



ARTÍCULO ORIGINAL

Expresión inmunohistoquímica de la densidad microvascular y de la anhidrasa carbónica IX en carcinoma renal. Relación con el tipo histológico y con la progresión tumoral

J. Rubio-Briones^{a,*}, A. Calatrava^b, A. Fernández-Serra^c, R. Ramos Ruiz^d, I. Iborra^a, Z. García-Casado^c, L. Rubio^c, M. Trassierra^a, A. Collado^a, J. Casanova^a, A. Gómez-Ferrer^a, E. Solsona^a y J.A. López-Guerrero^c

^a Servicio de Urología, Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, España

^b Servicio de Anatomía Patológica, Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, España

^c Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, España

^d Unidad de Genómica, Parque Científico, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

Recibido el 13 de agosto de 2010; aceptado el 10 de octubre de 2010

Accesible en línea el 21 de enero de 2011

PALABRAS CLAVE

Anhidrasa carbónica IX;
Carcinoma renal;
Inmunohistoquímica;
Densidad microvascular;
Predicción;
Pronóstico

Resumen

Objetivos: relacionar la expresión inmunohistoquímica (IHQ) de la densidad microvascular (DMV) y de la anhidrasa carbónica IX (ACIX) con los tipos histológicos de carcinoma renal (CR) y con su progresión.

Material y métodos: se estudiaron 93 pacientes operados por CR entre 1990-2008. Anticuerpos: CD31 (1: 40, Dako) y CD34 (1: 50, Dako) para DMV y ACIX (1: 100, Santa Cruz). ACIX se valoró semicuantitativamente; intensamente positivos (>85%), débilmente positivos (10-85%) y negativos (< 10%), independientemente de la intensidad de la tinción. La DMV se valoró independientemente con anti-CD31 y anti-CD34. Campo de bajo aumento (x100) con mayor densidad de vasos teñidos; se contabilizó el número de vasos en un campo fotográfico de 0,53 mm². Resultados expresados como número máximo de vasos/ mm² de tejido tumoral.

Resultados: mediana seguimiento; 40 meses (1-160). No encontramos diferencias IHQ para ninguno de los 3 marcadores entre tumores que progresan (49) y no progresan (44). La expresión de ACIX estaba relacionada con la DMV ($p < 0,0001$). La DMV se relacionó inversamente con el tamaño tumoral y con el grado de Fuhrman de forma significativa. Así mismo, fue significativamente mayor en los CR de células claras, tanto medida con CD31 ($p = 0,001$) como con CD34 ($p = 0,003$) frente al resto de subtipos histológicos.

Conclusiones: la DMV y la expresión de ACIX no se relacionan con la progresión, pero sí con el tipo tumoral. Ello y su coexpresividad permitiría usar la expresión de ACIX como medida orientativa rápida y fácil para medir DMV y su posible relación con la respuesta a antiangiogénicos.

© 2010 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para la correspondencia.

Correo electrónico: jrubio@fivo.org (J. Rubio-Briones).

KEYWORDS

Carbonic anhydrase IX;
Immunohistochemistry;
Microvascular density;
Prediction;
Prognostic;
Renal cell carcinoma

Immunohistochemical expression of microvascular density and carbonic anhydrase IX in renal carcinoma. Relation to histological type and tumoral progression

Abstract

Purpose: to correlate the immunohistochemical expression of microvascular density (MVD) and the carbonic anhydrase IX (CAIX) with the different histological subtypes of renal carcinoma and its progression.

Material and methods: we studied 93 patients with renal cell carcinoma operated between 1990 and 2008. Antibodies employed for immunohistochemistry (IHC); CD31 (1: 40, Dako) and CD34 (1: 50, Dako) for MVD and CAIX (1: 100, Santa Cruz). CAIX was validated semiquantitatively as: strongly positive (>85%); weakly positive (10% -85%); and negative (< 10%), independently of the intensity of the stain. MVD was validated with both anti-CD31 and anti-CD34 by means of a whole section, to select the microscopic field (x100) with highest density of stained vessels, counting the number of vessels in a photographic field of 0.53 mm². Results are expressed as the maximal number of vessels by mm² of tumour tissue.

