

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**DETECCIÓN DE CTLA-4, PD-1, PD-L1 Y TIM-3 EN LINFOCITOS
INFILTRANTES DE TUMOR (TIL) Y EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA
EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA RENAL.**

Por

DR. MARCO ALBERTO OCAÑA MUNGUÍA


COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

**ESPECIALISTA EN UROLOGÍA
UR 24-00007**


FEBRERO, 2025

**“DETECCIÓN DE CTLA-4, PD-1, PD-L1 Y TIM-3 EN LINFOCITOS
INFILTRANTES DE TUMOR (TIL) Y EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA
EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA RENAL.”**

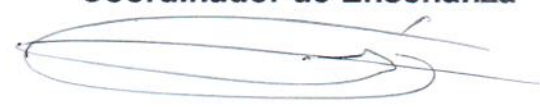
Aprobación de la tesis:




Dr. med. Adrián Gutiérrez González
Director de la tesis
Jefe del Departamento de Urología



Dr. Rodolfo Jaime Dávila
Coordinador de Enseñanza



Dr. med. Lauro Salvador Gómez Guerra
Coordinador de Investigación



Dr. med. Adrián Gutiérrez González
Jefe de Servicio o Departamento



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

A mis papás Paco y Coco

Por ser un ejemplo de fortaleza y de amor incondicional. Gracias por todo su apoyo durante el transcurso de mi vida personal y profesional. Siempre estaré en deuda con ustedes. Son mi ejemplo a seguir.

A mi hermano Vito

Por ser mi mejor amigo durante todo este proceso y estar conmigo en momentos complicados. Cuenta conmigo siempre.

A mi esposa Andrea

Por tu amor y apoyo incondicional, has estado conmigo en las buenas y en las malas. Gracias por darme energía cuando no la tenía, por motivarme a ser mejor y siempre ser distinto a lo establecido. Que este logro sea el fruto de una vida llena de éxitos compartidos por el resto de nuestras vidas. Te amo.

A mis profesores y compañeros

Por su paciencia y enseñanzas. Agradezco especialmente al Dr. Arrambide Gutiérrez por enseñarme lo apasionante que es esta subespecialidad y por ser un ejemplo de dedicación por la Urología.

A los pacientes

Que confiaron plenamente en mí durante mi proceso de formación, gracias por enseñarme y motivarme todos los días para seguir aprendiendo.

A Dios

Porque sin Él nada es posible.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESÚMEN	8
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN	9
Capítulo III	
3. HIPÓTESIS	10
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS	10
Capítulo V	
5. MATERIAL Y MÉTODOS	11
Capítulo VI	
6. RESULTADOS	14
Capítulo VII	
7. DISCUSIÓN	16
Capítulo VIII	
8. CONCLUSIÓN	19

Capítulo IX

9. TABLAS Y ANEXOS20

Capítulo X

10. BIBLIOGRAFÍA29

Capítulo XI

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO33

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Figura suplementaria 1. Análisis de inmunohistoquímica	20
2. Tabla 1. Características clínicas de los participantes.....	21
3. Tabla 2. Análisis de correlación para el marcador CTLA-4.....	21
4. Tabla 3. Análisis de correlación para el marcador PDL-1.....	22
5. Figura 1 Expresión de CD3 y CTLA-4.....	22
6. Figura suplementaria 2 Análisis de citometría de flujo.....	22
7. Figura 2 Citometría de flujo.....	23
8. Figura suplementaria 3.....	24
9. Figura suplementaria 4.....	24
10. Figura suplementaria 5.....	24
11. Figura 3.....	25
12. Figura suplementaria 6.....	25
13. Figura suplementaria 7 y 8.....	27
14. Figura suplementaria 9.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

RCC: Carcinoma de células renales

ccRCC: Carcinoma de células renales variedad células claras

ICI: inmunoterapia con inhibidores de puntos de control

TIL: linfocitos infiltrantes de tumor

PD-1: receptor de la proteína de muerte celular programada 1

PD-L1: ligando receptor de la proteína de muerte celular programada 1

CTLA-4: proteína asociada a los linfocitos T citotóxicos 4

IHC: inmunohistoquímica

TAC: tomografía axial computarizada

CAPÍTULO I

1. RESUMEN

El carcinoma de células renales (CCR) es una enfermedad neoplásica que se ha asociado a un mal pronóstico. Los tratamientos para la enfermedad avanzada de CCR requieren el uso de inmunoterapia o terapia dirigida con inhibidores del factor de crecimiento vascular endotelial, pero actualmente no hay un método disponible para predecir el éxito o el fracaso del tratamiento.

La mayoría de los trabajos publicados estudiaron el papel de la inmunohistoquímica para evaluar la expresión de marcadores celulares asociados al "agotamiento", como base para el uso de inhibidores de puntos de control inmunológico. En este contexto, la citometría de flujo tiene una ventaja cuantitativa para evaluar la expresión celular de proteínas superficiales, ya sea en sangre o en tejido sólido.

En este estudio, describimos la naturaleza cuantitativa de la infiltración leucocitaria tumoral, la expresión de CD3 y los marcadores de "agotamiento" CTLA-4 y PD-L1 en sangre y tejido de pacientes con CCR de células claras con enfermedad localizada.

Nuestros resultados muestran que los linfocitos citotóxicos predominan entre los leucocitos infiltrados en el tejido tumoral. Además, existe una correlación positiva en la expresión tumoral de CD3 entre la inmunohistoquímica y la citometría. El mayor porcentaje de linfocitos CD4 en sangre identifica al subgrupo de pacientes con el peor puntaje histopatológico. En conjunto, nuestros resultados sugieren que existe una correlación positiva entre la citometría y la inmunohistoquímica para evaluar la gravedad basal de los pacientes con diagnóstico de CCR de células claras con enfermedad localizada.

CAPÍTULO II

2. INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células renales (CCR) es un grupo de enfermedades neoplásicas del parénquima renal que comprende el 2-3% de todas las neoplasias (1). En 2022, la incidencia y la mortalidad globales por CCR fueron de 434.419 y 155.702, respectivamente (2). El pico de incidencia se produce en la sexta década de la vida (3), y la enfermedad avanzada tiene una supervivencia media de 6-10 meses con una tasa de supervivencia a los 2 años del 20% (4).

Según la histología, hasta el 80% de los tumores de CCR son de la variedad de células claras (ccRCC), una enfermedad altamente metabólica con una mayor resistencia intrínseca a la mayoría de las quimioterapias citotóxicas (5,6). Además, hasta el 50% de los pacientes son diagnosticados con enfermedad avanzada, lo que lleva al uso de tratamientos más nuevos como inhibidores de VEGF e inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI) como terapias de primera y segunda línea. Actualmente, hay tres ICI aprobados por la FDA, que bloquean el receptor de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), su ligando (PD-L1) y la proteína asociada a los linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) (7-10), y se están estudiando más anticuerpos.

A pesar de la disponibilidad de estas terapias, varias lagunas en el conocimiento de la inmunidad antitumoral impiden su uso generalizado. Por ejemplo, no hay consenso sobre cómo evaluar de forma predictiva la respuesta individual a cada terapia biológica, y se han propuesto varios marcadores, principalmente relacionados con la cuantificación tisular de leucocitos (11,12) y la expresión tisular de PD-L1 (13-15). Los ICI funcionan desinhibiendo las propiedades citotóxicas de los linfocitos, ya sean tisulares o circulantes. De la misma manera, los marcadores asociados a la disfunción inmune tisular probablemente no sean solo locales, sino sistémicos, lo que plantea la posibilidad de que un análisis cuantitativo de dichos marcadores relacionados con el agotamiento pueda descubrir las herramientas predictivas tan necesarias. Con este propósito, realizamos un estudio descriptivo y comparativo para evaluar cuantitativamente el fenotipo de leucocitos infiltrados en muestras tumorales de pacientes con CCRcc mediante inmunohistoquímica (IHC) y citometría de flujo. Nuestros hallazgos sugieren que la evaluación simultánea de tejidos mediante IHC y citometría de flujo mejora la evaluación cuantitativa de leucocitos tisulares y sus receptores de agotamiento en pacientes con CCR. Este enfoque podría convertirse en una valiosa herramienta predictiva en el diagnóstico y pronóstico, identificando el grupo de pacientes que se benefician más con tratamientos como los ICI y la terapia dirigida. También analizamos los beneficios y desventajas de usar sangre como tejido sustituto para estudiar la enfermedad local en pacientes con CCR.

CAPÍTULO III

3. HIPÓTESIS

La expresión de marcadores de agotamiento CTLA-4, PD-1, PD-L1 y TIM-3 en linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) correlacionan positivamente con la expresión de dichos marcadores en linfocitos de sangre periférica.

La expresión de marcadores de agotamiento CTLA-4, PD-1, PD-L1 y TIM-3 en linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) se correlacionan con características patológicas agresivas, tamaño tumoral mayor y un puntaje UISS alto al momento del diagnóstico.

