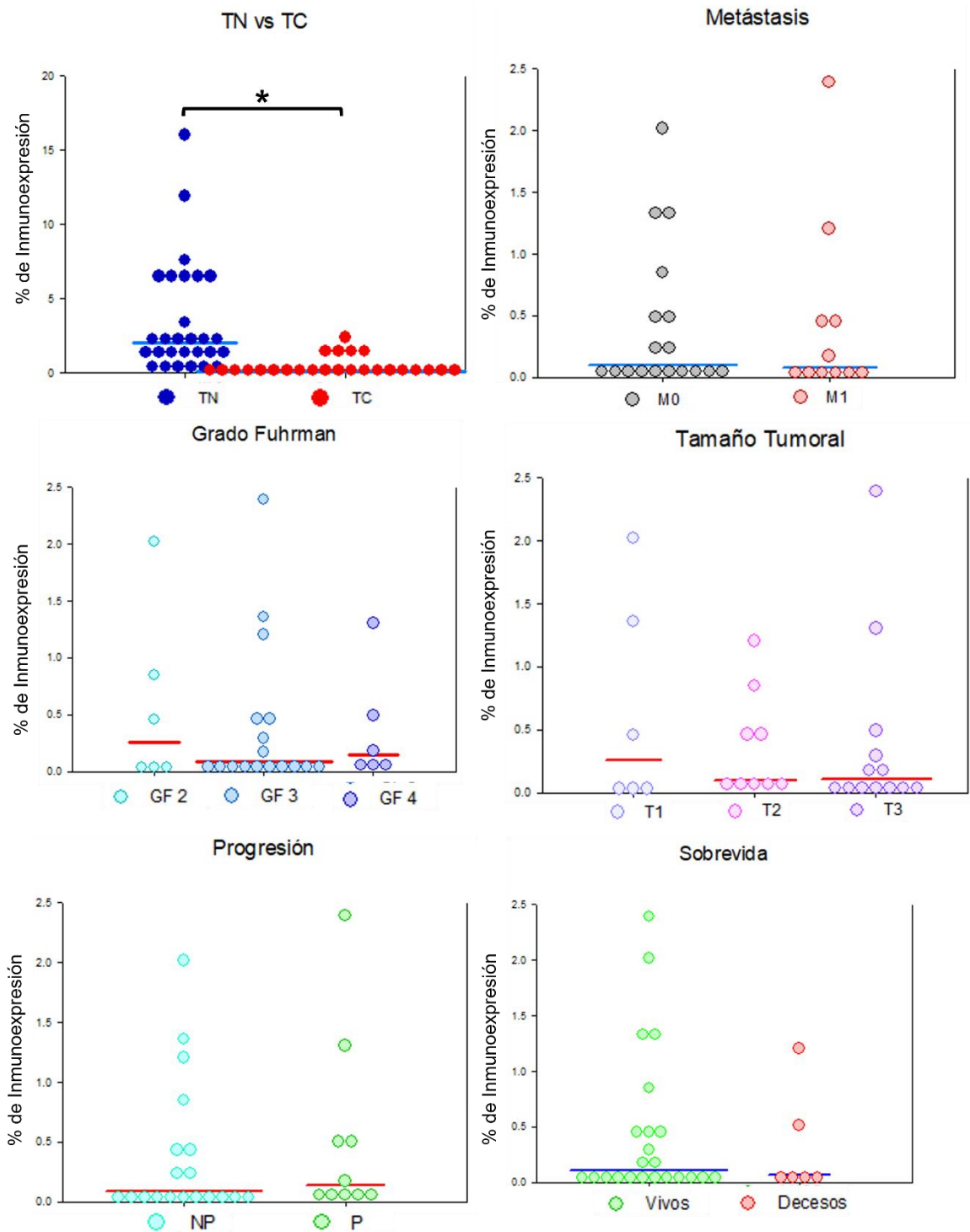
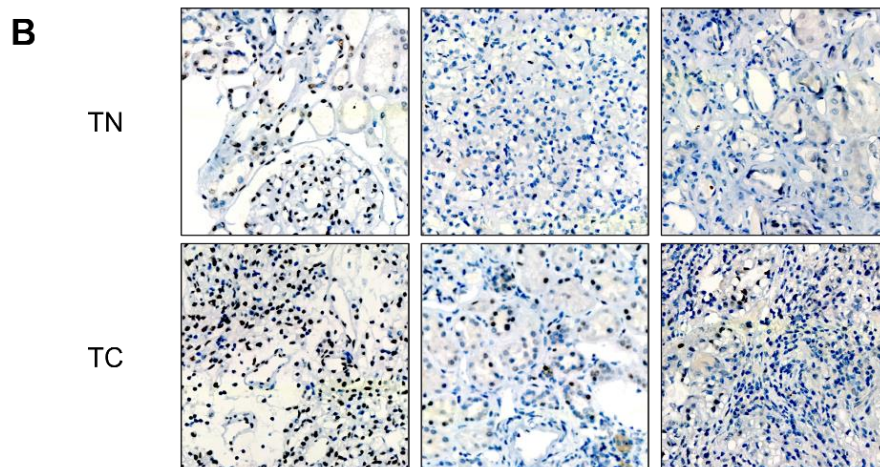
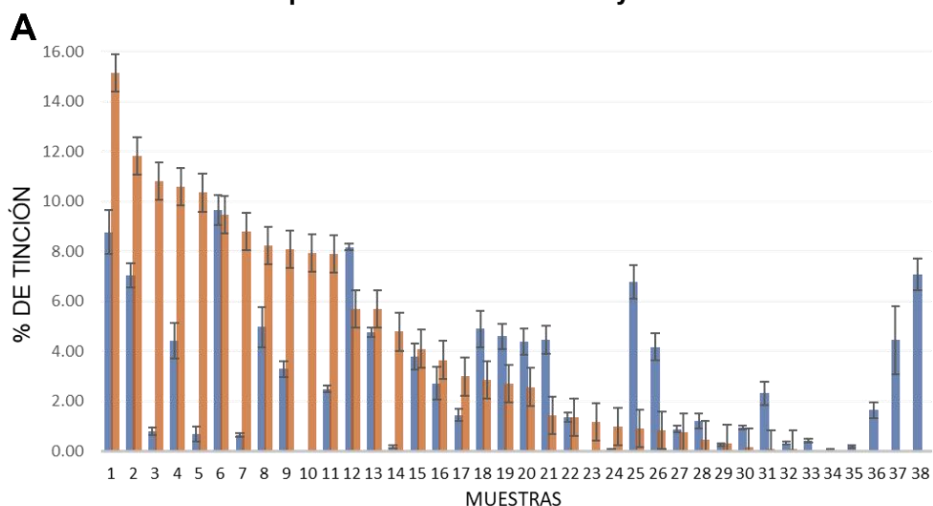


Figura 18. Análisis de la expresión de la proteína VEGF con las variables clínicas. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre las diferentes variables clínicas asociadas a CCR y ERC y la inmunoección de VEGF. *p<0.05

Análisis de asociación entre la proteína HSF1 y las variables del CCR

Al ser el cáncer una condición de estrés se planteó evaluar la inmunoexpresión. En la **Figura 19** se presenta una gráfica del análisis del % de inmunoexpresión con un nivel decreciente de izquierda a derecha. Además, se muestran imágenes representativas de casos con diferentes variables clínicas asociadas al CCR y a ERC y distintos niveles de inmunoexpresión entre ambos tipos de tejidos (TN y TC). En este sentido, no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de tejidos, sin embargo, mostraron niveles de expresión altos, sugiriendo que ambos se encuentran bajo una condición de estrés.

Expresión de HSF1 en TN y TC



TFGe	>90mL/min	>90mL/min	<90mL/min
Fibrosis	<30%	<30%	>30%
Metástasis	M0	M0	M1
Grado Fuhrman	2	3	4
Tamaño Tumoral	T1	T2	T3
Sobrevida	V	V	D

Figura 19. Análisis del % de inmunexpresión de la proteína HSF1. A) Se muestra una gráfica de barras con el % de inmunexpresión en TN y TC en orden decreciente respecto a TC. **B)** Imágenes representativas de la expresión del factor de choque térmico (HSF1) en la parte superior donde se observan diferencias en la inmunotinción. En la parte inferior se agrupan las diferentes variables clínicas más importantes de los casos

Al obtener el porcentaje de inmunotinción de todos los casos, se realizó un análisis estadístico multivariado y entre grupos para determinar la asociación entre el porcentaje de inmunotinción y las variables clínicas asociadas al CCR y a la ERC.

En la **Figura 19** se presentan las gráficas de *dot plot* correspondientes al análisis estadístico con las variables clínicas. Los resultados obtenidos solamente mostraron una diferencia estadística significativa cuando se comparó el Grado Fuhrman 2 contra el Grado Fuhrman 4; mostrando un aumento de expresión en este último grupo. Este aumento de la expresión de HSF1 nos sugiere un aumento en la expresión de las proteínas de choque térmico, en particular de Hsp90, ya que HSF1 es el principal factor de transcripción de las proteínas de choque térmico.

Finalmente, se realizó un análisis comparativo entre la inmunexpresión de HSF1 en los dos grupos de fibrosis, donde un valor menor al 30% corresponde a una proporción fisiológica de ECM, mientras que un valor mayor lo consideramos como fibrosis. En la **Figura 20** se presentan las gráficas de *dot plot* correspondientes al análisis de fibrosis en TN y TC. En esta figura observamos que existe una diferencia significativa entre la expresión aumentada de HSF1 y el grado de fibrosis en el tejido, esto posiblemente al estrés que genera la aparición de fibrosis al remodelar y aumentar la producción de proteínas de la ECM y la disminución del aporte de nutrientes ya que puede generar un bloqueo en el suministro de nutrientes y por lo tanto la sobrevivencia de las células.

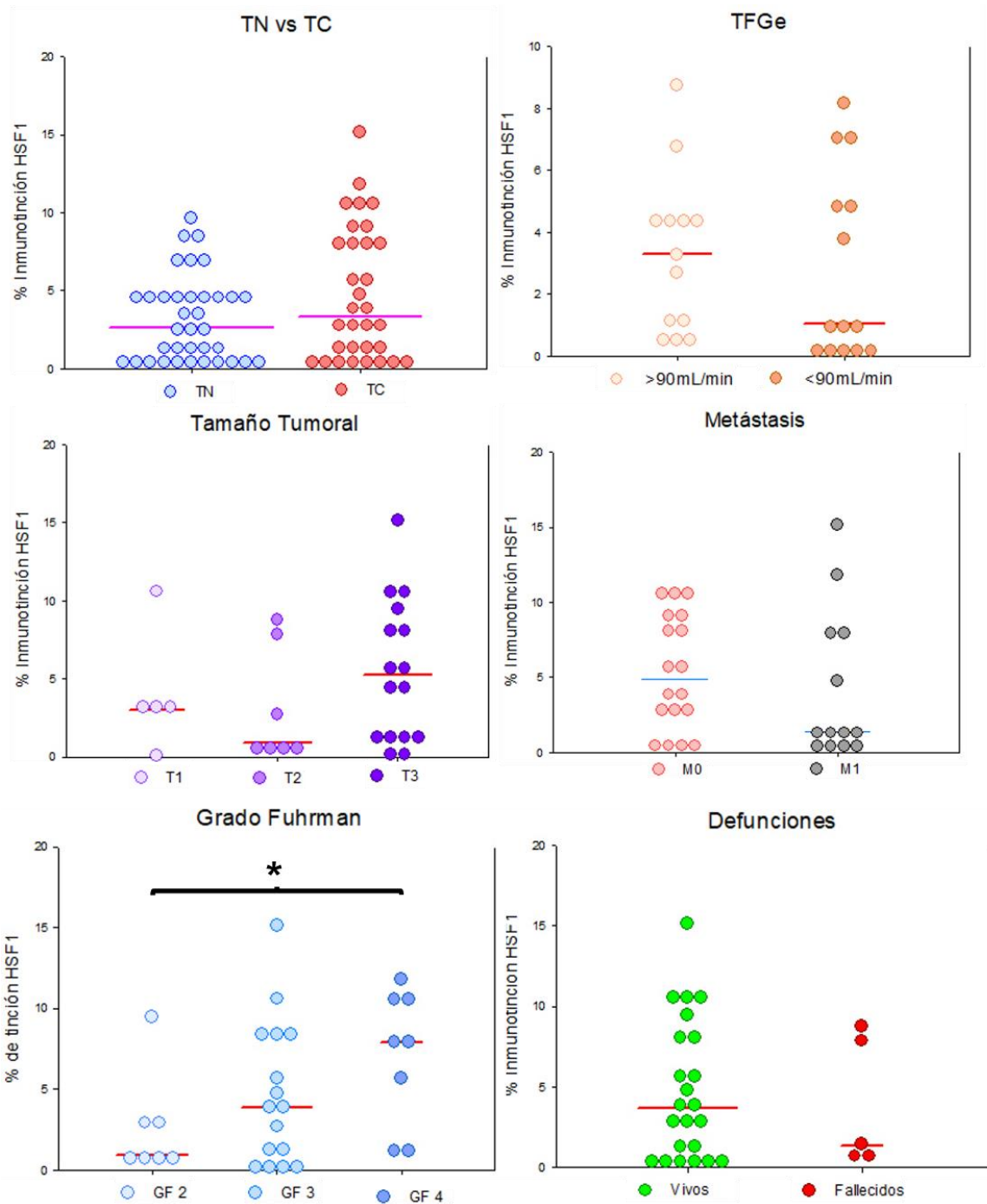


Figura 19. Análisis de la expresión de HSF1 vs las variables clínicas. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre las diferentes variables clínicas asociadas a CCR y ERC y la inmunoexpresión de HSF1. * $p < 0.05$.