Results: median follow up was 40 months (1-160). We found no differences of expression with any of the 3 IHC markers between tumours that progressed (49) and tumours that did not progress (44). The IHC expression of CAIX was strongly related to MVD, measured for both CD31 and CD34 ($p < 0.0001$). MVD with both antibodies was inversely related to tumour size and Fuhrman grade and was also stronger in clear cell carcinomas compared to the rest of histological subtypes, measured by CD31 ($p = 0.001$) and CD34 ($p = 0.003$).

Conclusions: neither MVD nor CAIX expressions were related to tumour progression, but were related to histological subtypes. This fact, added to their co-expression, could prompt the use of the CAIX expression, which is far more reproducible, as a quick and easy approximation to MVD. More research should be done to use it as marker for targeted therapy.

© 2010 AEU. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El carcinoma renal (CR) se caracteriza molecularmente por alta tasa de inactivación del gen supresor de tumores von Hippel-Lindau, lo que conlleva una acumulación del factor inducible por hipoxia y la consecuente expresión de distintos genes de respuesta a la hipoxia que activarán el proceso de angiogénesis, incluidos el gen de la anhidrasa carbónica IX (ACIX) y del factor de crecimiento endotelio-vascular. Las terapias diana han supuesto una revolución en su tratamiento durante la última década; en la actualidad, existen 5 fármacos con distintos mecanismos de acción aprobados para su indicación en primera o segunda línea, existiendo lagunas importantes en cuanto al tratamiento de cada tipo histológico, el tratamiento secuencial o concomitante, la neo y la adyuvancia con estos fármacos, etc. Múltiples grupos hemos buscado marcadores séricos, patológicos y moleculares que permitan optimizar cada tratamiento para cada paciente^{1,2}.

La angiogénesis se puede cuantificar en tumores sólidos mediante inmunohistoquímica (IHQ) en términos de densidad microvascular (DMV), definida como el número de vasos pequeños en una determinada área tumoral. En CR la relación de la DMV con el pronóstico es controvertida³, debido probablemente, entre otros, a problemas en la homogenización de los resultados de los distintos trabajos que siguen el método tradicional de conteo manual⁴, así como a los bajos tamaños de muestra utilizados, diferentes marcadores IHQ y a las propias limitaciones de la IHQ⁵.

ACIX es una enzima que pertenece a una familia de metaloenzimas que catalizan la conversión rápida de dióxido de

carbono y agua a bicarbonato y protones, y que regula el pH intra y extra celular durante el estrés hipóxico; su parte activa es extracelular y contribuye a la acidificación del medio extracelular. La acidificación de la matriz extracelular induce la expresión de factores pro-angiogénicos, promueve la inmunidad celular y la agresividad tumoral.

ACIX es un marcador muy interesante en el CR por varios motivos. En primer lugar como herramienta diagnóstica, dado que se expresa en el 86-96% de los tumores, siendo su expresión prácticamente nula en el tejido renal sano. Además tiene una expresión diferente en función del tipo histológico, siendo preferente en el de células claras y no expresándose en los oncocitomas⁶. En segundo lugar se ha empleado como herramienta pronóstica, puesto que se ha incluido en nomogramas predictivos de progresión⁷, aunque los resultados han sido controvertidos⁸⁻¹⁰. En tercer lugar, se ha propuesto como herramienta predictiva de respuesta al tratamiento, establecida para la interleuquina-2¹¹⁻¹³ y actualmente en investigación con las terapias diana¹⁴⁻¹⁶. Por último, tiene uso potencial como herramienta de estadificación. De hecho, dada la similitud del anticuerpo antiACIX con el anticuerpo monoclonal G250 (mAbG250), ha sido posible diagnosticar CR en pequeñas masas renales y focos metastáticos con alta especificidad y sensibilidad¹⁷. Consecuentemente, su posible valor terapéutico está actualmente en investigación en protocolos de radioinmunoterapia^{18,19}.

Nuestro objetivo es valorar la DMV, ACIX y la relación entre ambas en un grupo de carcinomas de riñón, y relacionarlas también con la progresión y los distintos tipos histológicos de la enfermedad.