CAPÍTULO IV

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la expresión de marcadores de agotamiento CTLA-4, PD-1, PD-L1 y TIM-3 en linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) y en linfocitos en sangre periférica en pacientes mexicanos con carcinoma renal de células claras.

Objetivos Específicos

1. Evaluar marcadores de agotamiento CTLA-4, PD-1, PD-L1 y TIM-3 en células tumorales y linfocitos infiltrantes de tumor por medio de citometría de flujo.
2. Evaluar la expresión de marcadores de agotamiento CTLA-4, PD-1, PD-L1, TIM-3 en tejido tumoral por inmunohistoquímica.
3. Caracterizar los marcadores de agotamiento en linfocitos de sangre periférica en pacientes con carcinoma renal por medio de una citometría de flujo.
4. Realizar un análisis de correlación entre la expresión de marcadores de agotamiento en células del tumor y en sangre periférica de pacientes con carcinoma renal para establecer pronóstico, mortalidad y riesgo de recurrencia posterior a realizar una nefrectomía.

CAPÍTULO V

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Nuestra investigación se llevó a cabo en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" y fue aprobada por el comité de ética institucional (número UR24-00007). Se incluyeron un total de 20 pacientes con diagnóstico de tumor renal mediante tomografía axial computarizada (TAC) y 10 participantes sanos pareados por edad y sexo.

Se empleó la siguiente fórmula para calcular la muestra, tomando en cuenta que anualmente se operan alrededor de 100 casos en nuestro Hospital.

$$n = (N * (Z^2) * p * (1-p)) / ((N-1) * (E^2) + (Z^2) * p * (1-p))$$

Donde:

n es el tamaño de muestra necesario.

N es el tamaño de la población objetivo.

Z es el valor crítico correspondiente al nivel de confianza deseado. Deseandose un nivel de confianza del 95%, Z sería aproximadamente 1.96.

p es la proporción estimada de la población que tiene una característica específica, pudiéndose usar 0.5 para obtener el tamaño de muestra más conservador.

E es el margen de error deseado, que indica la precisión con la que deseas estimar la característica de interés.

Sustituyendo los valores en la fórmula, obtenemos:

$$n = (100 * (1.96^2) * 0.5 * (1-0.5)) / ((100-1) * (0.05^2) + (1.96^2) * 0.5 * (1-0.5)) \\ n = (100 * 3.8416 * 0.25) / (99 * 0.0025 + 3.8416 * 0.25) \\ n \approx 9.604 / (0.2475 + 0.9604) \\ n \approx 9.604 / 1.2079 \\ n \approx 19.95$$

Por lo tanto, para una población objetivo de 100, se recomendaría un tamaño de muestra de aproximadamente 20 sujetos de investigación.

Los participantes fueron pacientes programados para nefrectomía radical terapéutica y todos ellos firmaron el consentimiento informado antes de ingresar al protocolo.

Después de realizar el diagnóstico histopatológico, se obtuvieron dos gramos de tejido renal de dos zonas definidas macroscópicamente (núcleo tumoral [tumor] y tejido renal conservado de tumor [riñón]), junto con 4 mL de sangre venosa periférica para análisis citométrico.

Los pacientes fueron excluidos del estudio si se les diagnosticó enfermedad metastásica y/o variantes de RCC distintas del RCC de células claras (ccRCC). Ver Tabla 1.

Inmunohistoquímica

Se fijaron secciones representativas de muestras quirúrgicas de CCR en formol al 10% y luego se incluyeron en parafina. Se seleccionó un total de 20 casos en función de criterios morfológicos indicativos de CCRcc; solo estos casos seleccionados se sometieron a una evaluación integral de varios parámetros, incluida la multifocalidad, la necrosis y las características sarcomatoides. Se empleó el sistema de clasificación de la Sociedad Internacional de Patología Urológica (OMS/ISUP) (2016) de la OMS para evaluar los grados nucleares.

Para el procesamiento, los portaobjetos se limpiaron con agua jabonosa, seguido de tres lavados con agua destilada, se enjuagaron con metanol y se secaron al aire a temperatura ambiente. La inmunotinción se realizó utilizando el sistema de tinción Ventana Benchmark ULTRA. Se utilizó una solución de acondicionamiento celular (CC1, prediluida, pH 8,0, Roche, Tucson, AZ) para la recuperación de antígenos durante 64 minutos a 100°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-CTLA-4 monoclonal de ratón (Cat. No. BSB 2880), anti-PD-L1 monoclonal de conejo (Ventana, Cat. No. 790-4905) y anti-CD3 monoclonal de conejo (Ventana, Cat. No. 790-4341) a una dilución de 1:50 durante 32 minutos a 37°C. La reacción secundaria se llevó a cabo utilizando un kit de detección de diaminobencidina (DAB) Ventana OptiView para anti-CTLA-4 y anti-PD-L1, y un kit de detección de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (Ventana Medical Sistemas, Cat. 760-020) para anti-CD3 durante 12 minutos adicionales.

Todos los pasos de los procedimientos de tinción se ejecutaron meticulosamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante para garantizar la consistencia y la confiabilidad de los resultados. El escaneo de los portaobjetos se realizó en el Slide Scanner Ventana DP200.

Análisis digital en inmunohistoquímica

Las imágenes digitales obtenidas de los tejidos teñidos se analizaron con tres enfoques: el análisis clínico estándar realizado por un patólogo calificado (porcentaje de tejido positivo) y dos análisis adicionales utilizando el software QuPath v0.5.1 y realizados por un investigador no patólogo capacitado (porcentaje del área teñida y porcentaje de células positivas). Todos los análisis se realizaron dentro del núcleo del tumor, dada la baja celularidad del estroma circundante y todos los valores obtenidos se expresaron en porcentajes (consulte los detalles en la figura suplementaria 1).

Procesamiento de tejidos

Los tejidos muestreados se diseccionaron mecánicamente con un bisturí en medio FBS/DMEM al 5 % antes de la digestión enzimática. Los cócteles de enzimas se utilizaron en pasos secuenciales de la siguiente manera: colagenasa-hialuronidasa (30 minutos), DNasa-Tripsina/EGTA (1 minuto), dispasa (5 minutos) y solución de lisis de eritrocitos (10 minutos) seguido de exclusión por tamaño con un tamiz celular de 70 μm (Falcon, Cat. 352350). Después de la digestión, se contaron las células y se tiñeron para el análisis citométrico.

Citometría de flujo

Se tiñó una suspensión de 1×10^6 células de tejido para marcadores de linfocitos y mieloides durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para la sangre, se tiñeron 50 μL de sangre venosa periférica seguido de lisis de eritrocitos durante 20 minutos. El set de anticuerpos para linfocitos contenía: FITC ratón anti-CD8 humano (BD Cat. 555366, 20 μL /muestra), PE ratón anti-CD279 humano (PD-1, BD Cat. 557946, 20 μL /muestra), BV605 ratón anti-CD4 humano (BD Cat. 562658, 5 μL /muestra), APC-Cy7 ratón anti-CD3 humano (BD Cat. 557832, 5 μL /muestra), anticuerpo anti-CD366 humano Alexa Fluor 647 (TIM-3, BD Cat. 565558, 5 μL /muestra), anticuerpo anti-CD223 humano PE-CF594 (LAG-3, BD Cat. 565718, 5 μL /muestra), anticuerpo anti-CD152 humano BV421 (CTLA-4, BD Cat. 562743, 5 μL /muestra). El cóctel de anticuerpos para células mieloides incluyó: anticuerpo anti-CD14 humano de ratón Alexa Fluor 488 (BD Cat. 557700, 5 μL /muestra), anticuerpo anti-CD274 humano de ratón BV421 (PD-L1, BD Cat. 563738, 5 μL /muestra), anticuerpo anti-CD45 humano de ratón PE (BD Cat. 568136, 5 μL /muestra) y solución de viabilidad 7-AAD (BD Cat. 559925, 5 μL /muestra). Después de la tinción, se adquirieron 100.000 eventos de cada muestra en el citómetro de flujo LSRFortessa. Los porcentajes de células CD4, CD8 y NKT fueron relativos a CD3. Los porcentajes de linfocitos, monocitos, neutrófilos y macrófagos fueron relativos a CD45. Se evaluó la fluorescencia de PD1, LAG3, TIM3 y CTLA4 en células seleccionadas en CD3+/CD4+ (células CD4), CD3+/CD8+ (células CD8) y CD3+/CD4-/CD8- (células NKT). Se evaluó la fluorescencia de PD-L1 en células seleccionadas en CD45+/CD14+ (monocitos), CD45+/CD14-/SSChi (granulocitos) y CD45+/CD14+/SSChi (macrófagos, en tejidos digeridos). La fluorescencia bruta (intensidad media de fluorescencia o MFI) se normalizó en relación con los valores de fluorescencia menos uno (nMFI o Fold Change, figura suplementaria 2).