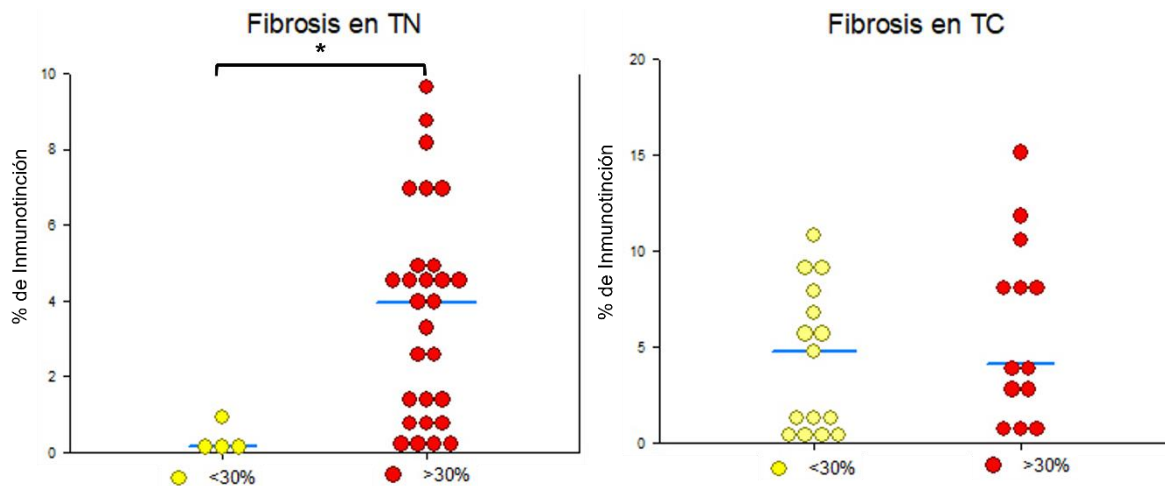


Figura 20. Análisis de la expresión de HSF1 vs el grado de fibrosis en ambos tipos de tejidos. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre los diferentes grados de fibrosis y la inmunopresión de HSF1. $p < 0.05$

Análisis de asociación entre la proteína Hsp90β y las variables del CCR

Uno de los blancos principales de HSF1 es la proteína Hsp90, la cual presenta dos isoformas mayoritarias: Hsp90α y Hsp90β. Al observar una expresión aumentada de este factor de transcripción se evaluaron ambas isoformas. Hsp90β es la isoforma constitutiva y se encuentra principalmente en el citoplasma. Sin embargo, se sabe que cada isoforma puede presentar diferentes localizaciones subcelulares según la función que ejerzan. En este estudio, se encontró que Hsp90β se localizaba tanto en citoplasma como en el núcleo en TN, mientras que, en TC, esta proteína cambiaba al núcleo. En este sentido la cuantificación del porcentaje de inmuntinción se realizó tomando en cuenta ambas localizaciones. La Figura 21, en el panel superior presenta las gráficas del porcentaje de inmunoexpresión obtenido; a la izquierda se graficó de manera ascendente en TC. En la gráfica derecha se grafica el valor obtenido cuando se comparó la expresión en TC contra TN. En esta gráfica observamos que la mayoría de las muestras presenta una mayor expresión en TC.

En la Figura 21B, se muestran los casos más representativos de la cohorte, donde observamos que esta proteína se expresa tanto en citoplasma como en el núcleo de las células. Sin embargo, al observar la imagen del caso de etapa avanzada y

peor pronóstico (panel extremo derecho) encontramos que la proteína Hsp90 β se encuentra disminuida en el citoplasma de las células tubulares (TN) así como en el núcleo.

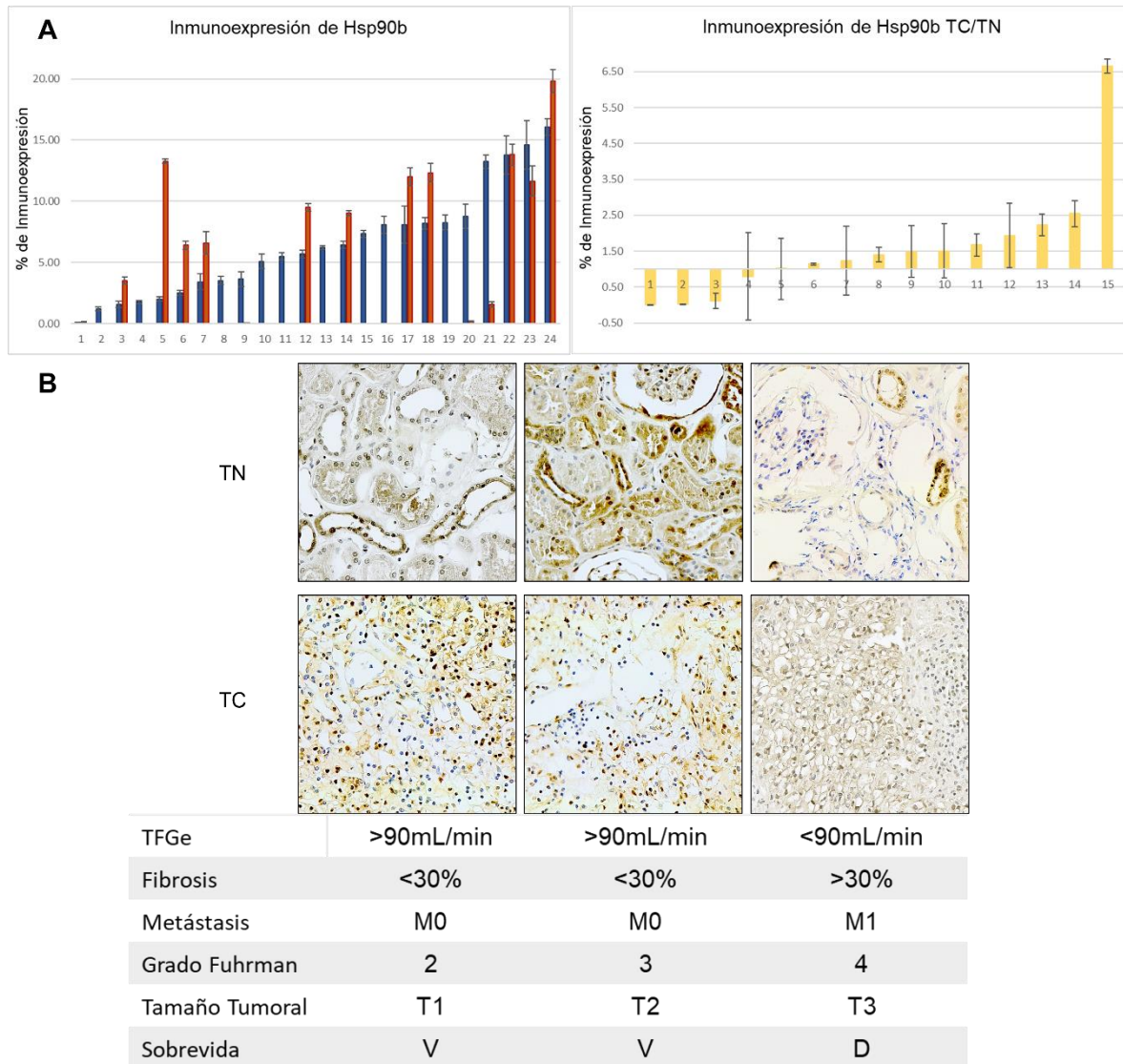


Figura 21. Análisis del % de inmunoexpresión de la proteína Hsp90 β . **A)** Se muestra una gráfica de barras con el % de inmunoexpresión en TN y TC en orden decreciente respecto a TC. **B)** Imágenes representativas de la expresión de la proteína de choque térmico beta (Hsp90 β) en la parte superior donde se observan diferencias en la inmunotinción. En la parte inferior se agrupan las diferentes variables clínicas más importantes de los casos.

Posteriormente, se realizó el análisis de asociación entre el porcentaje de inmunoexpresión y las variables clínicas asociadas al CCR. En la **Figura 22** se presentan las gráficas de *dot plot* donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos. Sin embargo, se observa una

tendencia a disminuir en las etapas avanzadas del CCR como la Metástasis, Grado Fuhrman 4, T3, Progresión y los Decesos en la cohorte. Para obtener resultados más concluyentes, es necesario aumentar el número de muestra.

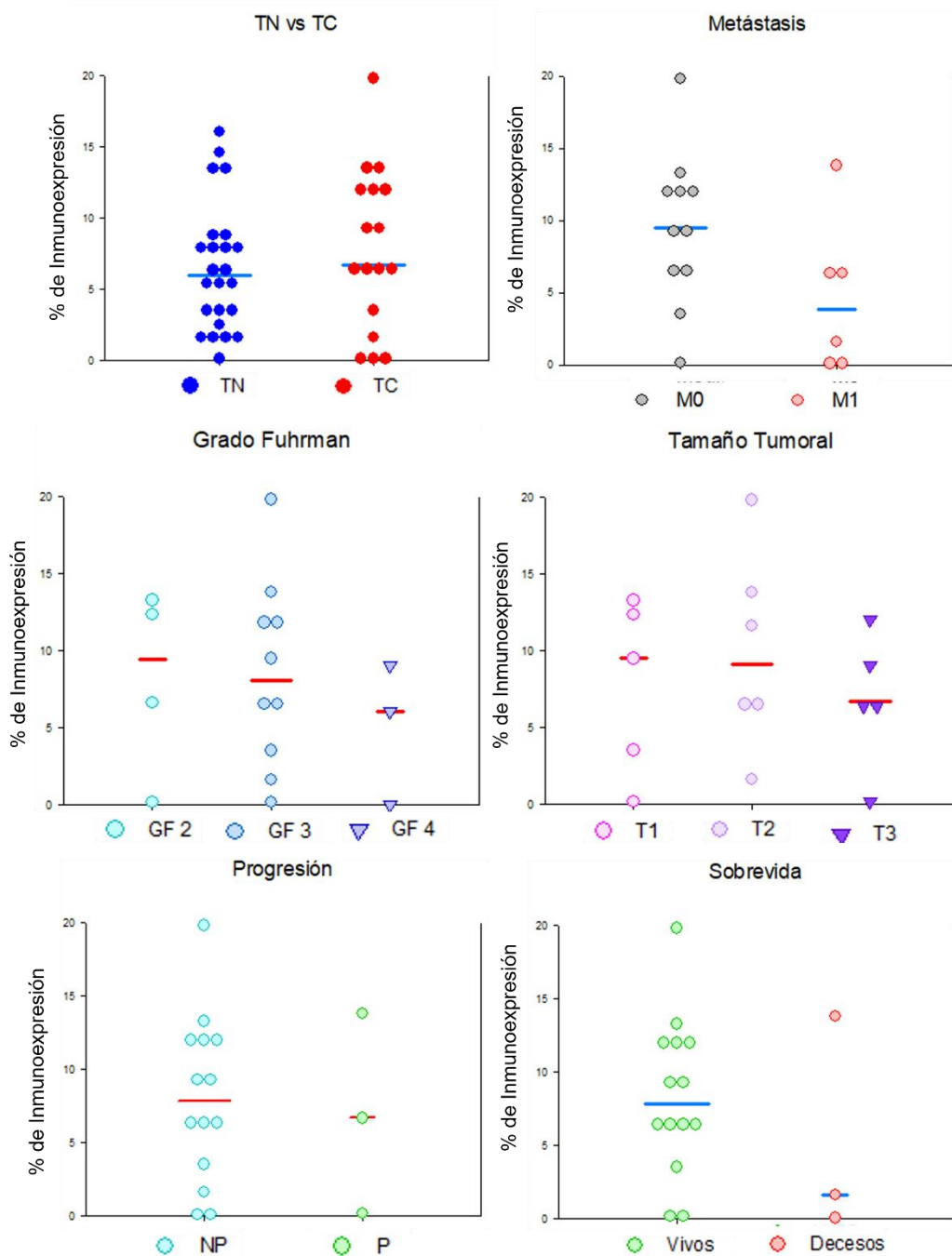


Figura 22. Análisis de la expresión de Hsp90β vs las variables clínicas. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre las diferentes variables clínicas asociadas a CCR y la inmunoección de Hsp90β. *p<0.05.

Análisis de asociación entre la proteína Hsp90 α y las variables de CCR

Al ser la isoforma inducible, se ha reportado que Hsp90 α se presenta en etapas tempranas del cáncer y se ha asociado a la malignidad de las células cancerosas. En la evaluación realizada, se encontró que la proteína se encuentra en menor cantidad en TC como se observa en las gráficas de la **Figura 23** en el panel superior. Incluso encontrando una diferencia significativa entre los dos tipos de tejidos. En el panel inferior de la **Figura 23**, se presentan los dos tipos de tejido con diferentes niveles de expresión, donde observamos de izquierda a derecha un aumento en los niveles de la proteína Hsp90 α .

Adicionalmente, se encontró un marcaje de esta proteína principalmente en el citoplasma de las células tubulares e incluso cuando la expresión aumenta, la proteína se localiza en el núcleo. Por otro lado, en TC la expresión de la proteína es principalmente nuclear y en niveles altos de expresión, la proteína se encuentra más concentrada en el núcleo, pero también se puede observar en el citoplasma. Estos datos sugieren que Hsp90 α tiene un papel importante y diferencial al de Hsp90 β en el CCR e incluso puede tener una implicación en la ERC.