Material y métodos

Pacientes

Tras aprobación por el Comité Ético del Instituto Valenciano de Oncología, revisamos retrospectivamente 100 pacientes operados por carcinoma renal entre 1990-2008 mediante nefrectomía radical, abierta o laparoscópica, con suficiente material parafinado y en buen estado para su estudio anatómopatológico. Se seleccionaron 50 pacientes que habían progresado mediante recidiva local, ganglionar y/o a distancia y 50 pacientes que no lo habían hecho en el momento del inicio del estudio.

Métodos inmunohistoquímicos

Se utilizaron en todos los casos tejido fijado en formol e incluido en parafina. Se revisaron los cortes teñidos con hematoxilina-eosina para confirmar el diagnóstico y seleccionar un bloque representativo de la zona periférica del tumor, donde la actividad proliferativa y la vascularización del mismo son mayores. Para las técnicas IHQ, los anticuerpos utilizados fueron CD31 (1: 40, Dako), CD34 (1: 50, Dako) y ACIX (1: 100, Santa Cruz).

En todos los casos se obtuvieron cortes de 4 micras sobre portaobjetos tratados con poli-lisina a partir de bloques de tejido fijado e incluido en parafina. Tras desparafinar el tejido, los cortes se sometieron a un proceso de desmascaramiento antigénico con calor y posteriormente de tinción, empleando los sistemas automatizados PTLINK Dako® y AutostainerPlus Dako® respectivamente.

ACIX fue valorada de forma semicuantitativa por un único patólogo especializado en uro-patología (AC) y que no disponía de los datos clínicos en el momento de la valoración, recogiendo el porcentaje de células tumorales con tinción de membrana. Siguiendo criterios descritos previamente en la literatura, y utilizados por multitud de investigadores de forma reproducible, los casos se clasificaron como intensamente positivos (> 85%), débilmente positivos (10 - 85%) y negativos (< 10%), independientemente de la intensidad de la tinción^{8,20}.

La densidad se valoró independientemente en los cortes teñidos con anti-CD31 y anti-CD34. En cada caso se estudió el corte completo para escoger el campo de bajo aumento (x100) con mayor densidad de vasos teñidos, se fotografió y se contabilizó el número de vasos en un campo fotográfico de 0,53 mm². Se consideraron vasos todas aquellas células o grupos celulares teñidos, sin capa muscular alrededor, que pudieran independizarse de otros vasos o estructuras adyacentes, aunque no tuvieran una luz vascular identificable. En los tumores en que la vascularización formaba una red densa, cada rama distinta se interpretó como

un vaso independiente. Los grandes sinusoides anastomóticos se contabilizaron como un vaso único. Los resultados se expresaron como número máximo de vasos por mm² de tejido tumoral²¹⁻²³.

Métodos estadísticos

Las comparaciones entre grupos fueron realizadas mediante Chi-cuadrado para variables categóricas (test de Fisher para tablas 2 x 2) y los tests de Kruskal-Wallis o la U de Mann-Whitney para comparar variables categóricas con variables continuas. En todos los estudios consideramos un valor de $p < 0,05$ (2-colas) como estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el software SPSS (versión 15.0.1, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Resultados

Seguimiento

Durante la realización de la serie, la técnica IHQ no se consideró informativa por distintos problemas técnicos en 7 casos, por lo que consideramos válidos para el estudio un total de 93 pacientes, 49 de los cuales habían progresado (53%) y 44 no lo habían hecho (47%). La mediana de seguimiento fue de 40 meses, con un rango de 1-160 meses.

Resultados de las técnicas inmunohistoquímicas

La DMV se valoró independientemente con ambos anticuerpos CD31 y CD34. Ambos tiñen membrana y citoplasma de las células endoteliales sin poder precisar su localización exacta (fig. 1). Por el contrario, la tinción con ACIX se localiza en la membrana y es claramente delimitable (fig. 2). No se observó tinción positiva en el tejido renal no tumoral.

Resultados patológicos

Se analizaron un total de 79 (85%) carcinomas renales de células claras, 8 (9%) cromóforos, 5 (5%) papilares y uno (1%) sarcomatoide. La DMV fue significativamente mayor en los CR de células claras, medida tanto con CD31 ($p = 0,001$) como con CD34 ($p = 0,003$) frente al resto de subtipos histológicos (fig. 3). Se relacionó de forma inversa con el grado tumoral medido tanto con CD31 ($p = 0,0005$) como CD34 ($p = 0,001$) agrupando las categorías de Fuhrman I-II vs III-IV. De la misma forma, también se objetivó una relación inversa entre el tamaño tumoral (≤ 7 cm vs > 7 cm) y la DMV medida con ambos anticuerpos (fig. 4).