Análisis estadístico

Dada la cantidad de participantes en el estudio, utilizamos un enfoque estadístico no paramétrico. Las comparaciones de grupos múltiples se evaluaron con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba posterior de Dunn. Los análisis de correlación se realizaron con la prueba de Spearman. La significación se definió como un valor $p < 0,05$. Las cifras muestran la mediana \pm rango intercuartil a menos que se indique lo contrario.

CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS

Características clínicas de los participantes

Las características de los pacientes estudiados se resumen en la Tabla 1. La edad media de los pacientes fue de 62 (\pm 7.9). La mayoría de los pacientes fueron clasificados como estadio 3 en la escala pTNM, y el 70% de los pacientes presentaron tumores con grado nuclear ISUP >3. Se incluyeron pacientes con diagnóstico de carcinoma renal de células claras (ccRCC). No se incluyeron pacientes con diagnósticos histopatológicos distintos y/o enfermedad metastásica. El grupo de control incluyó participantes con la misma edad y comorbilidades (Tabla 1).

Los pacientes con ccRCC mostraron una mayor expresión de los marcadores CD3 y CTLA-4 en la inmunohistoquímica tumoral. Se tiñeron secciones seriadas de muestras de tumores de CCR para el análisis de CD3, CTLA-4 y PD-L1. Después de la evaluación clínica de las muestras, comparamos dos métodos adicionales de análisis realizados en imágenes digitales escaneadas a partir de portaobjetos de tejido. Todos los análisis se realizaron en el núcleo del tumor (figura suplementaria 1). El enfoque de tres métodos muestra que la mayoría de los pacientes son positivos para CD3 y CTLA-4, mientras que PD-L1 es mayoritariamente negativo. (Figura 1A).

El análisis de correlación para los tres métodos probados mostró que CD3 se correlacionó positivamente entre la evaluación clínica y la evaluación digital de las células positivas (Figura 1B, prueba de Spearman, $R = 0,51$, $p < 0,05$). Curiosamente, también se observó una correlación positiva entre CTLA-4 y PD-L1, ambos evaluados como porcentajes mediante análisis digital (Figura 1B, prueba de Spearman, $R = 0,58$, $p < 0,05$), lo que sugiere una correspondencia entre el receptor de agotamiento del linfocito y su ligando.

Los pacientes con CCR mostraron una mayor infiltración de células citotóxicas con una expresión reducida de marcadores de agotamiento. Se realizaron análisis de CTLA-4 y PD-L1 en linfocitos y células mieloides, respectivamente (figura suplementaria 2). La citometría de flujo mostró que los leucocitos infiltrados en el tejido tumoral eran principalmente linfocitos y macrófagos (Figura 2A).

Entre las células T infiltradas, hubo un predominio de células T NKT y CD8, con casi ausencia de células T CD4 (Figura 2B). El marcador de agotamiento CTLA-4 es conocido por regular negativamente la activación de las células T. En nuestro grupo de pacientes, CTLA-4 se encontró disminuido en todos los linfocitos y tejidos evaluados, en comparación con los niveles de expresión en linfocitos sanguíneos de participantes de control sanos (Figura 2C). Complementariamente, la expresión de PD-L1 se encontró disminuida en monocitos y granulocitos sanguíneos, pero no

en monocitos infiltrados y macrófagos en comparación con las células mieloides sanguíneas en controles sanos (Figura 2D).

En conjunto, los datos indican que el microambiente tumoral está altamente infiltrado con linfocitos, y mientras que la expresión de CTLA-4 es baja, el agotamiento celular resulta de la integración de muchas otras señales no medidas.

Por otro lado, se evaluaron las señales de activación de los receptores de agotamiento a través de la expresión de PD-L1, y los macrófagos fueron las células que expresaron los niveles más altos de PD-L1 dentro del tejido tumoral, lo que sugiere la existencia de un microambiente altamente supresor.

La expresión de PD-L1 se correlacionó positivamente entre la IHC y la citometría de flujo considerando las ventajas cuantitativas y prácticas que proporciona la evaluación citométrica de los tejidos, realizamos un análisis de correlación entre los datos obtenidos por inmunohistoquímica y los datos obtenidos por citometría de flujo. No encontramos correlación para el marcador linfocitario CTLA-4 (Tabla 2) pero la expresión de PD-L1 mostró una correlación positiva entre la IHC tumoral y la citometría tumoral, específicamente en granulocitos infiltrantes, monocitos y macrófagos (Tabla 3).

En la citometría de flujo evaluamos tres tejidos (sangre, riñón y tumor), por lo que realizamos una matriz de correlación de Spearman dentro de los datos citométricos buscando una correlación entre la sangre y los marcadores tisulares. Los resultados mostraron una correlación positiva entre la expresión de CTLA-4 en sangre y tumor en células CD3, CD8 y NKT (figura suplementaria 3).

Para PD-L1, encontramos una correlación positiva entre los leucocitos sanguíneos y tumorales sugiriendo que para PD-L1, los cambios de los leucocitos tisulares podrían reflejarse en los cambios de los leucocitos sanguíneos, todo con implicaciones pronósticas (figura suplementaria 4). Finalmente, luego de realizar el análisis de correlación entre los porcentajes de leucocitos en tejidos y sangre, no obtuvimos correlación (figura suplementaria 5).

Los CD3 tisulares y CD4 sanguíneos identifican a los pacientes con el puntaje histopatológico más severo Para evaluar la relación entre los linfocitos agotados y la gravedad de la enfermedad de RCC al momento del diagnóstico, dividimos al grupo de pacientes en tres categorías según el grado nuclear histopatológico informado: G2 a G4 (Tabla 1). Los resultados mostraron una tendencia que sugiere que los pacientes con tumor de grado 4 tenían un mayor porcentaje de células CD3+ en IHC (Figura 3A). Para los análisis citométricos, este subgrupo de pacientes mostró un mayor porcentaje de linfocitos CD4+ sanguíneos y una tendencia a un porcentaje disminuido de linfocitos CD8+ y un mayor porcentaje de monocitos en sangre periférica (Figura 3B). Para la citometría tumoral no se observaron diferencias o tendencias entre los subgrupos (Figura 3C). Finalmente, encontramos una correlación positiva entre el tamaño del tumor y la expresión de CTLA-4 en los

linfocitos CD8+ tumorales, lo que resalta la importancia de las células citotóxicas en el crecimiento tumoral (figura suplementaria 6).

CAPÍTULO VII

7. DISCUSIÓN

El carcinoma renal es una enfermedad neoplásica que afecta a pacientes en la sexta y séptima década de la vida. El CCR en sí mismo tiene un pronóstico pobre, debido a la agresividad tumoral intrínseca, las altas tasas de metabolismo anaeróbico, la ausencia de síntomas en etapas tempranas y el desarrollo temprano de metástasis (5,16). Esta condición a menudo requiere tratamientos combinados además de la cirugía. Para la enfermedad localizada, la nefrectomía es el tratamiento de elección, brindando la oportunidad del estudio directo del tejido.

Este escenario nos llevó a proponer el estudio sistemático del CCR con una perspectiva morfológica utilizando inmunohistoquímica y citometría de flujo para evaluar cuantitativamente los leucocitos infiltrantes y sus marcadores de agotamiento CTLA-4 y PD-L1. Estudiamos 20 pacientes con características demográficas similares descritas en la mayoría de las series epidemiológicas (Tabla 1) (1). A modo de comparación, y para evaluar la expresión basal de marcadores, incluimos 10 participantes sanos, emparejados por edad y comorbilidades con el grupo de CCR. La inmunohistoquímica ha demostrado ser una técnica valiosa para estudiar el tejido de RCC (17-20). Por este motivo, buscamos comparar tres enfoques diferentes para evaluar los resultados de la inmunohistoquímica. Por lo general, las preparaciones para inmunohistoquímica son evaluadas por un patólogo capacitado y los resultados se expresan como porcentajes. Como alternativa al análisis de inmunohistoquímica, evaluamos el rendimiento de dos métodos digitales adicionales que utilizan la evaluación clínica como referencia (S1). Los resultados mostraron una correspondencia entre el análisis clínico y digital para el marcador CD3 solo. No es sorprendente que este marcador capture mejor la variabilidad intrínseca de la expresión entre los marcadores estudiados (F1).

En conjunto, los resultados sugirieron que el análisis digital podría ser un método alternativo para la evaluación de IHC, aunque se necesitan más estudios para validar estos resultados. Por naturaleza, la IHC es un método cualitativo o, como máximo, semicuantitativo. Esto genera preocupación cuando el pronóstico o diagnóstico clínico requiere la cuantificación de antígenos, como por ejemplo, el estudio de la expresión de marcadores de agotamiento en cáncer. En este caso, la citometría de flujo surge como una técnica complementaria para la evaluación cuantitativa de dichos marcadores. Varios estudios han utilizado la citometría de flujo como un método único para estudiar la expresión de marcadores de agotamiento (21-23).