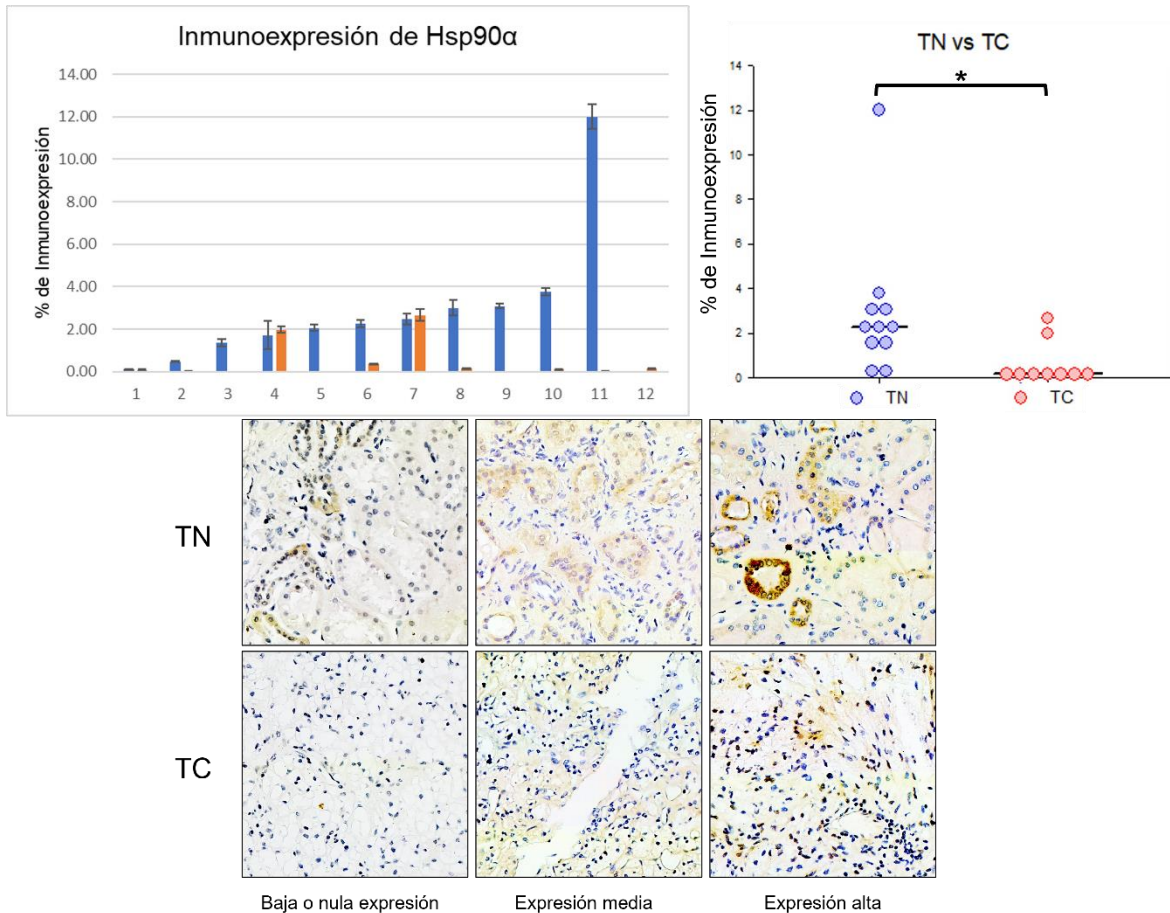
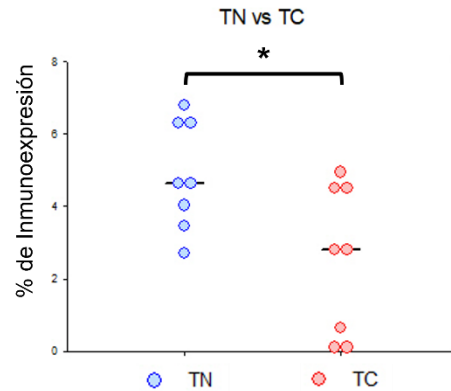
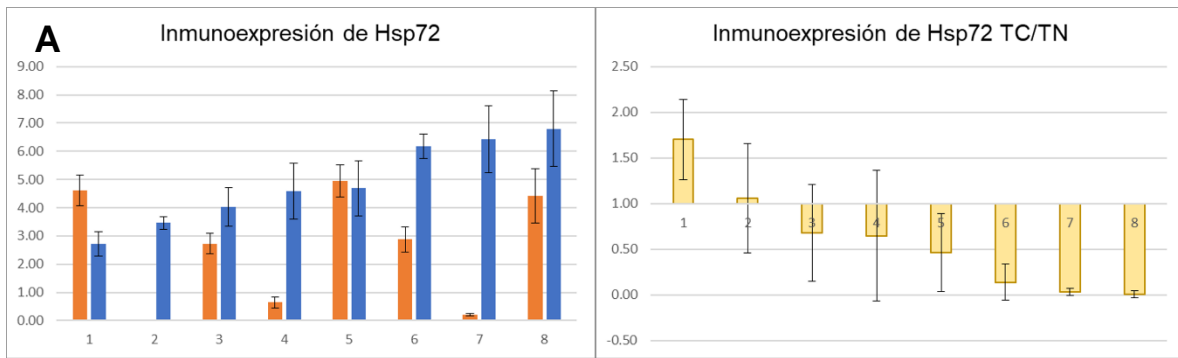


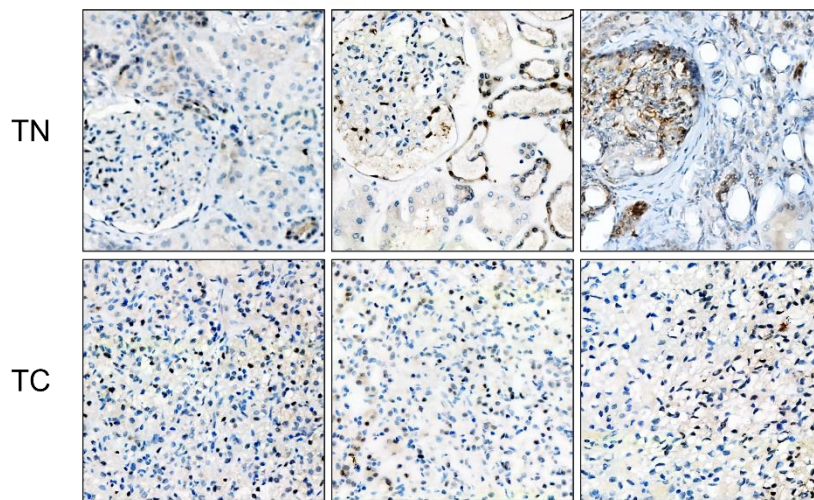
Figura 23. Análisis del % de inmunopositivity de la proteína Hsp90α. Se muestra una gráfica de barras con el % de inmunopositivity en TN y TC en orden decreciente respecto a TN. En el panel inferior se presentan imágenes representativas de la expresión de la proteína de choque térmico alfa (Hsp90α, por sus siglas en inglés) donde se observan diferencias en la inmunotinción. * $p < 0.05$

Análisis de asociación entre la proteína Hsp72 y las variables de ERC

Una de las proteínas principales para estudiar la ERC es la proteína Hsp72, la cual se ha encontrado asociada a Hsp90 e incluso se utiliza como marcador de AKI, por lo que es de interés su estudio en el diagnóstico de la ERC. En el presente estudio se determinaron algunas muestras mediante IHQ, donde se encontró que TN presenta una mayor expresión de Hsp72 en comparación con TC, con una diferencia estadísticamente significativa (**Figura 24A**). Esto sugiere que Hsp72 estaría involucrada más en el desarrollo de la ERC que en el CCR.



B



TFGe	>90mL/min	>90mL/min	<90mL/min
Fibrosis	<30%	<30%	>30%
Metástasis	M0	M0	M1
Grado Fuhrman	2	3	4
Tamaño Tumoral	T1	T2	T3
Sobrevida	V	V	D

Figura 24. Análisis del % de inmunoexpresión de la proteína Hsp72. A) Se muestra una gráfica de barras con el % de inmunoexpresión en TN y TC en orden creciente respecto a TN. Una gráfica de barras de la relación del % de inmunoexpresión de TC/TN. Y en el panel inferior se presenta la gráfica de dot plot del análisis de la inmunoexpresión entre ambos tipos de tejidos. B) Imágenes de IHQ de los casos más representativos de los casos con las variables clínicas principales *p<0.05

Adicionalmente, en la **Figura 24B** se muestran las imágenes de IHQ de los casos más representativos de la cohorte. Donde observamos una mayor expresión de Hsp72 en el citoplasma y núcleo de las células tubulares e incluso se localiza en el núcleo de las células del glomérulo. Por otro lado, en TC observamos que la localización cambia principalmente a nuclear donde existen menos células que expresan esta proteína. Estos resultados sugieren papeles diferenciales entre ambos tipos de tejidos. Sin embargo, se requieren de más muestras para obtener resultados concluyentes.

Análisis de asociación entre la proteína KIM-1 y las variables de ERC

Para el análisis de esta proteína se tomaron los resultados de densitometría de píxeles teñidos en las imágenes de Western Blot. Posteriormente, se graficó la relación de KIM-1 sobre GAPDH. En la **Figura 25** se presentan las imágenes representativas del Western Blot realizado donde observamos una expresión variable en todas las muestras. Además, en el panel inferior se presenta la gráfica de los resultados obtenidos por densitometría.

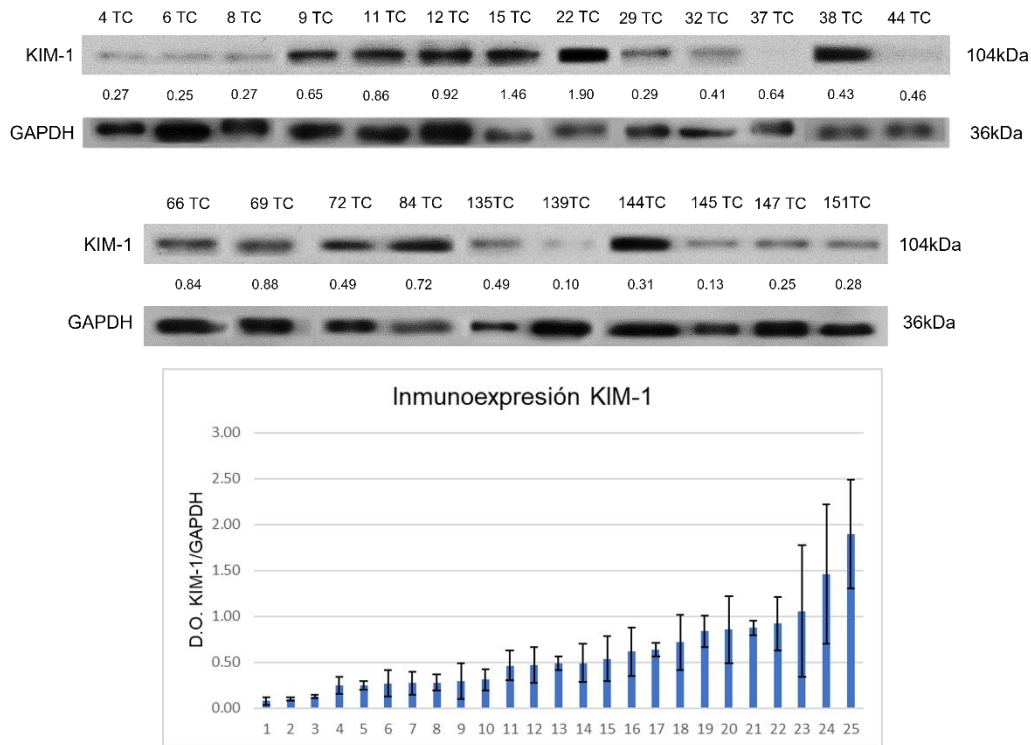


Figura 25. Análisis densitométrico de la proteína KIM-1. Se presenta una imagen representativa del Western blot de KIM-1. En el panel inferior, se muestra una gráfica de barras con la densidad óptica (D.O.) obtenida en TC en orden creciente.

Posteriormente, se utilizaron los resultados de densidad óptica para el análisis de asociación con las variables clínicas asociadas tanto a CCR como a ERC. En la **Figura 26** se presentan las gráficas de *dot plot* de análisis con las variables clínicas asociadas a CCR. En estas gráficas no observamos diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, observamos una tendencia al aumento de esta proteína en el grupo de Metástasis, Grado Fuhrman 4 y Progresión.

A pesar de no encontrar asociación de KIM-1 con las variables asociadas a CCR, se buscó analizar su asociación con la ERC, donde se han reportado hallazgos interesantes de esta proteína. En la **Figura 27** se presentan las gráficas de *dot plot* del análisis con las variables clínicas asociadas a ERC. En este análisis no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos. Sin embargo, el aumento de la proteína KIM-1 se encontró relacionada con una TFGe menor a $90\text{mL}/\text{min} * 1.72\text{m}^2$ como ya se ha reportado anteriormente. Mientras que el análisis con la fibrosis en TC no mostró cambios en la expresión en ambos

grupos. Para tener resultados más concluyentes es necesario aumentar el número de muestras analizadas.

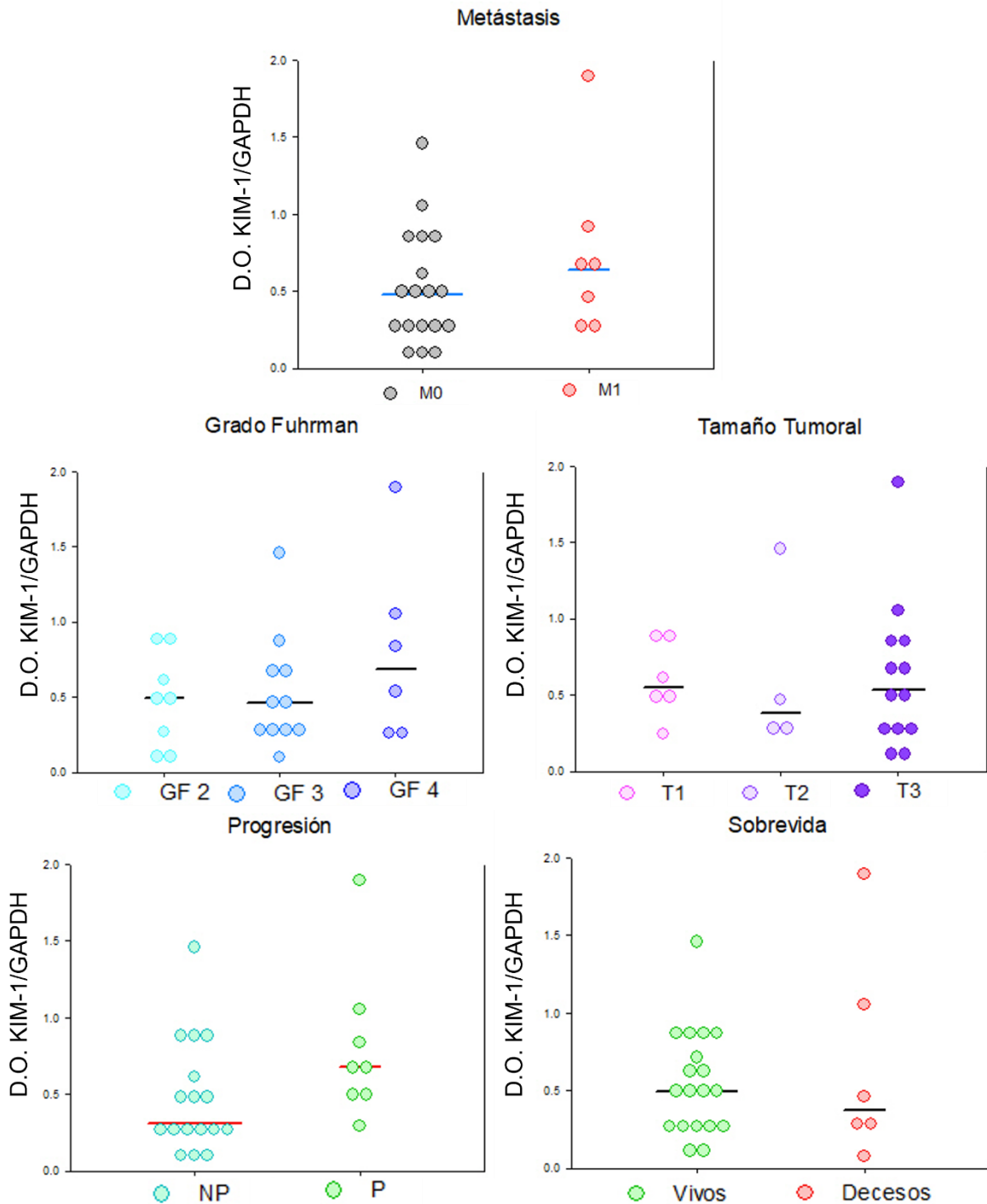


Figura 26. Análisis de la expresión de KIM-1 vs las variables clínicas asociadas a CCR. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre las diferentes variables clínicas asociadas a CCR y la inmunoexpresión de KIM-1.