La expresión de ACIX se encuentra fuertemente asociada con la expresión de la DMV, tanto si se mide con CD31 como

Tabla 1 Relación de la expresión positiva o negativa de anhidrasa carbónica IX con microdensidad vascular (MDV) medida con ambos anticuerpos (CD31, CD34) y expresada como número máximo de vasos por mm² de tejido tumoral

ACIX	MDV CD31/ mm ² (Dt)	Valor p	MDV CD34/ mm ² (Dt)	Valor p
Negativo	247,6 (169,9)	< 0,0001	197,4 (135,9)	< 0,0001
Positivo	521,6 (227,8)		433,3 (226,1)	

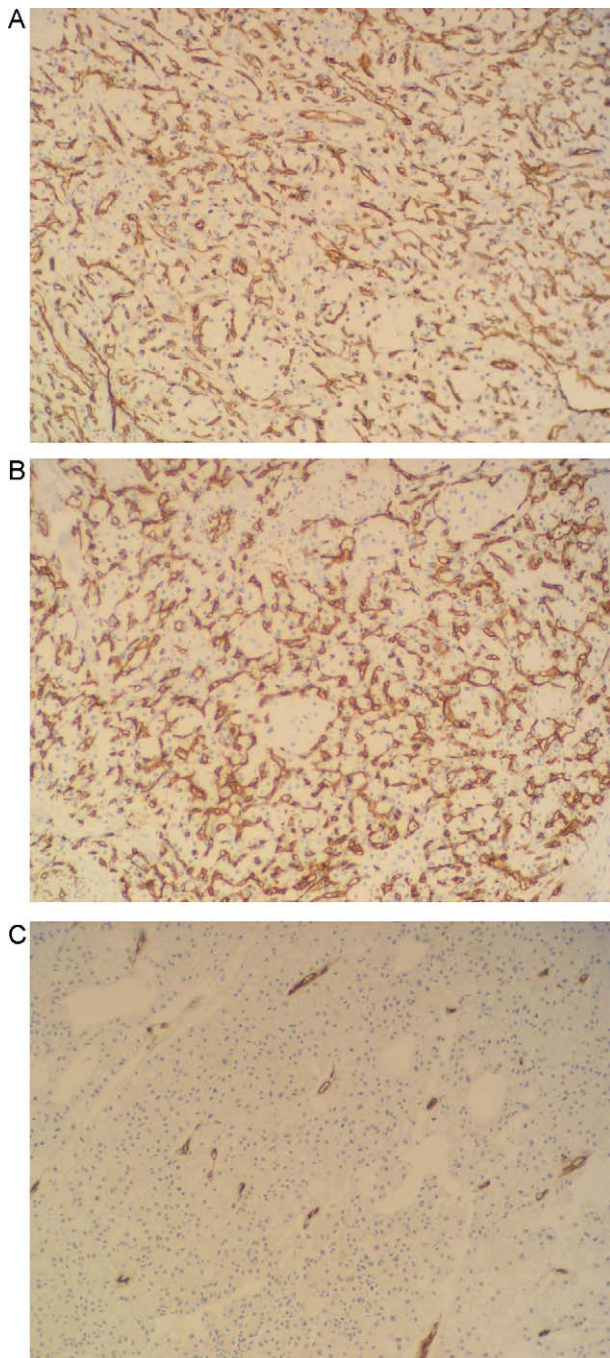


Figura 1 (A) CR de células claras, grado 2 de Fuhrman, CD31 (x100), MDV 977/ mm²; (B) CR de células claras, grado 2 de Fuhrman, CD34 (x100), MDV 883/ mm²; (C): CR cromóforo, CD31 (x100), MDV 49/ mm².

con CD34 ($p < 0,0001$) (tabla 1). Ninguna de las expresiones de los 3 anticuerpos utilizados se relacionó significativamente con la progresión tumoral; ni ACIX ($p = 0,771$) ni la DMV medida por CD31 ($p = 0,250$) o por CD34 ($p = 0,842$).