Conscientes de sus limitaciones (costos, las células deben estar en suspensión, estandarización, equipo especializado), buscamos evaluar experimentalmente el

desempeño de la citometría de flujo en relación con la inmunohistoquímica en muestras tumorales derivadas de pacientes con CCR. Como complemento a los datos de IHC, la citometría de flujo muestra que los pacientes con CCR ya tienen proporciones anormales de células entre los leucocitos circulantes (2A). Anteriormente, la enfermedad de CCR se ha asociado a la presencia de anomalías en las células circulantes, como la mayor proporción de linfocitos doblemente positivos (linfocitos CD4/CD8) (24) y TIL poco reactivos en ensayos ex vivo (25).

En otros estudios, el CCR también se ha descrito como un tumor inmunogénico rico en linfocitos (26,27), características comúnmente asociadas a una disminución de la supervivencia libre de progresión y la supervivencia general (17,20,28). En consecuencia, nuestros resultados mostraron que los linfocitos infiltrantes del tumor dominan la celularidad entre los leucocitos tumorales, que comprenden principalmente células CD8 citotóxicas y células NKT como los fenotipos principales (2B). Es interesante destacar la casi ausencia de células CD4 en el tejido tumoral, dada la gran importancia de las señales auxiliares en la inmunidad antitumoral. No existe información sobre el bajo número de células CD4 en el CCR, pero este hallazgo se ha asociado con un peor pronóstico en pacientes con sarcoma y carcinoma de cuello uterino (29,30). La abundancia relativa de células NKT podría estar asociada al alto contenido lipídico en el tejido de RCCcc (31,32), y las capacidades intrínsecas de estas células para reconocer antígenos lipídicos (33,34).

Además, la presencia de variantes atípicas de linfocitos se ha informado previamente para pacientes con RCC (35,36). Para los receptores inmunes, encontramos una expresión disminuida de CTLA-4 en todos los linfocitos y tejidos evaluados en comparación con la expresión basal en linfocitos sanguíneos obtenidos de controles sanos (2C). Estos datos por sí solos no respaldan la hipótesis que apunta a la mayor expresión de tales señales inhibitorias como el impulsor de la disfunción inmune en RCC (37-39). Es importante decir que el agotamiento inmunológico no es un mecanismo de un solo receptor, porque hay muchos otros receptores participantes que no se evaluaron en este trabajo. La evaluación adecuada de la disfunción inmune debe incluir una batería de receptores activadores e inhibidores, y hasta el día de hoy, el trabajo de Giraldo y colaboradores abordó parcialmente este problema (40).

El aumento de la expresión de PD-L1 también se ha asociado a un mal pronóstico (18,20,41,42). El aumento de la expresión de PD-L1 y su asociación con la disfunción inmunológica condujeron a la aprobación clínica de avelumab, un anticuerpo bloqueador de PD-L1 para el tratamiento del CCR (13,14,43). En nuestro estudio, encontramos que los macrófagos tumorales son la principal fuente de PD-L1, lo que proporciona evidencia de la existencia de un programa de agotamiento inmunológico en el tejido del CCRcc (2D).

A continuación, buscamos correlacionar el rendimiento entre ambos métodos para evaluar la expresión de CTLA-4, PD-L1 y CD3. Encontramos una correlación IHC-

FC positiva solo para PD-L1 en células mieloides tumorales (Tabla 3). A continuación, comparamos las variables obtenidas en citometría entre sangre y tejido, tratando de apoyar la utilidad de los leucocitos periféricos como factores pronósticos en la enfermedad del CCRcc. La matriz de correlación de Spearman para la citometría sanguínea y tumoral mostró una correlación positiva para la expresión de CTLA-4 en linfocitos (S3), la expresión de PD-L1 en leucocitos (S4), pero no hubo correlación entre los porcentajes de leucocitos (S5).

Estos resultados respaldan la utilidad complementaria de la IHC y la CF para la evaluación clínica de los pacientes con CCRcc. Por supuesto, estas conclusiones deben tomarse con cautela, dada la naturaleza exploratoria de nuestro estudio y el pequeño número de participantes.

En el pasado, varios autores han sugerido una correlación inversa entre el grado nuclear y el resultado clínico (20,44,45). Por esta razón, dividimos nuestro grupo de estudio en tres subgrupos según el grado nuclear histopatológico (grados 2 a 4). Encontramos que el subgrupo de pacientes de grado 4 mostró porcentajes aumentados tanto de linfocitos CD3 tisulares en IHQ como de linfocitos CD4 sanguíneos en CF (Figura 3). Curiosamente, no hubo asociación entre el grado nuclear y los marcadores de agotamiento ni entre el tamaño del tumor y todos los biomarcadores evaluados (Figura 3, S6).

La predicción de la respuesta al tratamiento del CCR es un área de investigación muy activa, con estudios que abarcan desde ensayos de toxicidad in vitro para células citotóxicas después del bloqueo de PD-L1 (46) hasta la medición de los niveles urinarios de PD-L1 como seguimiento clínico (47). A pesar de los esfuerzos colectivos, la naturaleza heterogénea del CCR ha impedido la materialización de las herramientas pronósticas necesarias.

En la figura 7, 8 y 9 se observan las características de los niveles de neutrófilos, linfocitos y plaquetas de los pacientes incluidos en el estudio. Podemos concluir que los pacientes con grado tumoral más elevado tienen una mayor cantidad de neutrófilos sanguíneos circulantes.

En el futuro, será necesario el estudio simultáneo de los leucocitos tisulares más allá de las células NK y los linfocitos CD8 (23). Además, las terapias con células CAR-NK y CAR-T han demostrado ser una herramienta poderosa para tratar tumores con alta resistencia a terapias citotóxicas (48,49). El éxito del tratamiento de los pacientes con CCR solo será posible después de una mejor comprensión de la interacción reguladora entre los linfocitos, las células tumorales y el microambiente tumoral.

CAPÍTULO VIII

8. CONCLUSIÓN

El microambiente tumoral en el CCR está enriquecido con linfocitos citotóxicos en ausencia de linfocitos colaboradores. Las señales inhibitoras de PD-L1 están enriquecidas en los macrófagos tumorales, lo que favorece la disfunción linfocítica y la progresión tumoral. Se observa una mayor infiltración tumoral con linfocitos en pacientes con tumores de mayor grado, un factor asociado a un peor pronóstico.

CAPÍTULO IX

9. TABLAS Y ANEXOS

Figura suplementaria 1. Análisis de inmunohistoquímica. Después de definir el núcleo del tumor (A), se evaluó un área muestreada aleatoria para la presencia de células positivas o área positiva (b) como porcentajes. El área positiva se definió en relación con el total área central. Las células positivas se definieron en relación con la suma de las células positivas y negativas en el área del núcleo.