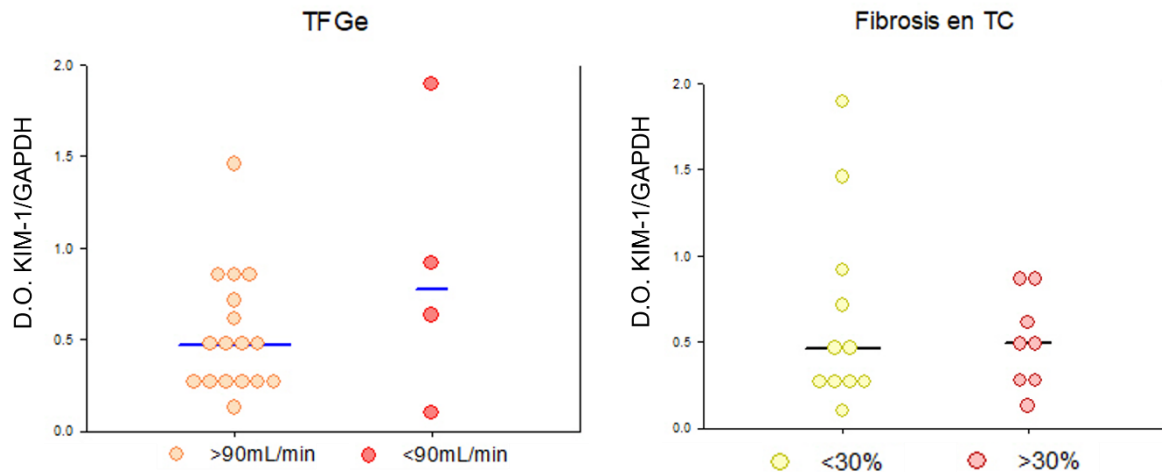


Figura 27. Análisis de la expresión de KIM-1 vs las variables clínicas asociadas a ERC. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre las diferentes variables clínicas asociadas a ERC y la inmunoexpresión de KIM-1.

Análisis de asociación entre la proteína TGF- β y las variables de ERC

La proteína TGF- β participa principalmente en la formación de ECM, sin embargo, se sabe que puede participar en vías inflamatorias y de proliferación a través de sus vías no canónicas. En este estudio se buscó analizar la expresión de esta proteína, ya que, como se mencionó anteriormente, un evento subyacente a la aparición de la ERC es la fibrosis, la cual disminuye la funcionalidad de las nefronas, lo que conlleva a la disminución de la TFGe, un evento que se respaldó en este estudio (**Figura 5**).

En la **Figura 28** se observan las imágenes representativas del Western Blot de TGF- β . Donde observamos una expresión variable en todas las muestras. De manera interesante, pocas muestras mostraron una expresión detectable de esta proteína. En el panel inferior se presenta la gráfica obtenida de densitometría de esta proteína en orden creciente de expresión.

Posteriormente, con los datos obtenidos de densitometría se realizaron los análisis estadísticos de asociación de la expresión de TGF- β y las variables clínicas asociadas al CCR y a la ERC. Los resultados y las gráficas de *dot plot* se presentan en la **Figura 29** y en la **Figura 30**, respectivamente.

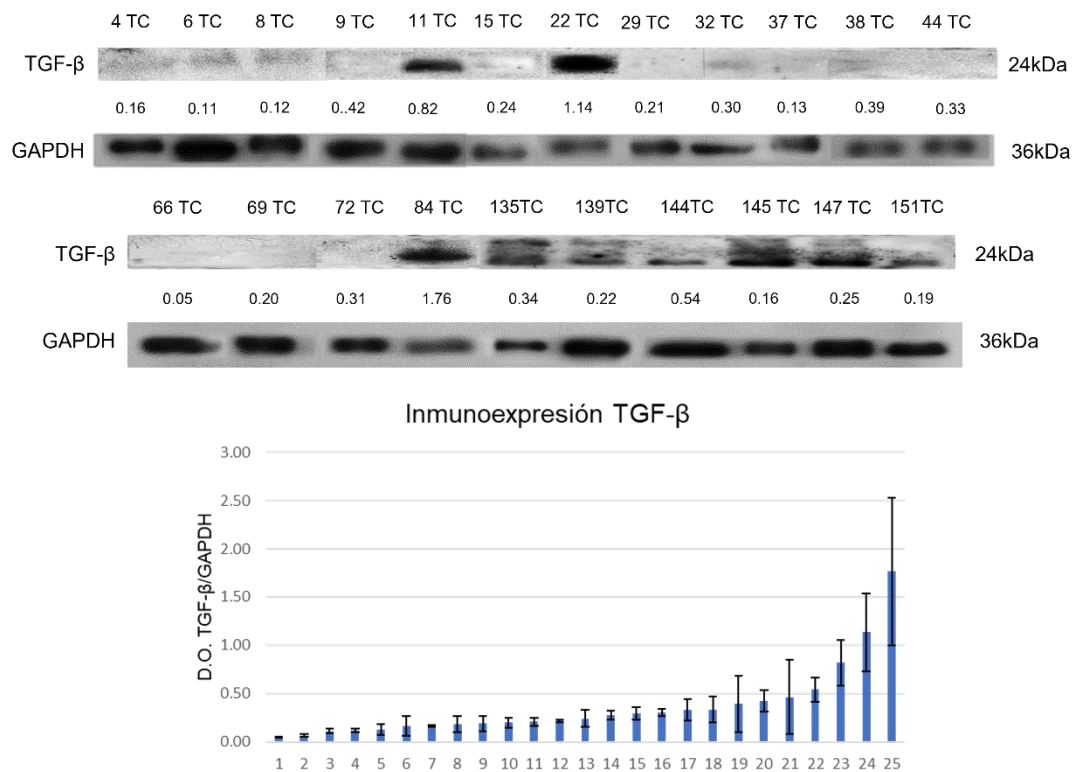


Figura 28. Análisis densitométrico de la proteína TGF-β. Se presenta una imagen representativa del Western blot de KIM-1. En el panel inferior, se muestra una gráfica de barras con la densidad óptica (D.O.) obtenida en TC en orden creciente.

El análisis de asociación con las variables clínicas asociadas al CCR no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**Figura 29**). A pesar de ello, observamos una tendencia a aumentar su expresión en el grupo de Metástasis y la Progresión del CCR. Sin embargo, se requiere aumentar el número de muestras para obtener resultados más concluyentes.

Por otro lado, se buscó determinar la asociación de la expresión de TGF-β y las variables clínicas asociadas a la ERC, donde anteriormente ya se han reportado hallazgos interesantes, incluido este estudio donde se asoció la fibrosis con la disminución de la TFGe.

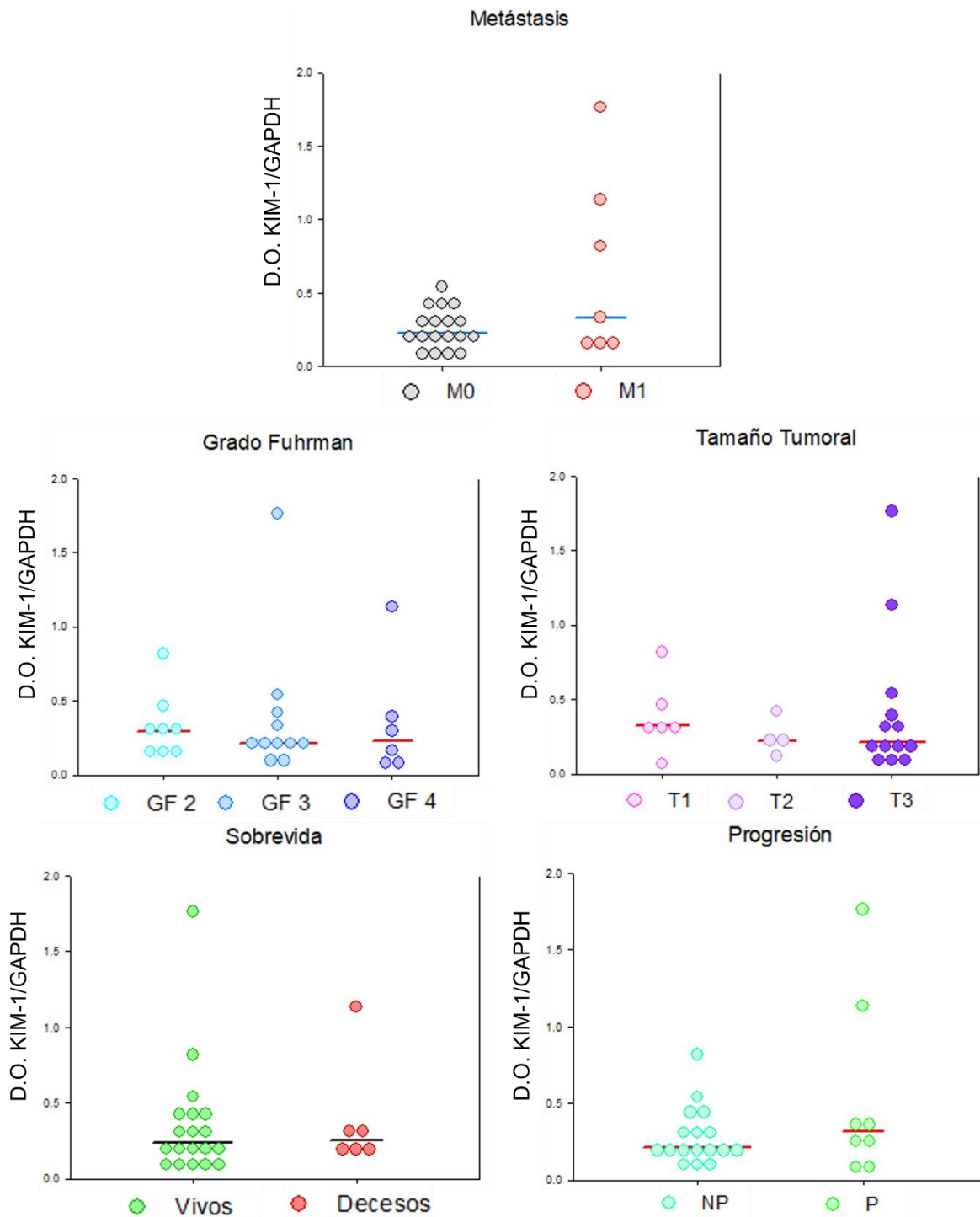


Figura 29. Análisis de la expresión de TGF-β vs las variables clínicas asociadas a CCR. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre las diferentes variables clínicas asociadas a CCR y la inmunoexpresión de TGF-β.

En la **Figura 30** se presentan las gráficas de *dot plot* del análisis de asociación entre la expresión de TGF-β y las variables clínicas asociadas a la ERC. En esta figura,

observamos una diferencia estadística significativa en el análisis con la TFGe, donde un aumento en la expresión de esta proteína se asoció con la disminución de la TFGe y, por lo tanto, un mayor riesgo a padecer ERC. En cuanto a la fibrosis no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, se observó una tendencia a aumentar cuando se analizó el grupo de mayor grado de fibrosis.

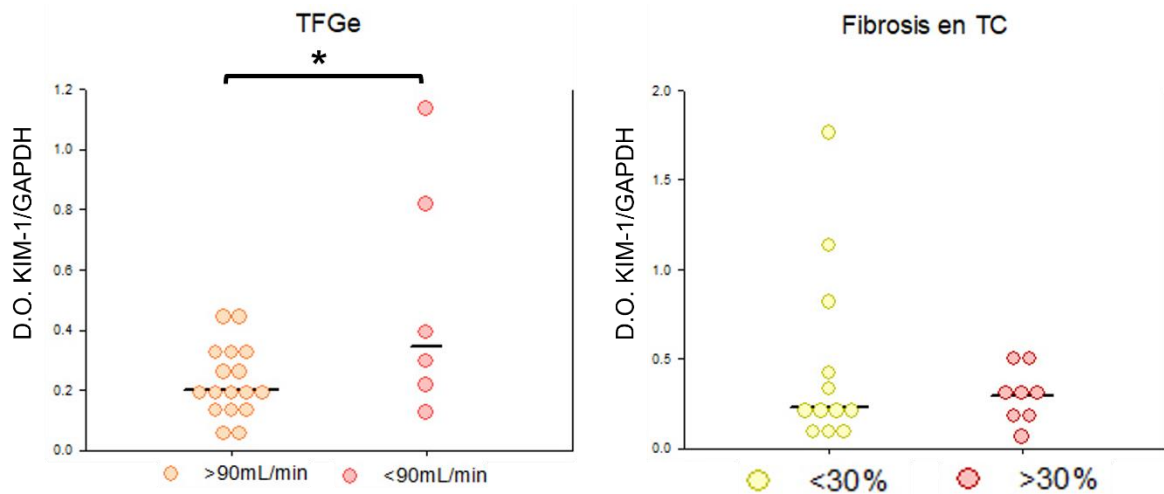


Figura 30. Análisis de la expresión de TGF- β vs las variables clínicas asociadas a ERC. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre las diferentes variables clínicas asociadas a ERC y la inmunoexpresión de TGF- β . * $p < 0.05$

Estos resultados sugieren que TGF- β puede ser una molécula de interés como marcador de pronóstico de la ERC en los pacientes oncológicos al momento de la nefrectomía, así como ser parte del panel de marcadores de ERC aunado a la fibrosis, la TFGe y el análisis de KIM-1.

Análisis de la expresión del gen HSP90AA1

Finalmente, se realizó el análisis por qRT-PCR del gen HSP90AA1. Una de las proteínas que mostraron un interés previamente en este estudio. Además, en otros estudios el gen ha mostrado tener ser importante en el desarrollo del cáncer, así como tener relevancia clínica en estos pacientes oncológicos. Por esta razón se buscó investigar la implicación del gen de HSP90AA1, ya que también se ha encontrado en biopsias líquidas, una técnica que es de interés para el grupo de laboratorio y se tiene como perspectiva del presente estudio.

En la **Figura 31** se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación relativa (CR) del gen HSP90AA1, donde se graficó el \log_{10} de estos resultados en orden ascendente comparando la expresión en TC contra TN. En esta gráfica los resultados menores a 0 representan las muestras que tienen una menor expresión en TC en comparación con TN. En la gráfica inferior de *dot plot*, se observa el análisis estadístico de los resultados donde observamos que existe una diferencia estadística significativa en la expresión aumentada de HSP90AA1 en TC cuando se comparó con TN.