Discusión

La ausencia de marcadores séricos, patológicos o moleculares eficientes en el cáncer renal no ayuda a resolver las

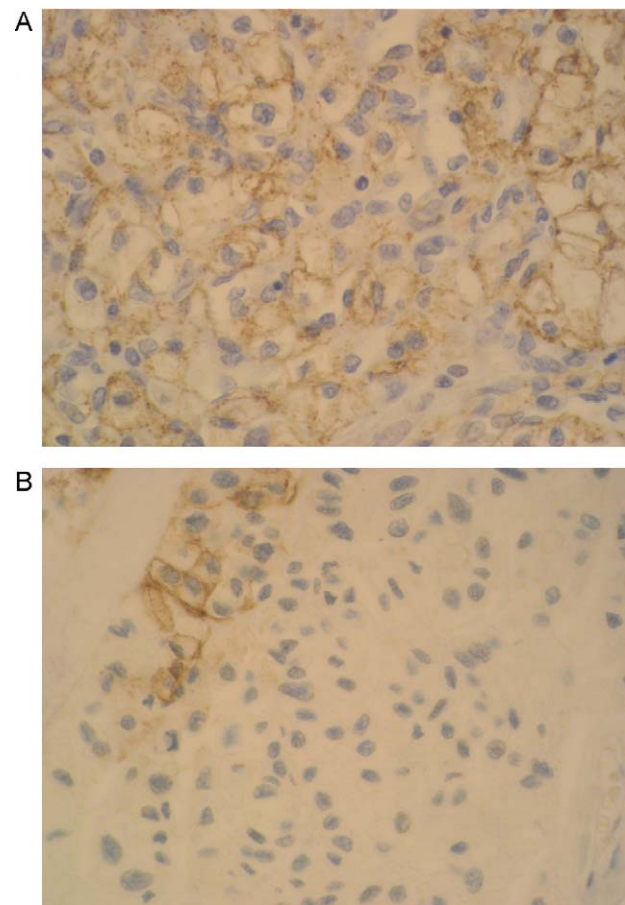


Figura 2 (A) CR de células claras, grado 2 de Fuhrman, ACIX (x100) intensamente positivo (tiñen 100% de las células); (B): CR cromóforo, ACIX (x100) negativo (tiñen 5% de las células).

controversias del nuevo panel terapéutico para esta neoplasia. En este sentido, sería lógico pensar que como terapias diana dirigidas contra la angiogénesis tumoral, la medición de la DMV debería ser un parámetro importante en el manejo de estos fármacos en el CR. Sin embargo, esta no es la realidad. Probablemente una de las causas por las cuales esto no ocurra la encontramos en su forma de valoración. La mayoría de autores, incluido nuestro trabajo, siguen el método descrito por Weidner et al⁴ basado en el recuento manual, y que, aunque ha permitido desarrollar este concepto en tumores sólidos, está sujeto a mucha variabilidad interobservador y se considera engorroso y tedioso por los patólogos, ratificando nosotros mismos que es difícilmente reproducible en la actividad rutinaria de un laboratorio de orientación asistencial. Estos problemas metodológicos se han sobrellevado mediante la aplicación de un sistema de análisis cuantitativo automatizado capaz de medir automáticamente variaciones en la expresión proteica en los tumores en *microarrays* tisulares o preparaciones estándar, añadiendo objetividad frente al método tradicional de valoración. Este sistema ha permitido introducir un nuevo concepto, el área de microvasos, que se relaciona de forma directa con un mejor pronóstico en dos estudios independientes de 284 casos³.