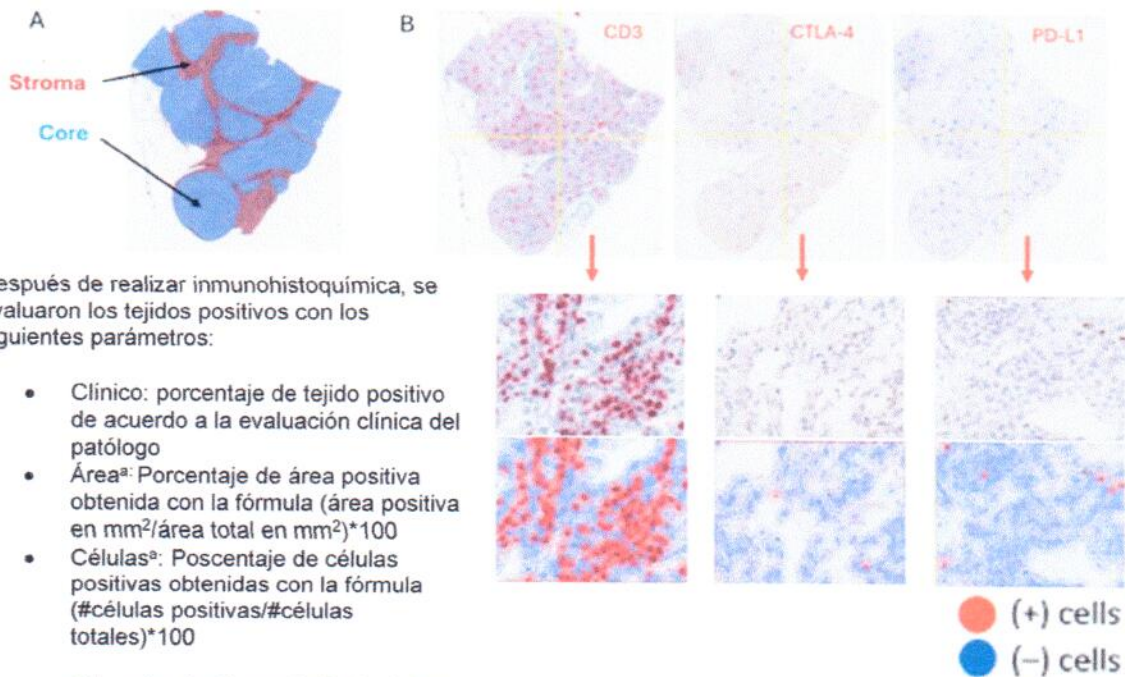


Tabla 1. Características clínicas de los participantes

Variable	Parámetro	RCC (23)
Edad (años)	Media (\pm S.D.) Min. Max.	62 (\pm 7.9) 44 71
Sexo	Mujer, N (%) Hombre, N (%)	7 (30%) 16 (70%)
pTNM	Estadio 1, N (%) Estadio 2, N (%) Estadio 3, N (%) Estadio 4, N (%)	8 (35%) 2 (9%) 10 (43%) 3 (13%)
Grado nuclear	Grado 2, N (%) Grado 3, N (%) Grado 4, N (%)	8 (35%) 9 (39%) 6 (26%)
Tamaño tumor (cm)	Media (\pm S.D.)	8 (\pm 3.8)
Necrosis	Área > 50%, N (%) Área < 50%, N (%)	2 (9%) 21 (91%)
Linfocitos	Media (\pm S.D.)	1.6 (\pm 0.68)
Neutrófilos	Media (\pm S.D.)	5.13 (\pm 2.34)
Plaquetas	Media (\pm S.D.)	255.3 (\pm 87.41)
Clasificación NLR	Normal < 3, N (%) Patológico > 3, N (%)	10 (43%) 13 (57%)
Clasificación PLR	Bajo > 154.31 Alto < 154.31	15 (65%) 8 (35%)
Clasificación SII	Bajo > 618.8 Alto < 618.8	8 (35%) 15 (65%)

TABLA 2. Análisis de correlación para el marcador CTLA-4 con histología y citometría

	CTLA-4 (Citometría)					
	CD4		CD8		NKT	
	Sangre	Tumor	Sangre	Tumor	Sangre	Tumor
CD3 (IHC)	-0.0374	-0.1091	0.0714	0.1868	-0.1929	0.0857
CTLA-4 (IHC)	0.2696	0.1763	0.2102	0.3604	0.2376	0.2613

TABLA 3. Análisis de correlación para el marcador PDL-1 con histología y citometría

	PDL-1 (Citometría)					
	CD4		CD8		NKT	
	Sangre	Tumor	Sangre	Tumor	Sangre	Tumor
CD3 (IHC)	-0.5253	-0.2308	-0.1077	-0.0330	-	-0.1209
PDL-1 (IHC)	0.2510	0.5929*	0.0303	0.6556*	-	0.6831*

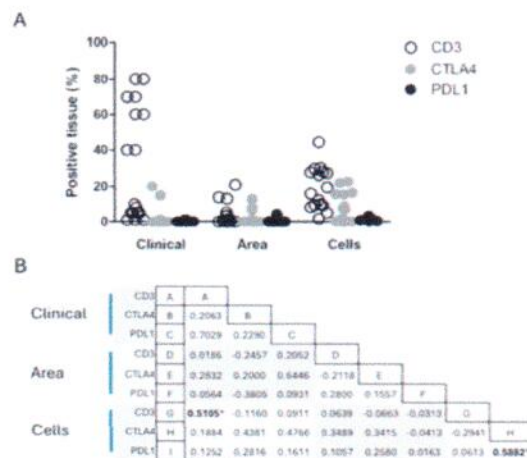


Figura 1. La inmunohistoquímica muestra una mayor expresión de CD3 y CTLA-4 en muestras tumorales de pacientes con CCRCC. (A) Porcentajes de datos positivos después de la semi cuantificación para los marcadores CD3, CTLA-4 y PD-L1 en tejido de pacientes con CCRCC. (B) La matriz de correlación de Spearman muestra una correlación positiva para los valores de CD3 entre los métodos clínicos y digitales para la evaluación del tejido IHC (r = 0.51, intersección A-G). Los números indican valores R. *Valor P < 0.05.

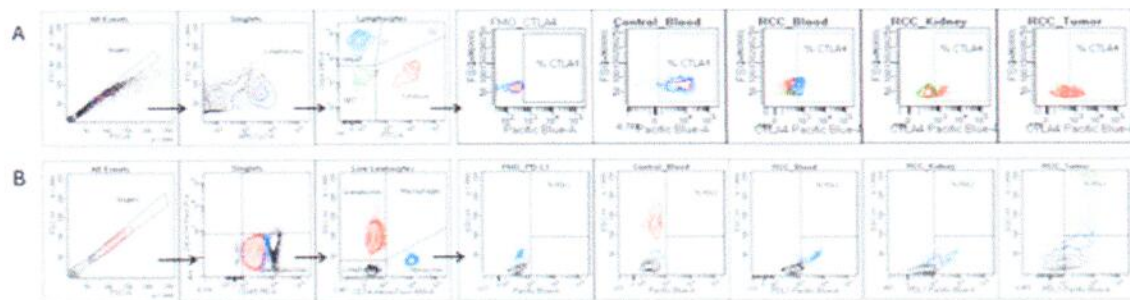


Figura suplementaria 2. Análisis de citometría de flujo. Los linfocitos se definieron mediante combinaciones de morfología, CD3, CD4 y CD8 (A). Las células mieloides se definieron por morfología, combinaciones CD45 y CD14 (B).

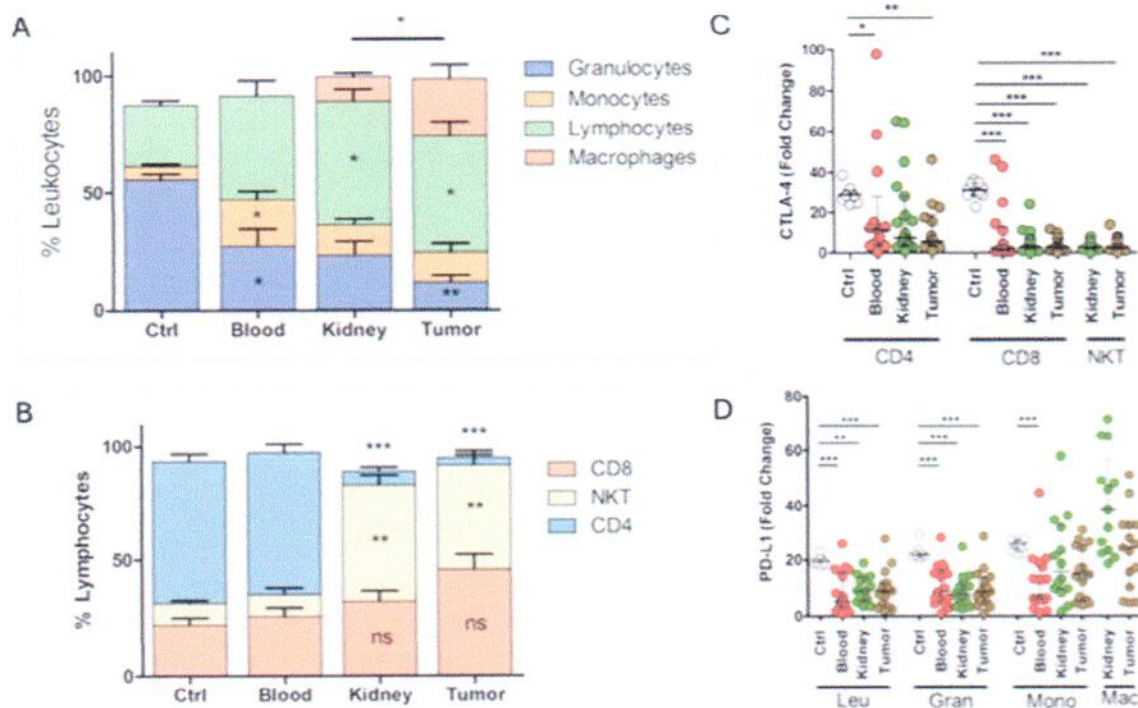


Figura 2. La citometría de flujo muestra una mayor infiltración de linfocitos citotóxicos y una disminución de la expresión de marcadores de agotamiento en tejidos de pacientes con CCRCC. (A) Los pacientes con CCR han aumentado la proporción de monocitos y una disminución de la proporción de granulocitos en la sangre periférica en comparación con los participantes sanos. En pacientes con CCR, de células CD45+, el tejido tumoral tenía proporciones aumentadas de linfocitos y macrófagos. (B) Los linfocitos NKT y CD8+ T dominan los linfocitos infiltrados en tumores en ausencia de células T CD4+. (C) La expresión de CTLA-4 disminuye en los linfocitos de sangre y tejidos de pacientes con CCRCC en relación con los valores de control sano. (D) La expresión de Pd-L1 disminuye en todos los leucocitos, excepto los monocitos tumorales y los macrófagos tumorales. Marcadores de agotamiento informados como cambio de pliegue en relación con el

control FMO. CTRL significa leucocitos de sangre de control saludable. Media \pm SEM (A-B), mediana \pm IQR (C-D). Prueba de Kruskal-Wallis + Dunn. Valores P *P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