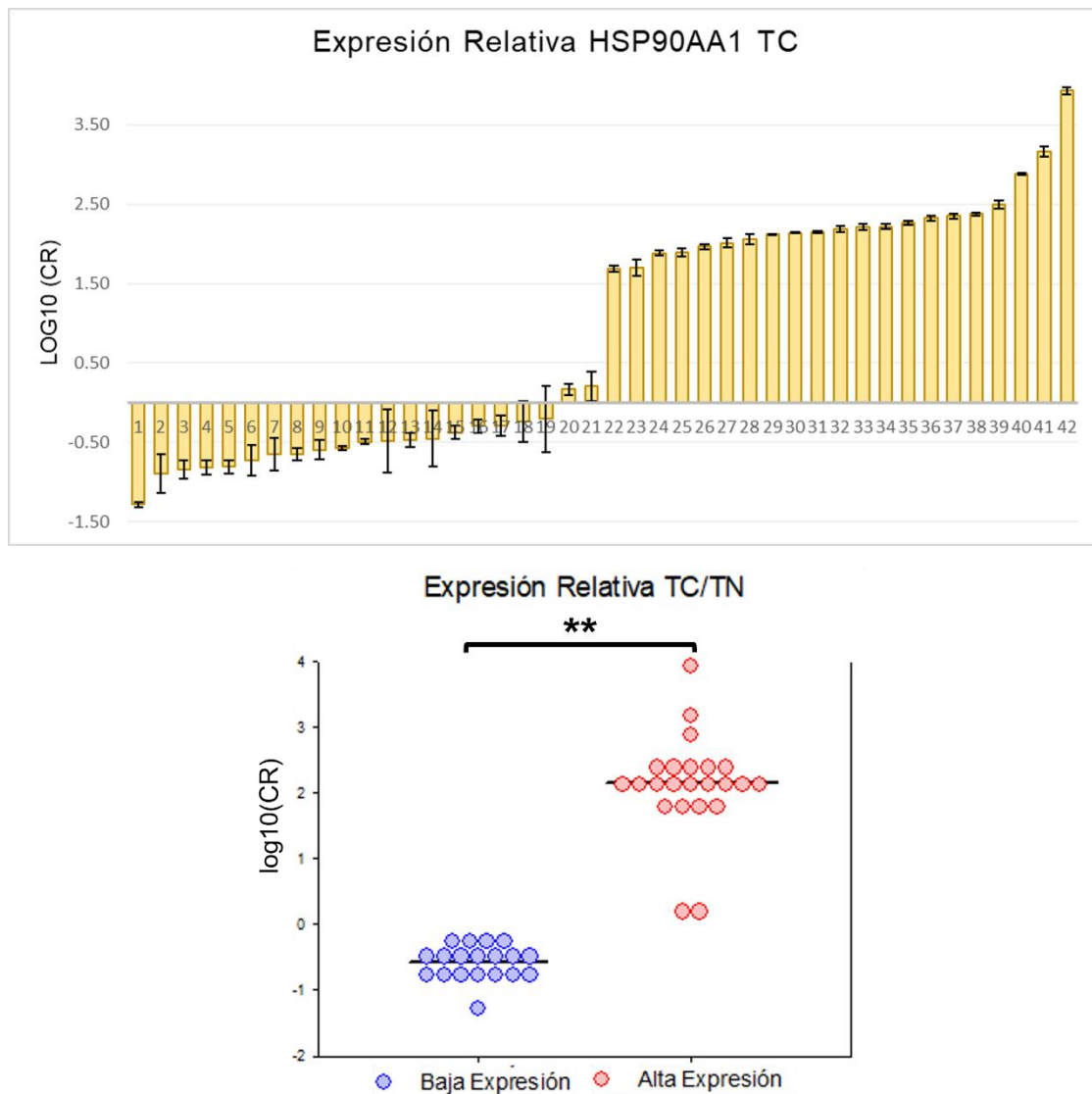


Figura 31. Análisis de la cuantificación relativa (CR) del gen HSP90AA1. Se muestra una gráfica de barras con el \log_{10} (CR) de la expresión en TC/TN en orden creciente. En el panel inferior se presenta la gráfica de dotplot del análisis comparativo de la expresión en ambos tipos de tejidos. ** $p < 0.001$

Al observar una mayor expresión del gen HSP90AA1 en TC, se realizó el análisis de asociación de la expresión del gen HSP90AA1 y las variables clínicas asociadas al CCR. En la **Figura 32** se presentan las gráficas de *dot plot* de este análisis. No se encontraron diferencias significativas en las variables clínicas evaluadas. Sin embargo, observamos una tendencia a disminuir su expresión en el grupo de metástasis y en los pacientes que progresaron. De manera contraria, la expresión aumentada del gen se observó en los grupos asociados al tumor tales como el Grado Fuhrman y el Tamaño tumoral. Estos resultados sugieren que la evaluación de los genes de las proteínas evaluadas puede proporcionar más información sobre la biología del CCR, así como su implicación clínica funcionando como marcadores de esta patología y pueden ser evaluados a través de biopsias líquidas.

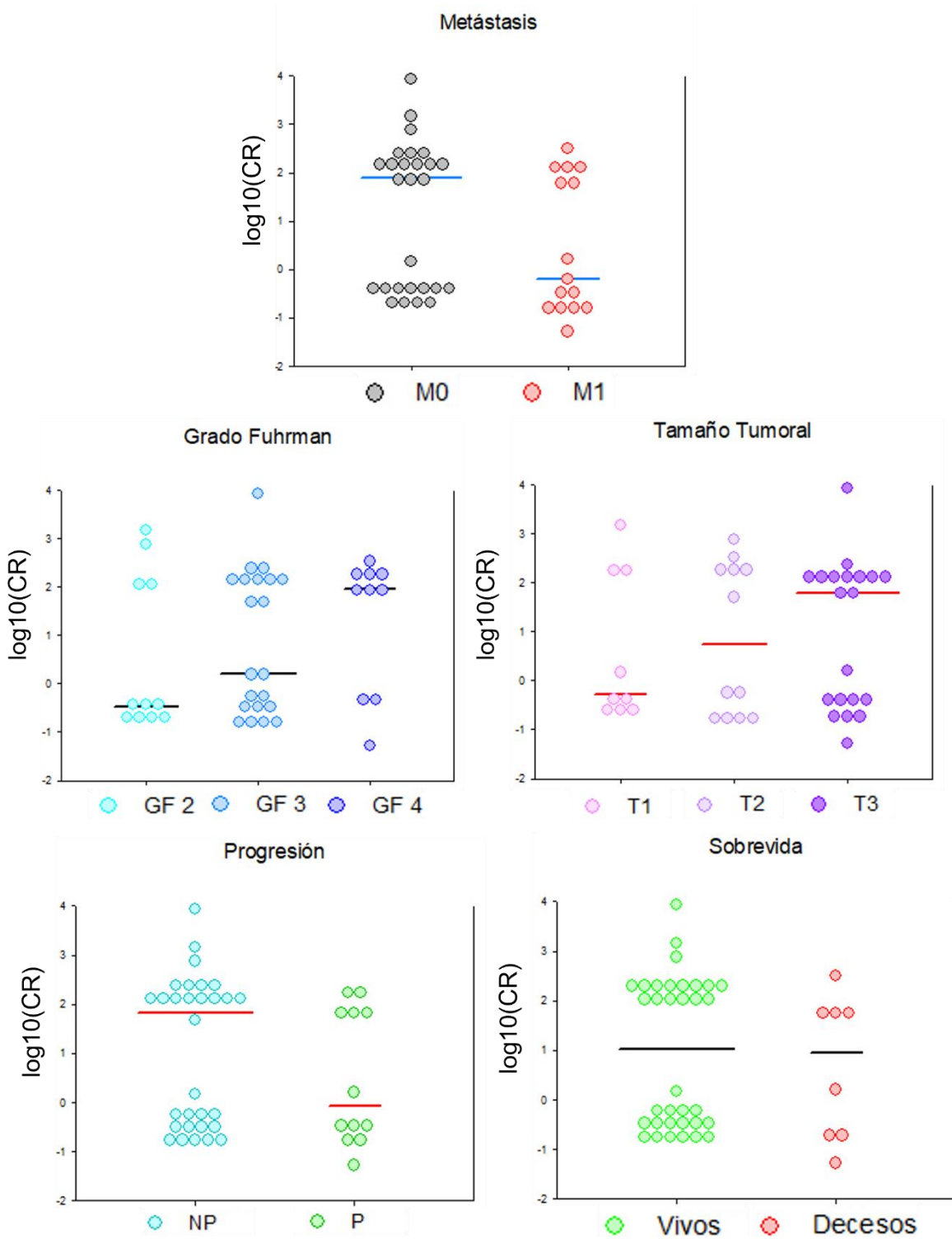


Figura 32. Análisis de la expresión de HSP90AA1 vs las variables clínicas asociadas a CCR. Se muestran las gráficas de dot plot de la comparación entre las diferentes variables clínicas asociadas a CCR y la expresión relativa de HSP90AA1.

XI. Discusión

En el presente estudio se analizó la implicación de diferentes marcadores de ERC en pacientes con CCR, para finalmente establecer un panel de pronóstico de progresión o riesgo a padecer ERC. Inicialmente al analizar los datos demográficos de la cohorte, se encontró una mayor predisposición en hombres frente a mujeres con una relación 2:1 respectivamente. Esto es algo que ya se ha reportado anteriormente por diferentes estudios^{1-3,43} incluyendo a Global Cancer Observatory. Adicionalmente, nuestra cohorte presentó una edad menor a la media a nivel global, sugiriendo que en el INCan la población donde se detecta el CCR es más joven. Por otro lado, la mitad de la cohorte se ubicó en el Tamaño Tumoral T3 (el cual se clasificó en este estudio como etapa avanzada), de acuerdo con el TNM; y el 72% tenía un Grado Fuhrman 4. Por lo que nuestra cohorte de pacientes pertenece a una muestra de grado avanzado de CCR. Estos resultados se relacionan a los estudios demográficos realizados anteriormente donde mencionan que la mayoría de los pacientes que se diagnostican, se encuentran en una etapa avanzada de la enfermedad.^{1,2} Finalmente, se evaluó la supervivencia a 2 años y la progresión, mostrando que la mayoría de los pacientes sobrevivía a la enfermedad y no progresaba después de la nefrectomía. Lo cual también ha sido reportado anteriormente.^{1,50,119}

A pesar de que los pacientes ya no recurren al cáncer, también se ha reportado que la mitad de los pacientes oncológicos presentan una disminución en la TFGe, e incluso es la segunda comorbilidad más frecuente en estos pacientes seguida de las enfermedades cardíacas.^{28,50,51,57} Nuestro estudio apoya estos resultados, ya que se observó que más de la mitad de los pacientes (68%) presentaba una TFGe <90mL/min, indicando que estos pacientes tenían un mayor riesgo a padecer ERC. Incluso, 3 meses después de la nefrectomía, la mayoría de los pacientes ya la padecen. Adicionalmente, se evaluaron los niveles de creatinina reportados por el laboratorio clínico del INCan, para poder comparar su comportamiento al momento de la nefrectomía y 3 y 12 meses después de esta con los valores de TFGe calculados. Este análisis no mostró diferencias significativas en los niveles de creatinina, manteniendo el mismo comportamiento durante los diferentes tiempos

evaluados. Por otro lado, la TFG_e mostró cambios significativos en los tres tiempos y, como se mencionó anteriormente, mostrando que los pacientes 3 meses después de la nefrectomía se encuentran en una etapa 2 de la ERC, con una TFG_e <60mL/min. Nuestros resultados resaltan la importancia de estudiar la aparición de la ERC en los pacientes oncológicos y la evaluación de los parámetros necesarios para su detección, así como la necesidad de encontrar nuevos marcadores que predigan su aparición.

Al conocer la importancia de la evaluación de la TFG_e y la aparición de ERC en los pacientes con CCR, se evaluó un evento subyacente a la ERC, el aumento de la fibrosis en las nefronas. Para determinar esta relación, a través de la tinción con Rojo de Sirio se determinó el porcentaje de fibrosis encontrando un mayor grado en TN en comparación con TC. Estos resultados se apoyan con lo mencionado anteriormente, ya que también se evaluó el grado de fibrosis en TN en los diferentes grupos de ERC, mostrando que la fibrosis aumentada se asoció a un mayor riesgo a padecer ERC con TFG_e <90mL/min. Otros estudios han reportado la relación de la fibrosis con la ERC con resultados similares sugiriendo que la fibrosis puede ser un marcador pronóstico y diagnóstico de la ERC.^{79,82,83,105,120} Incluso, esta aparición de fibrosis nos puede ayudar a entender la relación entre la ERC y el CCR y a identificar nuevos marcadores asociados a la ERC.^{79,83,105,120,121}

Adicionalmente, se buscó investigar sobre la relación de la fibrosis en el CCR. En este caso, se han reportado diferentes resultados y teorías contradictorias sobre la aparición de la fibrosis en los tumores. Algunos reportes mencionan que la fibrosis es un factor que previene la progresión del cáncer, ya que, al ser una condición de estrés, la inflamación recluta a las células del sistema inmune, finalizando en la formación de ECM, por lo que se disminuyen los eventos de crecimiento y proliferación de las células cancerosas, por inhibición directa o deprivación de nutrientes^{81,86,122}. Por otro lado, se menciona que la fibrosis puede ser un evento que ayude a la progresión del cáncer, ya que los miofibroblastos que están cercanos al tumor necesitan activarse para generar proteínas de la ECM. Esta activación de miofibroblastos a fibroblastos requiere de un evento bien conocido en cáncer, la

transición epitelio mesénquima (EMT). Por lo que, al activarse los miofibroblastos al recibir señales de EMT, estas señales también llegarían a las células cancerosas activándolas y ayudando en su crecimiento, proliferación y posterior metástasis a otros órganos.^{81,86,120} En este estudio se encontró una relación entre un menor grado de fibrosis y un mayor tamaño tumoral en T3, Grado Fuhrman 4 y la progresión de la enfermedad. Estos resultados sugieren que un grado de fibrosis aumentado previene la progresión y desarrollo del cáncer, por lo que nuestro estudio apoya la primera hipótesis planteada anteriormente.

Con los resultados de fibrosis, podemos sugerir que la evaluación de este evento en ambos tejidos nos puede permitir predecir la progresión de la ERC y del CCR, a través de la tinción de ambos tipos de tejidos. Sin embargo, la evaluación de las biopsias de tejido es una técnica invasiva y no permite el seguimiento del paciente. Por lo que surgió el interés de evaluar marcadores moleculares asociados tanto a la ERC, al CCR y a la fibrosis.