Nuestros resultados, que reflejan mayor DMV en los carcinomas de células claras, también han sido descritos por

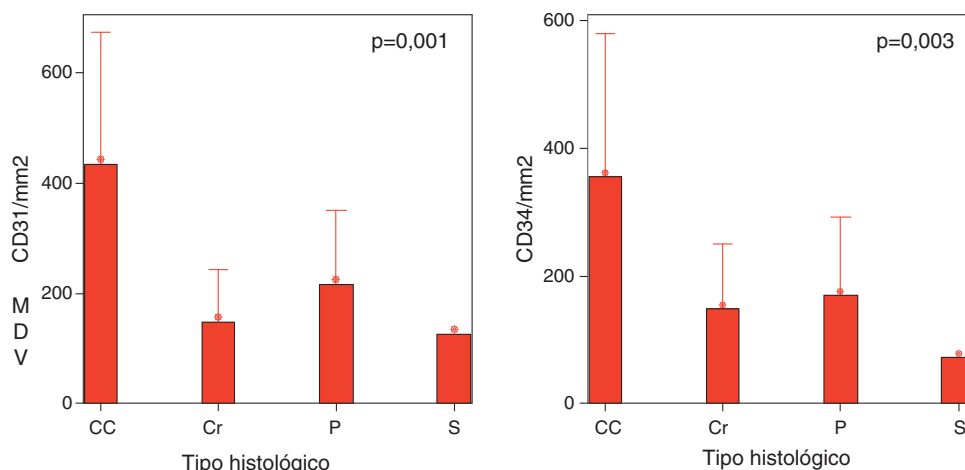


Figura 3 Expresión de MDV medida con el anticuerpo CD31 (gráfica izquierda) y con el anticuerpo CD34 (gráfica derecha) en los CR según el tipo histológico. CC: Células claras; Cr: Cromóforo; P: Papilar; S: Sarcomatoide.

otros autores²¹, así como su relación inversa con el diámetro tumoral^{23,24} y con el grado tumoral^{23,24}. No hemos observado ninguna relación entre la DMV y la progresión tumoral, coincidiendo con lo publicado por algunos autores^{21,22,25}, aunque no en otras series^{26,27}.

La contradicción de que un CR con baja DMV tenga peor pronóstico, a diferencia de lo que ocurre en otros tumores, ha generado diversas hipótesis. Entre ellas destaca la incapacidad de adaptación de la micro-vascularización a un crecimiento agresivo, dando paso al aumento de la permeabilidad vascular²⁸. Otra hipótesis se centra en el hecho de considerar que la DMV refleje buena diferenciación, dado que la neoplasia se origina en la cortical renal que se encuentra muy vascularizada²⁹. También se ha postulado que la formación de macrovasos por los tumores de rápido crecimiento condicione un descenso de la DMV²⁶.

En el caso de la ACIX, el punto de corte del 85% de células tumorales teñidas se estableció en una serie de 321 carcinomas mediante análisis de árbol de supervivencia⁸, y ha sido ratificado por otros autores que consideran esta IHQ fácilmente reproducible y comparable. La coexpresividad de la DMV y ACIX que encontramos en nuestro trabajo (tabla 1), sabiendo que ACIX es uno de los genes pro-angiogénicos sobreexpresados tras la activación del HIF-1, permite valorar esta molécula como un método rápido, fiable y reproducible

para evaluar la DMV. De hecho, en un estudio sobre 122 neoplasias renales, la coexpresión ACIX-VEGF se objetivó como factor pronóstico independiente en el análisis multivariado para supervivencia cáncer específica (RR: 2,353; IC 95%: 1,473-3,375, p=0,0002). Dicha coexpresión fue capaz de estratificar la supervivencia cáncer específica en 3 grupos de riesgo: alto, medio y bajo (p < 0,0001)³⁰.

Por lo tanto, a las posibilidades que se señalan para considerar la ACIX como una molécula de interés en el manejo del CR se añade el hecho de que refleja la DMV de una manera directa. En nuestros resultados sobre neoplasias renales no metastáticas no objetivamos que tenga ningún valor pronóstico, y lo mismo ha sido observado por otros autores^{8,9}. Ahora bien, en cánceres metastáticos sí parece tener valor pronóstico^{8,10}.