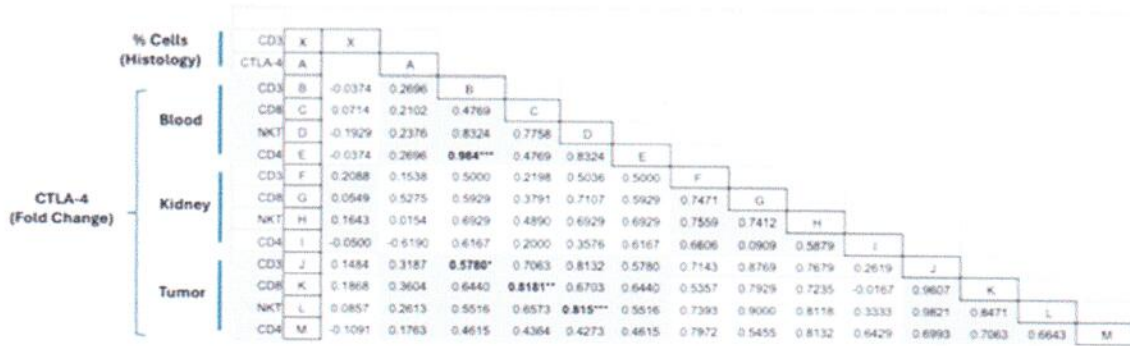


Figura suplementaria 3. Matriz de correlación de Spearman para la expresión de CTLA-4 entre citometría e inmunohistoquímica. Los números en las intersecciones indican el valor R. Los valores de P- se indican con *p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

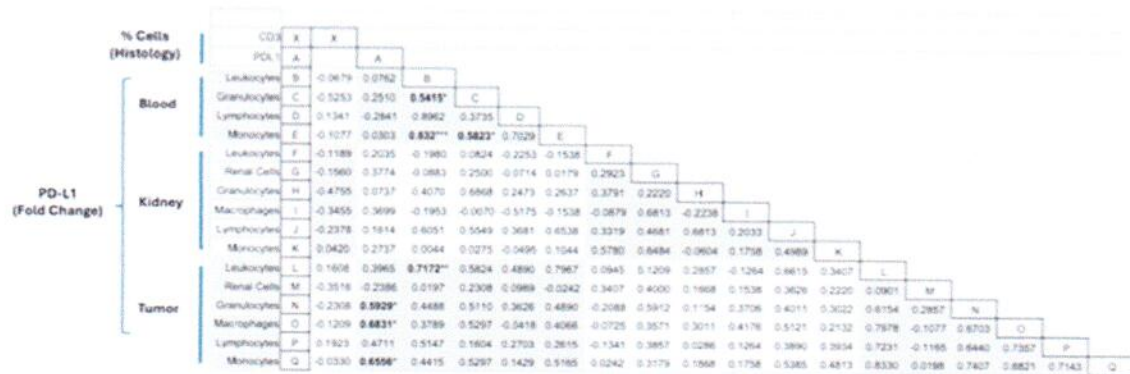


Figura suplementaria 4. Matriz de correlación de Spearman para la expresión de PD-L1 entre citometría e inmunohistoquímica. Los números en las intersecciones indican el valor R. Los valores de P- se indican con *p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

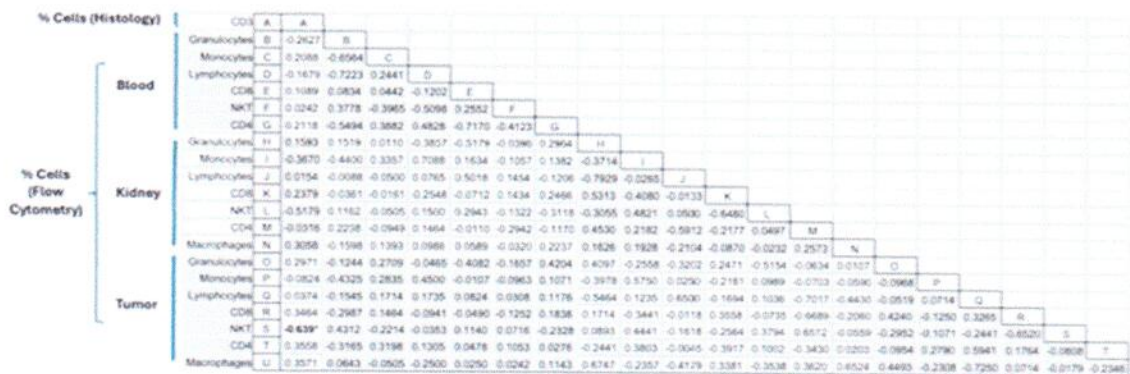


Figura suplementaria 5. Matriz de correlación de Spearman para los porcentajes de leucocitos entre citometría e inmunohistoquímica. Los números en las intersecciones indican el valor R. El valor p se indica por *p <0.05.

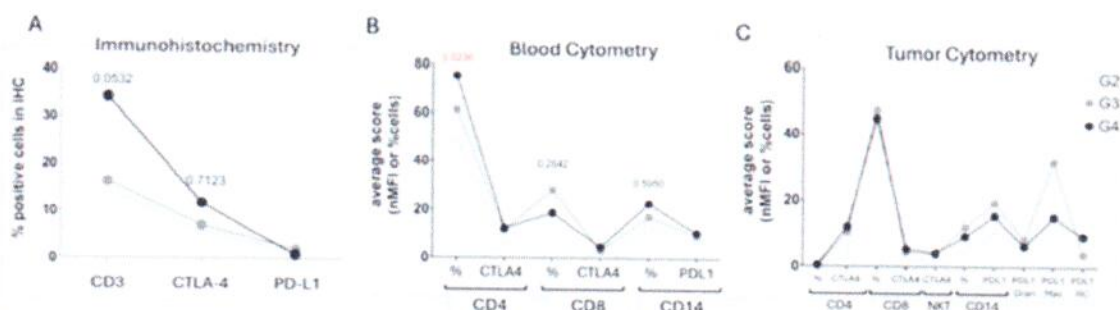


Figura 3. El tejido CD3 y la sangre CD4 identifican el subgrupo de pacientes que tienen tumores con el puntaje de grado nuclear más alto. Después del subgrupo, los pacientes con tumores de grado 4 mostraron mayores porcentajes de CD3 en el tejido IHC (A) y CD4 en la citometría sanguínea (B). La estratificación de grado nuclear no mostró diferencias entre los subgrupos y los valores de citometría tumoral (C). Los puntos indican porcentaje medio o cambio de pliegue medio para leucocitos y valores de expresión, respectivamente. Los números fraccionales indican los valores p después de la prueba de Kruskal-Wallis.

Size-Biomarker Correlation		Blood Cytometry	Tumor Cytometry	IHC
	CD3	-	-	0.24037
	CTLA4	-	-	0.09567
	PDL1	-	-	-0.08123
	% CD4	0.07055	0.12433	-
	CD4-CTLA4	0.21606	0.23237	-
	% CD8	0.07323	0.14883	-
	CD8-CTLA4	0.11582	0.5022*	-
	% CD14	0.05041	0.06440	-
	CD14-PDL1	0.18385	-0.12736	-
	Gran-PDL1	-	-0.03094	-
	Mac-PDL1	-	-0.16323	-
RC-PDL1	-	-0.03220	-	

Figura suplementaria 6. Matriz de correlación de Spearman entre el tamaño del tumor (en cm) y los marcadores biológicos medidos en citometría e inmunohistoquímica. Los números en las intersecciones indican el valor R. El valor p se indica por *p <0.05.

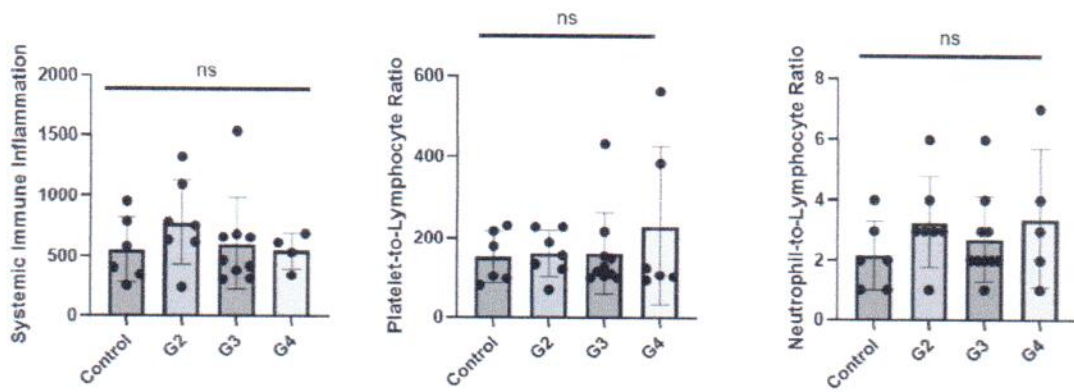


Figura suplementaria 7. Relación global de sistema inmunológico.