En este sentido, se evaluaron diferentes proteínas determinadas como marcadores de CCR, algunas propuestas por el grupo de investigación y marcadores asociados a ERC y a la fibrosis. Inicialmente, se valuó la expresión del factor de transcripción PAX8, el cual funciona en la clínica para identificar sitios metastásicos de un tumor renal primario. Adicionalmente, se ha asociado su expresión a la regulación epigenética de diferentes factores activadores de la proliferación celular.^{3,41,123,124} En nuestro estudio se encontró una tendencia a aumentar en los grados avanzados de la enfermedad como el Grado Fuhrman y el Tamaño Tumoral de la clasificación TNM. Estos resultados sugieren que la expresión aumentada de PAX8 puede ayudar en la determinación de la etapa del cáncer, además de su utilidad en la clínica para identificar sitios metastásicos.

Posteriormente se evaluó la proteína VHL, la cual mostró una disminución significativa en TC en comparación con TN. Incluso permitió identificar las células tumorales del ccRCC de otros tipos celulares (**Figura 7**). Adicionalmente, se observó una expresión disminuida en el grupo de metástasis, lo que sugiere que VHL puede prevenir el desarrollo del CCR. Incluso, se le ha conocido como supresor

de tumores, es una de las mutaciones iniciales del ccRCC esporádico y la mutación de este gen es la causa del 4% de los casos hereditarios de ccRCC.^{1,3,11,49,119} Por lo anterior, se considera como un marcador de ccRCC muy promisorio y de principal interés para el estudio de la biología del ccRCC. pVHL es parte de una ubiquitina ligasa y tiene como blanco a HIF-1 α , un factor de transcripción que se sobreexpresa en condiciones de hipoxia para promover, entre otras cosas, la proliferación celular y la angiogénesis. Por lo que es importante para el desarrollo del cáncer, ya que se ha demostrado que ambas isoformas HIF-1 α y HIF-2 α participan de manera importante y contraria en la biología del cáncer renal y específicamente del ccRCC.^{8,44,125,126}

Un efector del supresor pVHL, es el factor pro-angiogénico VEGF, el cual es un factor de crecimiento importante la angiogénesis. Los resultados mostraron una mayor expresión de VEGF en TN en comparación con TC, esto posiblemente al evento de fibrosis donde las células de los túbulos sufren una privación de oxígeno activando la vía de HIF.^{83,105}

Al ser el cáncer una condición de estrés, se propuso evaluar diferentes proteínas asociadas al estrés celular. Una de las más importantes, es el factor de choque térmico (HSF1), el cual se sobreexpresa en condiciones de estrés. Los resultados de IHQ mostraron una expresión similar en ambos tipos de tejidos, posiblemente a que TN se encuentra cercano a TC lo que le genera condiciones de estrés, así como el mayor grado de fibrosis presente en TN y el mayor riesgo de desarrollar ERC en estos pacientes. Adicionalmente, se encontró una tendencia a aumentar la expresión de HSF1 en las variables de Tamaño Tumoral y Grado Fuhrman asociándose a una etapa avanzada del cáncer. Estos resultados se han reportado anteriormente, donde también se ha evaluado como marcador del cáncer y se ha demostrado que su expresión aumentada se asocia a una progresión del cáncer y al estrés crónico.^{127,128}

Uno de los genes blancos principales de HSF1 es la familia de Hsp90, a la cual se le ha llamado la chaperona del cáncer.¹²⁹ Esta familia de proteínas tiene 4 isoformas, entre las cuales, las más importantes son Hsp90 α y Hsp90 β y han

mostrado tener papeles diferenciales en la progresión y el desarrollo del cáncer.^{130–}

¹³³ Las microfotografías de las IHQ mostraron un comportamiento de Hsp90β interesante: en TN se observó una expresión principalmente en citoplasma mientras que en TC Hsp90β se encontró de manera equitativa tanto en citoplasma como en núcleo, sugiriendo que en el cáncer tiene una actividad nuclear. En cuanto a los niveles de expresión, en este estudio, la isoforma Hsp90β mostró niveles similares en ambos tipos de tejidos, de manera similar a HSF1. Incluso, se encontró una expresión disminuida de esta proteína en los pacientes con metástasis. Sugiriendo que su participación es importante para la prevención del desarrollo del CCR. La isoforma Hsp90β es la isoforma constitutiva y se le ha asociado a la respuesta adaptativa al estrés celular,^{134–137} por lo que, en etapas tempranas del cáncer, esta isoforma se vería aumentada y al avanzar el cáncer, su expresión disminuiría.

La isoforma Hsp90α es la isoforma inducible y por lo tanto su expresión se ha asociado principalmente a un peor pronóstico de la enfermedad. Incluso se ha demostrado que se secreta en el medio extracelular funcionando como alarmina y, además, interactuando con diferentes proteínas cliente.^{132,138–141} En este estudio se encontró una mayor expresión en TN, ya que la proteína se encuentra localizada tanto en núcleo como en citoplasma, en comparación con TC donde se encontró solo en el núcleo de las células tumorales, sugiriendo un papel diferencial en el desarrollo del CCR y la ERC.

En conclusión, la evaluación de las proteínas de estrés HSF1, Hsp90α y Hsp90β han mostrado ser marcadores predictivos de diferentes tipos de cáncer y al observar los resultados del presente estudio también se proponen como marcadores de CCR. Incluso, Hsp90 interactúa con todas las proteínas evaluadas en el presente estudio,^{131,142} sugiriendo que Hsp90 y el estrés celular, puede ser un nexo entre la ERC y el CCR. La propuesta como marcadores se ha evaluado en distintos tipos de cáncer y recientemente ha tomado más popularidad para la prevención y diagnóstico del cáncer que como blanco terapéutico.^{127,130,133,141}

En cuanto a los marcadores de ERC, se evaluó a la proteína Hsp72, la cual ya se utiliza como marcador en la lesión renal aguda (LRA), pero podría tener un papel

importante en la ERC, ya que esta proteína se acompaña de Hsp90 en todo momento, proporcionando soporte a la interacción entre Hsp90-cliente y también de manera independiente al ejercer su función.^{108,143}

En este estudio, a pesar de contar con pocas muestras, se encontró que esta proteína se encontró principalmente expresada en TN, tanto en citoplasma como en el núcleo de las células tubulares, mientras que en TC su expresión cambió a núcleo. Se ha reportado que esta proteína es importante para la respuesta inflamatoria, por lo que el aumento encontrado en TN sugiere que Hsp72 podría estar contribuyendo a la disminución de la inflamación de las células tubulares, como ya se ha reportado anteriormente.^{144,145} Mientras que, en TC, se encontró una expresión disminuida; resultados que se asocian a lo mencionado anteriormente. Incluso, la expresión cambió de localización a ser principalmente nuclear, sugiriendo un papel diferencial en el CCR. Sin embargo, se sabe poco de Hsp72 y su participación en condiciones oncológicas.

Uno de los principales marcadores de ERC es la molécula de lesión al riñón 1 (KIM-1, por sus siglas en inglés) la cual ya se ha reportado tener un papel diagnóstico en la ERC y la LRA en diferentes estudios a nivel plasmático, urinario y expresión localizada.^{100,146,147} En este sentido, buscamos evaluar la expresión de la proteína en el tejido tumoral, donde, a pesar de no reportarse en la literatura, nos enfocamos a la relación de esta proteína con el microambiente tumoral y el paciente oncológico, ya que se ha presentado en las biopsias líquidas de pacientes con ERC y CCR, lo cual se tiene como perspectiva para el presente estudio.¹⁴⁸

En este estudio no se encontraron diferencias significativas en los análisis estadísticos realizados. Sin embargo, el aumento de esta proteína en TC se encontró relacionado a una etapa avanzada de la enfermedad (progresión, Grado Fuhrman 4). Incluso en reportes anteriores, esta proteína se ha encontrado en etapas tempranas del CCR, donde se ha observado una expresión aumentada en plasma sugiriendo ser un marcador de detección temprana del CCR.^{148,149} De manera interesante, se ha reportado que KIM-1 puede ser una molécula que

previene el desarrollo de la metástasis en pacientes con CCR,¹⁵⁰ sugiriendo diferentes papeles en todas las etapas del CCR.

Por otro lado, se analizaron las variables asociadas a la ERC, ya que, como se menciona anteriormente, se ha encontrado en plasma y orina de estos pacientes y de los pacientes oncológicos. En este estudio la expresión aumentada de KIM-1 se encontró relacionada a la disminución de la TFG α como ya se ha establecido anteriormente,^{100,151} así como a la fibrosis en el tejido renal de ratones.⁹⁸ Sin embargo, en TC no se encontró relacionada con este evento. En conjunto, estos resultados sugieren un papel diferencial en ambas patologías. Por esta razón, el estudio de esta molécula y el aumento del número de muestra es de interés del grupo de investigación para entender el papel de la proteína en el CCR y el desarrollo de la enfermedad.

Otra molécula de interés es la proteína TGF- β , la cual participa principalmente en procesos inflamatorios y la síntesis de matriz extracelular, por lo que se cree que es importante en el desarrollo de la ERC. Sin embargo, se sabe que esta proteína puede participar en la progresión del cáncer favoreciendo la transición epitelio mesénquima (EMT) y la proliferación celular, por su característica de factor de crecimiento a través de las vías no canónicas de esta molécula.^{152,153}

En este estudio se buscó analizar la relación de esta proteína con la ERC, donde se encontró relacionado un aumento de la expresión de TGF- β con la disminución de la TFG α . Esta relación se ha estudiado previamente, donde se ha determinado que la proteína participa en la formación de fibrosis, un aumento en la apoptosis de las células tubulares y, además, se ha relacionado la privación de oxígeno con el aumento de esta proteína.^{89,154–156} Adicionalmente, en un modelo felino, se estudió a través de IHC la implicación de TGF- β en gatos con CKD, donde se encontró que una disminución de la proteína y cambio de localización en la nefrona se relacionó a mayores valores plasmáticos de urea y creatinina y, por lo tanto, a la progresión de la ERC.¹⁵⁷

Posteriormente, se realizó el análisis de asociación de la expresión de TGF- β y las variables clínicas asociadas al CCR, donde no se encontraron diferencias

significativas. Sin embargo, esta proteína se ha asociado a la progresión del cáncer, ya que, a través de sus vías no canónicas puede promover la proliferación y migración de las células cancerosas.^{117,153} Incluso, esta proteína se ha asociado a Hsp90 a través de la vía canónica de TGF- β para prevenir la fibrosis.¹⁵⁸ Por esta razón, sigue siendo una molécula de interés para el estudio de su implicación en el cáncer y la investigación de las vías no canónicas poco conocidas.

Finalmente, se realizó el análisis de la expresión del gen HSP90AA1, el cual ha mostrado estar relacionado a la progresión del cáncer y a la malignidad de las células tumorales.^{132,159} Además, es una molécula promisoría para el análisis en biopsias líquidas. En este estudio, se encontró una mayor expresión del gen HSP90AA1 en el tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente al tumor. Sin embargo, la proteína se encontró en bajos niveles en las muestras evaluadas. Este fenómeno ya ha sido reportado previamente por nuestro grupo de laboratorio. Sin embargo, no se han encontrado estudios sobre la relación de esta isoforma con el cáncer renal, por lo que nuestros reportes pueden abrir nuevos campos de investigación en la biología del cáncer renal.

XII. Conclusiones

Los resultados mostrados sugieren que los pacientes que presentan un aumento en el grado de fibrosis (>30%) en el tejido adyacente al tumor (TN), están predispuestos a desarrollar ERC al momento del diagnóstico del CCR, ya que se observó una TFGe <90mL/min en este grupo de pacientes, lo cual se relaciona a lo reportado anteriormente. Por otro lado, el grado de fibrosis disminuido en el tejido tumoral (TC) se asoció a un aumento en el tamaño del tumor y a la progresión del cáncer renal, posiblemente debido a que la fibrosis se asocia principalmente al deterioro de la función del órgano dañado y en el caso del tumor a un bajo aporte de nutrientes, ya que puede funcionar como una barrera entre el tumor y el microambiente tumoral.

En cuanto a los marcadores moleculares, se encontró que no existía diferencia estadística significativa entre la expresión de HSF1 entre los dos tipos de tejido (TN y TC), esto posiblemente a que el TN ya presenta un estrés previo debido a la aparición de la ERC y/o a la formación de fibrosis, ya que, en esta última, se encontró que el aumento de la expresión de HSF1 estaba asociada a un mayor grado de fibrosis en TN. Por otro lado, la proteína VHL es útil para diferenciar entre los dos tipos de tejidos (TN y TC), ya que se encontró una diferencia estadística significativa en la expresión de esta proteína entre ambos tipos de tejido. Estos resultados se asocian a los ya reportados anteriormente, donde una delección del gen de VHL se encuentra asociado al desarrollo del ccRCC desde las etapas iniciales del cáncer.

La proteína PAX8 mostró una mayor expresión en TC en comparación con TN, esto posiblemente a la desdiferenciación celular de las células cancerosas, ya que esta proteína participa en el desarrollo del riñón. Además, se encontró una mayor expresión en el tamaño tumoral 3 (T3) en comparación con T1, sugiriendo que esta proteína participa en el desarrollo del tumor. Por otro lado, el análisis de la proteína VEGF mostró una mayor expresión en el tejido adyacente al tumor en comparación con el tejido tumoral. Sugiriendo que este tejido presenta un estrés previo,

posiblemente por un mayor grado de fibrosis como se mencionó anteriormente, donde el tejido sufre eventos de hipoxia sobreexpresando a VEGF.

Adicionalmente, se evaluó la inmunoexpresión de las proteínas de choque térmico de 90kDa. Un blanco principal de HSF1. Se determinó la inmunoexpresión de la isoforma constitutiva Hsp90 β , donde se encontró una tendencia a disminuir su expresión en el grupo de pacientes con metástasis cuando se comparó con los pacientes que no presentaban metástasis al momento del diagnóstico, relacionándose con la adaptación al estrés celular. Por otro lado, la isoforma Hsp90 α se encontró mayormente expresada en TN, donde mantiene principalmente una localización citoplasmática. Mientras que, en TC, se localizó en núcleo, sugiriendo una participación diferencial en ambas patologías. De manera interesante, se encontró que el gen de esta isoforma, HSP90AA1, se encontró aumentado en el tejido tumoral, de manera contraria a la proteína. Esto sugiere un papel diferencial en la biología del cáncer renal.

Los marcadores mencionados anteriormente, sugieren tener un papel importante en el desarrollo del CCR y de manera interesante, podrían participar en la ERC, al mantener una expresión significativa en TN. En este sentido, este estudio representa un primer acercamiento para el establecimiento de un panel de marcadores moleculares para el diagnóstico y progresión del CCR.

En cuanto a los marcadores de ERC, se encontró un aumento en la expresión de Hsp72 en TN en comparación con TC, la cual está asociada a la respuesta inflamatoria, lo que sugiere estar participando en la prevención de la ERC. De manera interesante, también se encontró una expresión localizada en el núcleo de esta proteína en las células tumorales, sugiriendo una participación diferente en el CCR.