De la controversia respecto a su valor pronóstico se puede inducir que ACIX pueda tener más valor predictivo de respuesta al tratamiento que valor pronóstico en sí misma. Ello está claramente validado en tumores metastáticos tratados con IL-2¹¹⁻¹³. En relación con las terapias diana, la expresión de ACIX se ha validado como factor predictivo de respuesta a sorafenib¹⁶ y no se ha relacionado con la respuesta a temsirolimus, donde una expresión alta de fosfo-Akt o fosfo-S6, moléculas *upstream* y *downstream* de la ruta de señalización celular gobernada por mTOR, sí que se

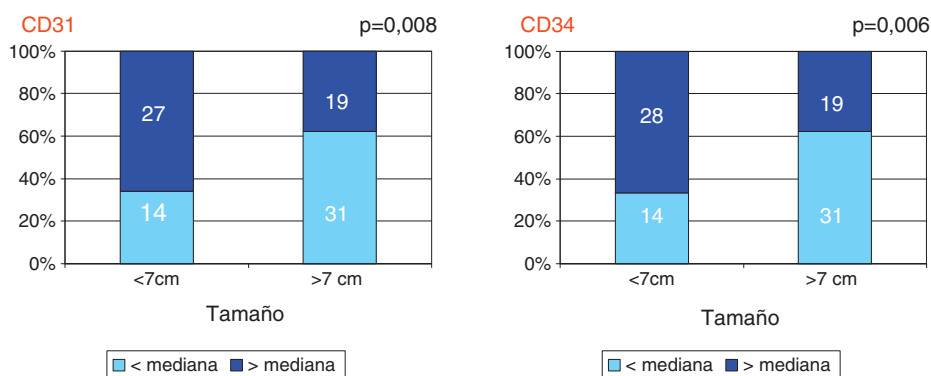


Figura 4 Relación de MDV medida con CD31 (gráfica izquierda) y con CD34 (gráfica derecha) en función de su expresión por encima o por debajo de su mediana con el tamaño tumoral, con punto de corte en 7 cm.

relacionaron lógicamente con la respuesta a este fármaco¹⁴. Un estudio en ratones atímicos con implantes de CR demostró que tras el tratamiento simultáneo con mAbG250 y distintos inhibidores de la tirosina quinasa, la captación de mAbG250 en los implantes tumorales, reflejo de la expresión de ACIX, disminuyó de forma paralela a distintos marcadores de DMV. Tras parar el tratamiento, la expresión de ACIX volvía a aumentar, sobre todo en la zona periférica de los tumores donde la neovascularización era más visible¹⁵.

Cabe la posibilidad de que en un futuro cercano ACIX se posicione en el diagnóstico diferencial del cáncer renal, así como en cuanto al valor pronóstico y al valor predictivo de respuesta al tratamiento, tanto respecto al empleo de citoquinas como de inhibidores de la tirosina-quinasa, al ser una molécula implicada en la angiogénesis. Podría emplearse también como reflejo del índice de DMV.

Financiación

Trabajo financiado por la Fundación para la Investigación en Urología.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecimiento también a Vanesa Pérez (Data Manager del Servicio de Urología del IVO), a María García Flores y Tania Mazcuñán (Técnicos de Laboratorio).