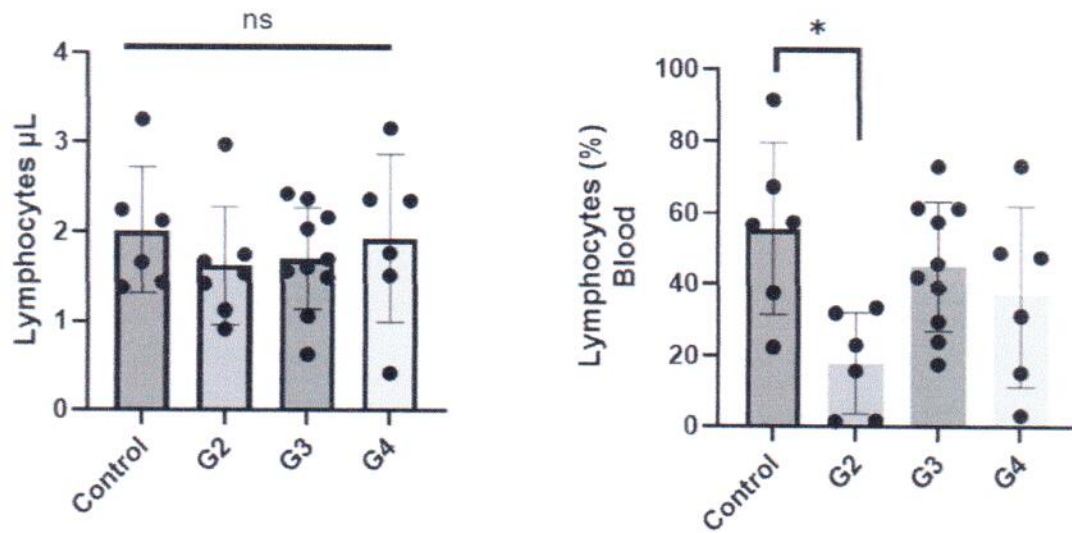


Figura suplementaria 8. Relación global de linfocitos.

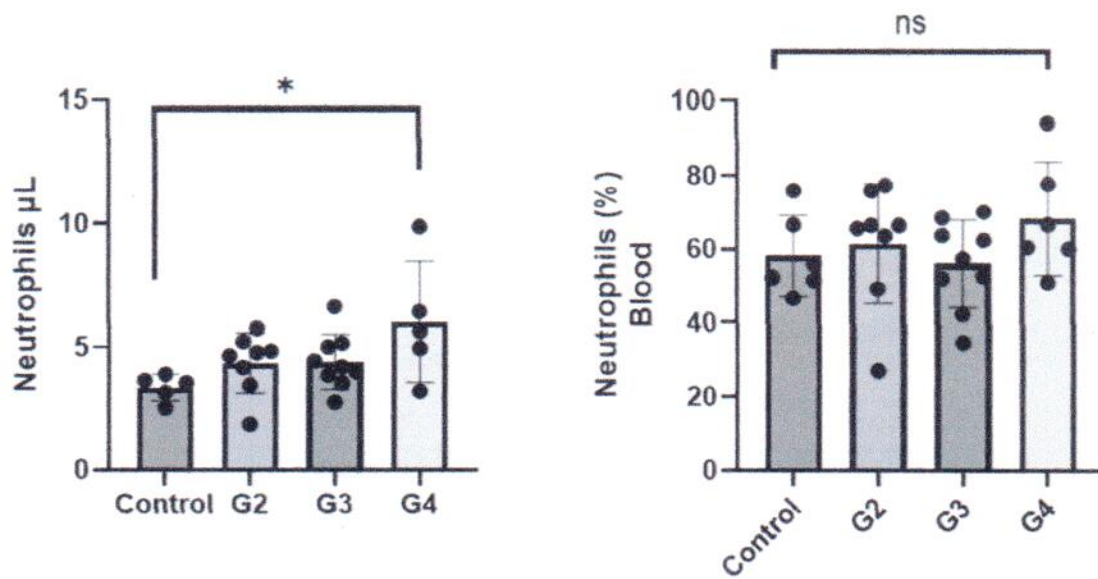


Figura suplementaria 9. Relación global de neutrofilos.

9.1 CARTA DE APROBACIÓN POR COMITÉ DE ÉTICA



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

DR. med. ADRIÁN GUTIÉRREZ GONZÁLEZ
Investigador principal
Servicio de Urología
Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
Presente. -

Estimado Dr. med. Gutiérrez:

En respuesta a su solicitud con número de ingreso **PI24-00066** con fecha del **14 de marzo de 2024** recibida en las oficinas de la Secretaría de Investigación Clínica de la Subdirección de Investigación, se extiende la siguiente notificación con fundamento en el artículo 41 BIS de la Ley General de Salud; los artículos 14 inciso VII, 99 inciso I, 102, 109 y 112 del Decreto que modifica el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud publicado el día 2 de abril del 2014; además de lo establecido en los puntos 4.4, 6.2, 6.3.2.8, 8 y 9 de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos; así como por el Reglamento Interno de Investigación de nuestra Institución.

Se le informa que el Comité a mi cargo ha determinado que su proyecto de investigación clínica abajo mencionado cumple con los aspectos éticos necesarios para garantizar el bienestar y los derechos de los sujetos de investigación que la sociedad mexicana demanda, por lo cual ha sido **APROBADO**.

Titulado: "**Detección de CTLA-4, PD-1, PD-L1 y TIM-3 en linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) y en linfocitos de sangre periférica en pacientes con diagnósticos de carcinoma renal**".

Los documentos aprobados en esta solicitud se enlistan a continuación:

NOMBRE DEL DOCUMENTO	VERSIÓN	FECHA
Protocolo escrito en extenso	1.3	Junio 2024
Consentimiento Informado	1.3	Junio 2024

Por lo tanto, usted ha sido **autorizado** para realizar dicho estudio en el **Servicio de Urología** del Hospital Universitario como Investigador Responsable. Su proyecto aprobado ha sido registrado con la clave **UR24-00007**. La vigencia de aprobación de este proyecto es al día **02 de septiembre de 2025**.

Participando además el Dr. Marco Alberto Ocaña Munguía como **tesista**, el Dr. med. Mario Cesar Salinas Carmona, Dr. José Gustavo Arrambide Gutiérrez, Dr. Juan Pablo Flores Gutiérrez, Dr. Victor Manuel Molgado Garza, Dra. Raquel González Garza, Dr. Manuel Guadalupe Mejía Torres, Dr. Guillermo Vizcarra Mata y la estudiante Lorena Barragán Albo como Co-investigadores.

Toda vez que el protocolo original, así como la carta de consentimiento informado o cualquier documento involucrado en el proyecto sufran modificaciones, éstas deberán someterse para su re-aprobación.

Comité de Ética en Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. González s/n, Col. Mitas Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México
Teléfonos: 81.8329.4050, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduani.com



Septiembre 15, 2022

CAPÍTULO X

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *World J Oncol.* 2020;11:79–87.
2. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2024;74:229–63.
3. Bukavina L, Bensalah K, Bray F, Carlo M, Challacombe B, Karam JA, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma: 2022 Update. *European Urology.* 2022;82:529–42.
4. Scosyrev E, Messing EM, Sylvester R, Van Poppel H. Exploratory Subgroup Analyses of Renal Function and Overall Survival in European Organization for Research and Treatment of Cancer randomized trial of Nephron-sparing Surgery Versus Radical Nephrectomy. *Eur Urol Focus. Netherlands;* 2017;3:599–605.
5. Di S, Gong M, Lv J, Yang Q, Sun Y, Tian Y, et al. Glycolysis-related biomarker TCIRG1 participates in regulation of renal cell carcinoma progression and tumor immune microenvironment by affecting aerobic glycolysis and AKT/mTOR signaling pathway. *Cancer Cell International.* 2023;23:186.
6. Ma G, Wang Z, Liu J, Fu S, Zhang L, Zheng D, et al. Quantitative proteomic analysis reveals sophisticated metabolic alteration and identifies FMNL1 as a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Cancer. Ivyspring International Publisher;* 2021;12:6563–75.
7. Motzer RJ, Alyasova A, Ye D, Karpenko A, Li H, Alekseev B, et al. Phase II trial of second-line everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma (RECORD- 4). *Ann Oncol. England;* 2016;27:441–8.
8. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society;* 2018;378:1277–90.
9. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society;* 2019;380:1103–15.
10. Rini BI, Powles T, Atkins MB, Escudier B, McDermott DF, Suarez C, et al. Atezolizumab plus bevacizumab versus sunitinib in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma (IMmotion151): a multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled trial. *The Lancet. Elsevier;* 2019;393:2404–15.
11. Kim JH, Kim GH, Ryu Y-M, Kim S-Y, Kim H-D, Yoon SK, et al. Clinical implications of the tumor microenvironment using multiplexed immunohistochemistry in patients with advanced or metastatic renal cell carcinoma treated with nivolumab plus ipilimumab. *Frontiers in Oncology*