La proteína KIM-1 se encontró en TC y se relacionó a una disminución en la TFGe, como ya se ha reportado anteriormente. También se encontró una asociación con el CCR, algo que recientemente se ha reportado, sin embargo, es necesario aumentar el número de muestras para obtener mayores conclusiones del estudio.

La proteína TGF- β mostró una asociación en el aumento de expresión con la disminución de la TFG α como se ha reportado anteriormente. Además, esta proteína mostró una tendencia a aumentar en los tejidos tumorales (TC) que presentaban un mayor grado de fibrosis. Estos resultados sugieren que, en conjunto, la fibrosis, el análisis de la TFG α , la determinación de KIM-1 y TGF- β pueden ser un panel de marcadores para el diagnóstico y pronóstico de la ERC.

Los marcadores mencionados anteriormente, sugieren tener un papel importante en el desarrollo de la ERC y de manera interesante, podrían participar en el CCR, al mantener una expresión significativa en TC. En este sentido, este estudio representa un primer acercamiento para el establecimiento de un panel de marcadores moleculares para el diagnóstico y progresión de la ERC. Iniciando con la determinación de la fibrosis y los marcadores moleculares al momento del diagnóstico del cáncer y con un seguimiento como perspectiva del estudio a 3, 6 y 12 meses para determinar la progresión a ERC y mantener un tratamiento integral del paciente oncológico teniendo como meta llegar a la medicina de precisión.

XIII. Referencias Bibliográficas

1. Hsieh, J. J. *et al.* Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 1–19 (2017).
2. Cairns, P. Renal Cell Carcinoma. *Cancer Biomarkers* **9**, 461–473 (2011).
3. Farber, N. J. *et al.* Renal cell carcinoma: The search for a reliable biomarker. *Transl Cancer Res* **6**, 620–632 (2017).
4. Escudier, B. *et al.* Renal cell carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* **27**, v58–v68 (2016).
5. Latif, F. *et al.* Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science (1979)* **260**, 1317–1320 (1993).
6. Gnarr, J. R. *et al.* Mutations of the VHL tumor suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* **7**, 85–90 (1994).
7. Iwai, K. *et al.* Identification of the von Hippel – Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12436–12441 (1999).
8. Wiesener, M. S. *et al.* Constitutive Activation of Hypoxia-inducible Genes Related to Overexpression of Hypoxia-inducible Factor-1 in Clear Cell Renal Carcinomas. *Cancer Res* **61**, 5215–5222 (2001).
9. Chen, F. *et al.* Germline mutations in the von Hippel–Lindau disease tumor suppressor gene: Correlations with phenotype. *Hum Mutat* **5**, 66–75 (1995).
10. Kim, E. & Zschiedrich, S. Renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease-From tumor genetics to novel therapeutic strategies. *Frontiers in Pediatrics* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00016> (2018).
11. Cowey, C. L. & Rathmell, W. K. VHL gene mutations in renal cell carcinoma: Role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy. *Curr Oncol Rep* **11**, 94–101 (2009).
12. Chow, W.-H., Dong, L. M. & Devesa, S. S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol* **7**, 245–257 (2010).
13. Hunt, J. D., Hel, O. L. van der, Mcmillan, G. P., Boffetta, P. & Brennan, P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking : Meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer* **114**, 101–108 (2004).
14. Sharifi, N. & Farrar, W. L. Perturbations in hypoxia detection: A shared link between hereditary and sporadic tumor formation? *Med Hypotheses* **66**, 732–735 (2006).
15. Calle, E. E. & Kaaks, R. Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* **4**, 579–591 (2004).
16. Vatten, L. J., Trichopoulos, D., Holmen, J. & Nilsen, T. I. L. Blood pressure and renal cancer risk : the HUNT Study in Norway. *Br J Cancer* **97**, 112–114 (2007).

17. Chow, W.-H., Gridley, G., Fraumeni, J. F. & Järholm, B. Obesity , Hypertension , and the Risk of Kidney Cancer in Men. *N Engl J Med* **343**, 1305–1311 (2000).
18. Nicodemus, K. K., Sweeny, C. & Folsom, A. P. EVALUATION OF DIETARY, MEDICAL AND LIFESTYLE RISK FACTORS FOR INCIDENT KIDNEY CANCER IN POSTMENOPAUSAL WOMEN. *Int J Cancer* **108**, 115–121 (2004).
19. Setiawan, V. W., Stram, D. O., Nomura, A. M. Y., Kolonel, L. N. & Henderson, B. E. Risk Factors for Renal Cell Cancer : The Multiethnic Cohort. *Am J Epidemiol* **166**, 932–940 (2007).
20. Klatte, T. *et al.* Features and outcomes of renal cell carcinoma of native kidneys in renal transplant recipients. *BJU Int* **105**, 1260–1265 (2009).
21. Moore, S. C. *et al.* Physical Activity during Adulthood and Adolescence in Relation to Renal Cell Cancer. *Amer* **168**, 149–157 (2008).
22. Solomon, T. P. J. *et al.* Randomized trial on the effects of a 7-d low-glycemic diet and exercise intervention on insulin resistance in older obese humans 1 – 3. *Am J Clin Nutr* **90**, 1222–1229 (2009).
23. Lee, J. E. *et al.* Intakes of Fruits , Vegetables , Vitamins A , C , and E , and Carotenoids and Risk of Renal Cell Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **15**, 2445–2452 (2006).
24. Lonsler, R. R. *et al.* von Hippel-Lindau disease. *The Lancet* **361**, 2059–2067 (2003).
25. Barrisford, G. W., Singer, E. A., Rosner, I. L., Linehan, W. M. & Bratslavsky, G. Familial Renal Cancer: Molecular Genetics and Surgical Management. *Int J Surg Oncol* 1–11 (2011) doi:10.1155/2011/658767.
26. Strimbu, K. & Tavel, J. A. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* **5**, 463–466 (2010).
27. Modi, P. K., Farber, N. J. & Singer, E. A. Precision oncology: Identifying predictive biomarkers for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Transl Cancer Res* **5**, S76–S80 (2016).
28. Finelli, A. *et al.* Management of small renal masses: American society of clinical oncology clinical practice guideline. *Journal of Clinical Oncology* **35**, 668–680 (2017).
29. Krajewski, K. M. & Shinagare, A. B. Novel imaging in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* **26**, 388–395 (2016).
30. Divgi, C. R. *et al.* Positron emission tomography/computed tomography identification of clear cell renal cell carcinoma: Results from the REDECT trial. *Journal of Clinical Oncology* **31**, 187–194 (2013).
31. Escudier, B. *et al.* Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 3312–3318 (2009).

32. Kaelin, W. G. *et al.* The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clinical Cancer Research* **10**, 23–29 (2004).
33. Li, X. *et al.* Expression levels of VEGF-C and VEGFR-3 in renal cell carcinoma and their association with lymph node metastasis. *Exp Ther Med* **21**, (2021).
34. Peña, C., Lathia, C., Shan, M., Escudier, B. & Bukowski, R. M. Biomarkers predicting outcome in patients with advanced renal cell carcinoma: Results from sorafenib phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *Clinical Cancer Research* **16**, 4853–4863 (2010).
35. Fitzgerald, J. P. *et al.* Nox4 mediates renal cell carcinoma cell invasion through hypoxia-induced interleukin 6- and 8- production. *PLoS One* **7**, 1–9 (2012).
36. Tran, H. T. *et al.* Prognostic or predictive plasma cytokines and angiogenic factors for patients treated with pazopanib for metastatic renal-cell cancer: A retrospective analysis of phase 2 and phase 3 trials. *Lancet Oncol* **13**, 827–837 (2012).
37. Morrissey, J. J. *et al.* Evaluation of Urine Aquaporin 1 and Perilipin 2 Concentrations as Biomarkers to Screen for Renal Cell Carcinoma. *JAMA Oncol* **1**, 204–212 (2015).
38. Gatto, F., Maruzzo, M., Magro, C., Basso, U. & Nielsen, J. Prognostic value of plasma and urine glycosaminoglycan scores in clear cell renal cell carcinoma. *Front Oncol* **6**, 1–9 (2016).
39. Ball, M. W. *et al.* Circulating Tumor DNA as a Marker of Therapeutic Response in Patients With Renal Cell Carcinoma: A Pilot Study. *Clin Genitourin Cancer* **14**, 515–520 (2016).
40. Shen, S. S., Truong, L. D., Scarpelli, M. & Lopez-Beltran, A. Role of immunohistochemistry in diagnosing renal neoplasms when is it really useful? *Arch Pathol Lab Med* **136**, 410–417 (2012).
41. Tan, P. H. *et al.* Renal Tumors: Diagnostic and Prognostic Biomarkers. *Am J Surg Pathol* **37**, 1518–1531 (2013).
42. Kryvenko, O. N., Jorda, M., Argani, P. & Epstein, J. I. Diagnostic Approach to Eosinophilic Renal Neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* **138**, 1531–1541 (2014).
43. George, S. & Bukowski, R. M. Biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* **7**, 1737–1747 (2007).
44. Tickoo, S. K. *et al.* Immunohistochemical Expression of Hypoxia Inducible Factor-1 α and its Downstream Molecules in Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma. *Journal of Urology* vol. 177 1258–1263 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.11.100> (2007).
45. Meloni-Ehrig, A. M. Renal cancer: Cytogenetic and molecular genetic aspects. *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics* **115**, 164–172 (2002).
46. Jones, J. *et al.* Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clinical Cancer Research* **11**, 5730–5739 (2005).

47. Rosner, M. H., Jhaveri, K. D., McMahon, B. A. & Perazella, M. A. Onconephrology: The intersections between the kidney and cancer. *CA Cancer J Clin* **71**, 47–77 (2021).
48. Rodríguez Jasso VH, Serrano Brambila E, M. A. E. Factores pronósticos en cáncer renal localizado y localmente avanzado. *Actas Urol Esp* **32**, 320–324 (2008).
49. Nabi, S., Kessler, E. R., Bernard, B., Flaig, T. W. & Lam, E. T. Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *F1000Res* **7**, 307 (2018).
50. López-Garibay, L. A. *et al.* Función renal a largo plazo en pacientes con cáncer de células renales tratados quirúrgicamente: Comparación entre nefrectomía radical y parcial. *Revista de Investigacion Clinica* **65**, 7–11 (2013).
51. Lowrance, W., Ordoñez, J., Udaltsova, N., Russo, P. & Go, A. CKD and the risk of incident cancer. *Journal of American Society of Nephrology* **25** (10), 2327–34 (2014).
52. Hofman, J. N. & Purdue, M. P. CKD and Risk of Renal Cell Carcinoma: A Causal Association? *Journal of American Society of Nephrology* **25** (10), 2147–2148 (2014).
53. Weng, P. H. *et al.* Cancer-specific mortality in chronic kidney disease: Longitudinal follow-up of a large cohort. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **6**, 1121–1128 (2011).
54. Launay-Vacher, V. Epidemiology of chronic kidney disease in cancer patients: Lessons from the IRMA study group. *Semin Nephrol* **30**, 548–556 (2010).
55. Patel, H. D. *et al.* Comorbidities and causes of death in the management of localized T1a kidney cancer. *International Journal of Urology* **21**, 1086–1092 (2014).
56. Salahudeen, A. K. & Bonventre, J. v. Onconephrology: The latest frontier in the war against kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **24**, 26–30 (2013).
57. Cosmai, L., Porta, C. & Gallieni, M. Chapter 13 : CKD as a Complication of Cancer. *American Society of Nephrology, Onco-Nephrology Curriculum* 1–6 (2016).
58. Rysz, J., Gluba-Brzózka, A., Franczyk, B., Jablonowski, Z. & Cialkowska-Rysz, A. Novel biomarkers in the diagnosis of chronic kidney disease and the prediction of its outcome. *Int J Mol Sci* **18**, (2017).
59. Viau, A. *et al.* Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 4065–4076 (2010).
60. Khan, Z. & Pandey, M. Role of kidney biomarkers of chronic kidney disease: An update. *Saudi J Biol Sci* **21**, 294–299 (2014).
61. Couser, W., Remuzzi, G., Mendis, S. & Tonelli, M. The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney Int* **80** (12), 1258–70 (2011).

62. Tamayo-Orozco, J. A. & Lastiri-Quirós, H. S. La enfermedad renal crónica en México HACIA UNA POLÍTICA NACIONAL PARA ENFRENTARLA. *Academia Nacional de Medicina de México* (2016).
63. Schieppati, A. & Remuzzi, G. Chronic renal diseases as a public health problem: Epidemiology, social, and economic implications. *Kidney Int Suppl* **68**, 7–10 (2005).
64. Méndez-Durán, A. *et al.* Estado actual de las terapias sustitutivas de la función renal en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* **54**, 588–93 (2016).
65. Hostetter, T. Progression of Renal Disease and Renal Hypertrophy. *Annu Rev Physiol* **57**, 263–78 (1995).
66. Quaggin, S. E. & Kreidberg, J. A. Development of the renal glomerulus: Good neighbors and good fences. *Development* **135**, 609–620 (2008).
67. Boffa, J.-J. & Cartery, C. Insuficiencia renal crónica o enfermedad renal crónica. *EMC - Tratado de Medicina* **19**, 1–8 (2015).
68. Kazancıoğlu, R. Risk factors for chronic kidney disease: An update. *Kidney Int Suppl (2011)* **3**, 368–371 (2013).
69. Köttgen, A. *et al.* Multiple Novel Loci are Associated with Indices of Renal Function and Chronic Kidney Disease. *Nat Genet* **41**, 712–717 (2009).
70. Pollak, M. R., Genovese, G. & Friedman, D. J. APOL1 and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **21**, 179–182 (2012).
71. Su, S. L. *et al.* Gene polymorphisms of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II Type I receptor among chronic kidney disease patients in a Chinese population. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **13**, 148–154 (2012).
72. Iseki, K. Factors influencing the development of end-stage renal disease. *Clin Exp Nephrol* **9**, 5–14 (2005).
73. Chang, A. & Kramer, H. CKD progression: A risky business. *Nephrology Dialysis Transplantation* **27**, 2607–2609 (2012).
74. Ejerblad, E. *et al.* Obesity and risk for chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* **17**, 1695–1702 (2006).
75. Mirrakhimov, A. E. Obstructive sleep apnea and kidney disease: Is there any direct link? *Sleep and Breathing* **16**, 1009–1016 (2012).
76. Falodia, J. & Singla, M. K. CKD epidemiology and risk factors. *Clinical Queries Nephrology* **1**, 9–12 (2012).
77. McClellan, W. M. & Flanders, W. D. Risk factors for progressive chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **14**, 65–70 (2003).
78. Lea, J. P. & Nicholas, S. B. Diabetes mellitus and hypertension: key risk factors for kidney disease. *J Natl Med Assoc* **94**, (2002).