Bibliografía

- Rubio Briones J, Iborra Juan I, Aznar E, Climent MA, López-Guerrero JA, Maiquez J, et al. Utilidad de marcadores séricos del carcinoma renal. *Actas Urol Esp.* 2004;28:381–6.
- Morell-Quadreny L, Rubio J, López-Guerrero JA, Casanova J, Ramos D, Iborra I, et al. Disruption of basement membrane, extracellular matrix metalloproteinases and E-cadherin in renal-cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2003;23:5005–10.
- Mertz KD, Demichelis F, Kim R, Schraml P, Storz M, Diener PA, et al. Automated immunofluorescence analysis defines microvessel area as a prognostic parameter in clear cell renal cell cancer. *Hum Pathol.* 2007;38:1454–62.
- Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol.* 1995;147:9–19.
- Rubio Briones J, Algaba Arrea F, Almenar S, Solsona Narbon E. Inmunohistoquímica aplicada a la Urología. *Actas Urol Esp.* 1999;23:819–34.
- Liao SY, Aurelio ON, Jan K, Zavada J, Stanbridge EJ. Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res.* 1997;57:2827–31.
- Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MH, Yu H, et al. Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol.* 2005;173:1496–501.
- Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res.* 2003;9:802–11.
- Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM, Thompson RH, Cheville JC, Zavada J, et al. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2007;25:4757–64.
- Patard JJ, Fergelot P, Karakiewicz PI, Klatte T, Trinh QD, Rioux-Leclercq N, et al. Low CAIX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2008;123:395–400.
- Atkins M, Regan M, McDermott D, Mier J, Stanbridge E, Youmans A, et al. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:3714–21.
- Kim HS, Kim WS, Park SH, Jung CW, Choi HY, Lee HM, et al. Molecular biomarkers for advanced renal cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Urol Oncol.* 2010;28:157–63.
- Dudek AZ, Yee RT, Manivel JC, Isaksson R, Yee HO. Carbonic anhydrase IX expression is associated with improved outcome of high-dose interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2010;30:987–92.
- Cho D, Signoretti S, Dabora S, Regan M, Seeley A, Mariotti M, et al. Potential histologic and molecular predictors of response to temsirolimus in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer.* 2007;5:379–85.
- Oosterwijk-Wakka JC, Kats-Ugurlu G, Leenders WP, Kiemeny LA, Old LJ, Mulders PF, et al. Effect of tyrosine kinase inhibitor treatment of renal cell carcinoma on the accumulation of carbonic anhydrase IX-specific chimeric monoclonal antibody cG250. *BJU Int.* 2011;107:118–25.
- Choueiri TK, Regan MM, Rosenberg JE, Oh WK, Clement J, Amato AM, et al. Carbonic anhydrase IX and pathological features as predictors of outcome in patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma receiving vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *BJU Int.* 2010;106:772–8.
- Divgi CR, Pandit-Taskar N, Jungbluth AA, Reuter VE, Gonen M, Ruan S, et al. Preoperative characterisation of clear-cell renal carcinoma using iodine-124-labelled antibody chimeric G250 (124I-cG250) and PET in patients with renal masses: a phase I trial. *Lancet Oncol.* 2007;8:304–10.
- McGuire BB, Fitzpatrick JM. Biomarkers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol.* 2009;19:441–6.
- Stillebroer AB, Mulders PF, Boerman OC, Oyen WJ, Oosterwijk E. Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma: Implications for Prognosis, Diagnosis, and Therapy *Eur Urol.* 2010;58:75–83.
- Gupta R, Balzer B, Picken M, Osunkoya AO, Shet T, Alsabeh R, et al. Diagnostic implications of transcription factor Pax 2 protein and transmembrane enzyme complex carbonic anhydrase IX immunoreactivity in adult renal epithelial neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2009;33:241–7.
- MacLennan GT, Bostwick DG. Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance. *Urology.* 1995;46:27–30.
- Gelb AB, Sudilovsky D, Wu CD, Weiss LM, Medeiros LJ. Appraisal of intratumoral microvessel density, MIB-1 score, DNA content, and p53 protein expression as prognostic indicators in patients with locally confined renal cell carcinoma. *Cancer.* 1997;80:1768–75.
- Yildiz E, Ayan S, Goze F, Gokce G, Gultekin EY. Relation of microvessel density with microvascular invasion, metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2008;101:758–64.
- Imao T, Egawa M, Takashima H, Koshida K, Namiki M. Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *Int J Urol.* 2004;11:948–53.
- Fukata S, Inoue K, Kamada M, Kawada C, Furihata M, Ohtsuki Y, et al. Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ-specific metastasis of renal cell carcinoma. *Cancer.* 2005;103:931–42.

26. Delahunt B, Bethwaite PB, Thornton A. Prognostic significance of microscopic vascularity for clear cell renal cell carcinoma. *Br J Urol.* 1997;80:401–4.
27. Zhang X, Yamashita M, Uetsuki H, Kakehi Y. Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases. *Int J Urol.* 2002;9:509–14.
28. Kohler HH, Barth PJ, Siebel A, Gerharz EW, Bittinger A. Quantitative assessment of vascular surface density in renal cell carcinomas. *Br J Urol.* 1996;77:650–4.
29. Herbst C, Kosmehl H, Stiller KJ, Berndt A, Eiselt M, Schubert J, et al. Evaluation of microvessel density by computerised image analysis in human renal cell carcinoma. Correlation to pT category, nuclear grade, proliferative activity and occurrence of metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1998;124: 141–7.
30. Phuoc NB, Ehara H, Gotoh T, Nakano M, Kamei S, Deguchi T, et al. Prognostic value of the co-expression of carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2008;20:525–30.