79. Genovese, F., Manresa, A. A., Leeming, D. J., Karsdal, M. A. & Boor, P. The extracellular matrix in the kidney: A source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Repair* **7**, 1–14 (2014).
80. Barnes, J. L. & Glass, W. F. Renal interstitial fibrosis: A critical evaluation of the origin of myofibroblasts. *Contrib Nephrol* **169**, 73–93 (2011).
81. Chandler, C., Liu, T., Buckanovich, R. & Coffman, L. G. The double edge sword of fibrosis in cancer. *Translational Research* **209**, 55–67 (2019).
82. Efstratiadis, G., Divani, M., Katsioulis, E. & Vergoulas, G. Renal fibrosis. *Hippokratia* **13**, 224–228 (2009).
83. Farris, A. B. & Colvin, R. B. Renal interstitial fibrosis: Mechanisms and evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **21**, 289–300 (2012).
84. Goldsmith, D., Jayawardene, S. & Ackland, P. *ABC of Kidney Disease*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2013).
85. Bonventre, J. v, Vaidya, V. S., Schmouder, R., Feig, P. & Dieterle, F. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat Biotechnol* **28**, 436–440 (2010).
86. Cernaro, V. *et al.* Fibrosis, regeneration and cancer: What is the link? *Nephrology Dialysis Transplantation* **27**, 21–27 (2012).
87. Strutz, F. *et al.* Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *Journal of Cell Biology* **130**, 393–405 (1995).
88. Rastaldi, M. P. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int* **62**, 137–146 (2002).
89. Falanga, V., Zhou, L. & Yufit, T. Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF- β 1. *Journal of Cellular Physiology* vol. 191 42–50 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jcp.10065> (2002).
90. Wolf, G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor- β pathway. *Kidney Int* **70**, 1914–1919 (2006).
91. Mezzano, S. A., Ruiz-Ortega, M. & Egidio, J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* **38**, 635–638 (2001).
92. Khurana, R. *et al.* Identification of urinary exosomal noncoding RNAs as novel biomarkers in chronic kidney disease. *Rna* **23**, 142–152 (2017).
93. Gentile, G. & Remuzzi, G. Novel Biomarkers for Renal Diseases? None for the Moment (but One). *J Biomol Screen* **21**, 655–670 (2016).
94. Säemann, M. D., Weichhart, T., Hörl, W. H. & Zlabinger, G. J. Tamm-Horsfall protein: A multilayered defence molecule against urinary tract infection. *European Journal of Clinical Investigation* vol. 35 227–235 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2005.01483.x> (2005).

95. Andriole, V. T. Role of Tamm-Horsfall protein in the pathogenesis of reflux nephropathy and chronic pyelonephritis. *Eur J Clin Microbiol* **58**, 91–100 (1985).
96. Hess, B. Tamm–Horsfall glycoprotein and calcium nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* **30**, 393–398 (1994).
97. El-Achkar, T. M. & Wu, X.-R. Uromodulin in Kidney Injury: An Instigator, Bystander, or Protector? *The American Journal of Kidney Disease* **59**, 452–461 (2012).
98. Humphreys, B. *et al.* Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* **123**, 4023–4035 (2013).
99. Sayanthooran, S., Magana-Arachchi, D. N., Gunerathne, L. & Abeysekera, T. Potential diagnostic biomarkers for chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu) in Sri Lanka: a pilot study. *BMC Nephrol* **18**, 1–12 (2017).
100. de Silva, P. M. C. S. *et al.* Urinary Biomarkers KIM-1 and NGAL for Detection of Chronic Kidney Disease of Uncertain Etiology (CKDu) among Agricultural Communities in Sri Lanka. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, 1–17 (2016).
101. Yang, J. *et al.* An epithelial precursor is regulated by the ureteric bud and by the renal stroma. *Dev Biol* **246**, 296–310 (2002).
102. Yang, J. *et al.* An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin iron to many tissues, including epithelia. Hypotransferri. *Mol Cell* **10**, 1045–1056 (2002).
103. Kuncio, G. S., Neilson, E. G. & Haverty, T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* **39**, 550–556 (1991).
104. Devarajan, P. The Use of Targeted Biomarkers for Chronic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis* **17**, 469–479 (2010).
105. Nakagawa, S. *et al.* Molecular markers of tubulointerstitial fibrosis and tubular cell damage in patients with chronic kidney disease. *PLoS One* **10**, 1–14 (2015).
106. Portilla, D. *et al.* Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* **73**, 465–472 (2008).
107. Kamijo-Ikemori, A. *et al.* Liver-type fatty acid-binding protein attenuates renal injury induced by unilateral ureteral obstruction. *American Journal of Pathology* **169**, 1107–1117 (2006).
108. Barrera-Chimal, J. *et al.* Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Mol Med* **3**, 5–20 (2011).
109. Vidyasagar, A., Wilson, N. A. & Djamali, A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, 1 (2012).
110. Vallés, P. *et al.* Heat shock proteins HSP27 and HSP70 in unilateral obstructed kidneys. *Pediatric Nephrology* **18**, 527–535 (2003).

111. Launay-Vacher, V. *et al.* Prevalence of renal insufficiency in cancer patients and implications for anticancer drug management: The renal insufficiency and anticancer medications (IRMA) study. *Cancer* **110**, 1376–1384 (2007).
112. Porta, C., Cosmai, L., Gallieni, M., Pedrazzoli, P. & Malberti, F. Renal effects of targeted anticancer therapies. *Nat Rev Nephrol* **11**, 354–370 (2015).
113. García-Salcido, F. J. *et al.* Insuficiencia renal crónica en pacientes nefrectomizados por cáncer renal, frecuencia y factores asociados. *Rev Mex Urol* **72**, 3–7 (2012).
114. Desmoulière, A., Guyot, C. & Gabbiani, G. The stroma reaction myofibroblast: A key player in the control of tumor cell behavior. *International Journal of Developmental Biology* **48**, 509–517 (2004).
115. Nieto, M. A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: Old views and new perspectives. *International Journal of Developmental Biology* **53**, 1541–1547 (2009).
116. Boutet, A. *et al.* Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO Journal* **25**, 5603–5613 (2006).
117. Li, J., Zhu, H., Chen, T., Dai, G. & Zou, L. TGF- β 1 and BRCA2 Expression are Associated with Clinical Factors in Breast Cancer. *Cell Biochemistry and Biophysics* vol. 60 245–248 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12013-010-9146-4> (2011).
118. Sánchez Alvarado, A. Regeneration in the metazoans: Why does it happen? *BioEssays* **22**, 578–590 (2000).
119. D’Avella, C., Abbosh, P., Pal, S. K. & Geynisman, D. M. Mutations in renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* **38**, 763–773 (2020).
120. Kriz, W., Kaissling, B. & le Hir, M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: Fact or fantasy? *Journal of Clinical Investigation* **121**, 468–474 (2011).
121. Farris, A. B. & Alpers, C. E. What is the best way to measure renal fibrosis: A pathologist’s perspective. *Kidney Int Suppl (2011)* **4**, 9–15 (2014).
122. Bellaye, P. S., Burgy, O., Causse, S., Garrido, C. & Bonniaud, P. Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: Good or evil? *Pharmacol Ther* **143**, 119–132 (2014).
123. Bleu, M. *et al.* PAX8 activates metabolic genes via enhancer elements in Renal Cell Carcinoma. *Nat Commun* **10**, (2019).
124. Barr, M. L. *et al.* PAX-8 expression in renal tumours and distant sites: A useful marker of primary and metastatic renal cell carcinoma? *J Clin Pathol* **68**, 12–17 (2015).
125. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF α targeted for VHL mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science (1979)* **292**, 464–8 (2001).

126. Schödel, J. *et al.* Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factors, and renal cancer. *European Urology* vol. 69 646–657 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.08.007> (2016).
127. Carpenter, R. L. & Gökmen-Pola, Y. HSF1 as a Cancer Biomarker and Therapeutic Target. *Curr Cancer Drug Targets* **19**, 515–524 (2019).
128. Ciocca, D. R., Arrigo, A. P. & Calderwood, S. K. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: An update. *Arch Toxicol* **87**, 19–48 (2013).
129. Neckers, L. Heat shock protein 90: The cancer chaperone. *J Biosci* **32**, 517–530 (2007).
130. Miyata, Y., Nakamoto, H. & Neckers, L. The Therapeutic Target Hsp90 and Cancer Hallmarks. *Curr Pharm Des* **5**, 347–365 (2013).
131. Zuehlke, A. D., Moses, M. A. & Neckers, L. Heat shock protein 90: Its inhibition and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 373 Preprint at <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0527> (2018).
132. Zuehlke, A. D., Beebe, K., Neckers, L. & Prince, T. Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. *Gene* **570**, 8–16 (2015).
133. Coskunpinar, E. *et al.* The significance of HSP90AA1, HSP90AB1 and HSP90B1 gene polymorphisms in a Turkish population with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* **34**, 753–758 (2014).
134. Haase, M. & Fitze, G. HSP90AB1: Helping the good and the bad. *Gene* **575**, 171–186 (2016).
135. Radli, M. & Rüdiger, S. G. D. Dancing with the Diva: Hsp90–Client Interactions. *J Mol Biol* **430**, 3029–3040 (2018).
136. Biaoxue, R. *et al.* Upregulation of Hsp90-beta and annexin A1 correlates with poor survival and lymphatic metastasis in lung cancer patients. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **31**, 1–14 (2012).
137. Sreedhar, A. S., Kalmár, É., Csermely, P. & Shen, Y. F. Hsp90 isoforms: Functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* **562**, 11–15 (2004).
138. Eustace, B. K. *et al.* Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 α in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol* **6**, 507–514 (2004).
139. Sanchez, J. *et al.* Old and New Approaches to Target the Hsp90 Chaperone. *Curr Cancer Drug Targets* **20**, 253–270 (2020).
140. Li, W. *et al.* Extracellular Hsp90 (eHsp90) as the Actual Target in Clinical Trials. *Int Rev Cell Mol Biol* **303**, 203–235 (2013).
141. Wei, W. *et al.* Diagnostic value of plasma HSP90 α levels for detection of hepatocellular carcinoma. 1–9 (2020).
142. Picard, D. The Hsp90 Chaperone machine database. www.picard.ch/Hsp90Int/ (2022).

143. Boysen, M., Kityk, R. & Mayer, M. P. Hsp70- and Hsp90-Mediated Regulation of the Conformation of p53 DNA Binding Domain and p53 Cancer Variants. *Mol Cell* **74**, 831-843.e4 (2019).
144. Marzec, L. *et al.* Expression of Hsp72 protein in chronic kidney disease patients. *Scand J Urol Nephrol* **43**, 400–408 (2009).
145. Musial, K. & Zwolińska, D. Heat shock proteins in chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology* vol. 26 1031–1037 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00467-010-1709-5> (2011).
146. Schulz, C. A. *et al.* Plasma kidney injury molecule-1 (p-KIM-1) levels and deterioration of kidney function over 16 years. *Nephrology Dialysis Transplantation* **35**, 265–273 (2020).
147. Song, J. *et al.* Understanding kidney injury molecule 1: a novel immune factor in kidney pathophysiology. *Am J Transl Res* vol. 11 www.ajtr.org/ISSN:1943-8141/AJTR0088409 (2019).
148. Kushlinskii, N. E. *et al.* Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) in Blood Plasma of Patients with Clear-Cell Carcinoma. *Bull Exp Biol Med* **167**, 388–392 (2019).
149. Scelo, G. *et al.* KIM-1 as a blood-based marker for early detection of kidney cancer: A prospective nested case–control study. *Clinical Cancer Research* **24**, 5594–5601 (2018).
150. Lee, J. C. *et al.* Kidney injury molecule-1 inhibits metastasis of renal cell carcinoma. *Sci Rep* **11**, (2021).
151. Sabbisetti, V. S. *et al.* Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type I diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology* **25**, 2177–2186 (2014).
152. Kubiczikova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R. & Sevcikova, S. TGF- β - an excellent servant but a bad master. *Journal of Translational Medicine* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-183> (2012).
153. Chaudhury, A. & Howe, P. H. The tale of transforming growth factor-beta (TGF β) signaling: A soigné enigma. *IUBMB Life* **61**, 929–939 (2009).
154. Schnaper, H. W. *et al.* TGF-beta signal transduction in chronic kidney disease.
155. Sureshbabu, A., Muhsin, S. A. & Choi, M. E. TGF-signaling in the kidney: profibrotic and protective effects Sureshbabu A, Muhsin SA, Choi ME. TGF-signaling in the kidney: profibrotic and protective effects. *Am J Physiol Renal Physiol* **310**, 596–606 (2016).
156. López-Hernández, F. J. & López-Novoa, J. M. Role of TGF- β in chronic kidney disease: An integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell and Tissue Research* vol. 347 141–154 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1275-6> (2012).
157. Uehara, Y. *et al.* Immunohistochemical Expression of TGF- β 1 in Kidneys of Cats with Chronic Kidney Disease. *Vet Sci* **9**, (2022).

158. Tomcik, M. *et al.* Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition targets canonical TGF- β signalling to prevent fibrosis. *Ann Rheum Dis* **73**, 1215–1222 (2014).
159. Chen, W. *et al.* Transcriptomic analysis reveals that heat shock protein 90 α is a potential diagnostic and prognostic biomarker for cancer. *European Journal of Cancer Prevention* **1** (2019) doi:10.1097/cej.0000000000000549.

XIV. Apéndice

Anticuerpo	#Cat	IHC	Western Blot
HSF1	sc-17756	1:100	N/A
VHL	556347	1:500	N/A
VEGF	aBS82	1:3000	N/A
PAX8	ab191870	1:500	N/A
HIF-1α	ab51608	1:200	N/A
Hsp90α	sc-515081	1:500	N/A
Hsp90β	ab32568	1:20000	N/A
Hsp72	HSP01	1:500	N/A
Hsp27	MAB88051	1:20000	N/A
KIM-1	sc-166785	N/A	1:50
NGAL	sc-518095	N/A	1:50
TGF-β	sc-130348	N/A	1:50
GAPDH		N/A	1:2000
Goat vs Rabbit		N/A	1:10000
Rabbit vs Mouse		N/A	1:10000

Apéndice 1. Anticuerpos utilizados para Inmunohistoquímica y Western Blot. Se muestra el número de catálogo de los anticuerpos, así como las diluciones utilizadas en las técnicas mencionadas anteriormente. N/A: No Aplica.

Apéndice 2. Imágenes representativas de los controles negativos (sin anticuerpo primario) de las Inmunohistoquímicas