- [Internet]. 2022 [cited 2023 Feb 23]; 12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.969569>
12. Sammarco E, Rossetti M, Salfi A, Bonato A, Viacava P, Masi G, et al. Tumor microenvironment and clinical efficacy of first line immunotherapy-based combinations in metastatic renal cell carcinoma. *Med Oncol*. 2024;41:150.
 13. Pabla S, Seager RJ, VanRoey E, Gao S, Hoefler C, Nesline MK, et al. Integration of tumor inflammation, cell proliferation, and traditional biomarkers improves prediction of immunotherapy resistance and response. *Biomark Res*. 2021;9:56.
 14. Atkins MB, Jegede OA, Haas NB, McDermott DF, Bilen MA, Stein M, et al. Phase II Study of Nivolumab and Salvage Nivolumab/Ipilimumab in Treatment-Naive Patients With Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma (HCRN GU16-260- Cohort A). *JCO*. 2022;40:2913–23.
 15. Motzer RJ, Choueiri TK, McDermott DF, Powles T, Vano Y-A, Gupta S, et al. Biomarker analysis from CheckMate 214: nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in renal cell carcinoma. *J Immunother Cancer*. 2022;10:e004316.
 16. Bahadoram S, Davoodi M, Hassanzadeh S, Bahadoram M, Barahman M, Mafakher L. Renal cell carcinoma: an overview of the epidemiology, diagnosis, and treatment. *G Ital Nefrol*. 2022;39:2022-vol3.
 17. Bromwich EJ, McArdle PA, Canna K, McMillan DC, McNicola M, Brown M, et al. The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. *Br J Cancer*. Nature Publishing Group; 2003;89:1906–8.
 18. Leite KRM, Reis ST, Junior JP, Zerati M, Gomes Dde O, Camara-Lopes LH, et al. PD-L1 expression in renal cell carcinoma clear cell type is related to unfavorable prognosis. *Diagn Pathol*. 2015;10:189.
 19. Eckel-Passow JE, Ho TH, Serie DJ, Chevillat JC, Houston Thompson R, Costello BA, et al. Concordance of PD-1 and PD-L1 (B7-H1) in paired primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Medicine*. 2020;9:1152–60.
 20. Möller K, Fraune C, Blessin NC, Lennartz M, Kluth M, Hube-Magg C, et al. Tumor cell PD-L1 expression is a strong predictor of unfavorable prognosis in immune checkpoint therapy-naive clear cell renal cell cancer. *Int Urol Nephrol*. 2021;53:2493–503.
 21. MacFarlane AWIV, Jillab M, Plimack ER, Hudes GR, Uzzo RG, Litwin S, et al. PD-1 Expression on Peripheral Blood Cells Increases with Stage in Renal Cell Carcinoma Patients and Is Rapidly Reduced after Surgical Tumor Resection. *Cancer Immunology Research*. 2014;2:320–31.
 22. Menard LC, Fischer P, Kakrecha B, Linsley PS, Wambre E, Liu MC, et al. Renal Cell Carcinoma (RCC) Tumors Display Large Expansion of Double Positive (DP) CD4+CD8+ T Cells With Expression of Exhaustion Markers. *Front Immunol* [Internet]. Frontiers; 2018 [cited 2024 Jul 30];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.02728/full>
 23. Lee MH, Järvinen P, Nísen H, Brück O, Ilander M, Uskil, et al. Tandem NK cell abundance defines two distinct subgroups of renal cell carcinoma. *Oncoimmunology*. 2022;11:1993042.

24. Nishida K, Kawashima A, Kanazawa T, Kidani Y, Yoshida T, Hirata M, et al. Clinical importance of the expression of CD4+CD8+ T cells in renal cell carcinoma. *International Immunology*. 2020;32:347–57.
25. van Asten SD, de Groot R, van Loenen MM, Castenmiller SM, de Jong J, Monkhorst K, et al. T cells expanded from renal cell carcinoma display tumor-specific CD137 expression but lack significant IFN- γ , TNF- α or IL-2 production. *Oncoimmunology*. 2021;10:1860482.
26. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*. 2015;160:48–61.
27. Şenbabaoğlu Y, Gejman RS, Winer AG, Liu M, Van Allen EM, de Velasco G, et al. Tumor immune microenvironment characterization in clear cell renal cell carcinoma identifies prognostic and immunotherapeutically relevant messenger RNA signatures. *Genome Biol*. 2016;17:231.
28. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:717–34.
29. Bi Q, Liu Y, Yuan T, Wang H, Li B, Jiang Y, et al. Predicted CD4+ T cell infiltration levels could indicate better overall survival in sarcoma patients. *J Int Med Res*. SAGE Publications Ltd; 2021;49:0300060520981539.
30. Shah W, Yan X, Jing L, Zhou Y, Chen H, Wang Y. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4+FOXP3+ regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell Mol Immunol*. Nature Publishing Group; 2011;8:59–66.
31. Du W, Zhang L, Brett-Morris A, Aguila B, Kerner J, Hoppel CL, et al. HIF drives lipid deposition and cancer in ccRCC via repression of fatty acid metabolism. *Nat Commun*. 2017;8:1769.
32. Shen D, Gao Y, Huang Q, Xuan Y, Yao Y, Gu L, et al. E2F1 promotes proliferation and metastasis of clear cell renal cell carcinoma via activation of SREBP1-dependent fatty acid biosynthesis. *Cancer Letters*. 2021;514:48–62.
33. Schümann J, Facciotti F, Panza L, Michieletti M, Compostella F, Collmann A, et al. Differential alteration of lipid antigen presentation to NKT cells due to imbalances in lipid metabolism. *European Journal of Immunology*. 2007;37:1431–41.
34. Tiwary S, Berzofsky JA, Terabe M. Altered Lipid Tumor Environment and Its Potential Effects on NKT Cell Function in Tumor Immunity. *Front Immunol* [Internet]. Frontiers; 2019 [cited 2024 Aug 14];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.02187/full>
35. Wang QJ, Hanada K-I, Yang JC. Characterization of a novel nonclassical T cell clone with broad reactivity against human renal cell carcinomas. *J Immunol*. 2008;181:3769–76.
36. Polimeno M, Napolitano M, Costantini S, Portella L, Esposito A, Capone F, et al. Regulatory T cells, interleukin (IL)-6, IL-8, vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL10, CXCL11, epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte growth factor (HGF) as surrogate markers of host immunity in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2013;112:686–96.

37. CozarJM, RomeroJM, AptsiauriN, VazquezF, VilchezJR, TalladaM, et al. High incidence of CTLA-4 AA (CT60) polymorphism in renal cell cancer. *Human Immunology*. 2007;68:698–704.
38. WangL, SongL. Identification of immune cell infiltration profiles in renal cell carcinoma and their clinical significance. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102:e33732.
39. XinS, SuJ, LiR, CaoQ, WangH, WeiZ, et al. Identification of a risk model for prognostic and therapeutic prediction in renal cell carcinoma based on infiltrating M0 cells. *Sci Rep*. 2024;14:13390.
40. GiraldoNA, BechtE, VanoY, PetitprezF, LacroixL, ValidireP, et al. Tumor-Infiltrating and Peripheral Blood T-cell Immunophenotypes Predict Early Relapse in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2017;23:4416–28.
41. BaineMK, TurcuG, ZitoCR, AdeniranAJ, CampRL, ChenL, et al. Characterization of tumor infiltrating lymphocytes in paired primary and metastatic renal cell carcinoma specimens. *Oncotarget*. 2015;6:24990–5002.
42. ZhouQ-H, LiK-W, ChenX, HeH-X, PengS-M, PengS-R, et al. HHLA2 and PD-L1 co-expression predicts poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Immunother Cancer*. 2020;8:e000157.
43. MotzerRJ, PowlesT, AtkinsMB, EscudierB, McDermottDF, AlekseevBY, et al. Final Overall Survival and Molecular Analysis in IMmotion151, a Phase 3 Trial Comparing Atezolizumab Plus Bevacizumab vs Sunitinib in Patients With Previously Untreated Metastatic Renal Cell Carcinoma. *JAMA Oncol*. United States; 2022;8:275–80.
44. WarrenAY, HarrisonD. WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World J Urol*. 2018;36:1913–26.
45. KawakamiF, SircarK, Rodriguez-CanalesJ, FellmanBM, UrbauerDL, TamboliP, et al. PD-L1 and Tumor Infiltrating Lymphocytes Status in Patients with Renal Cell Carcinoma and Sarcomatoid Dedifferentiation. *Cancer*. 2017;123:4823–31.
46. AnZ, HsuMA, GicobiJK, XuT, HarringtonSM, ZhangH, et al. A Novel PD-L1 Antibody Promotes Antitumor Function of Peripheral Cytotoxic Lymphocytes after Radical Nephrectomy in Patients with Renal Cell Carcinoma. *The Journal of Immunology*. 2023;210:2029–37.
47. ReimoldP, TosevG, KaczorowskiA, FriedhoffJ, SchwabC, SchützV, et al. PD-L1 as a Urine Biomarker in Renal Cell Carcinoma—A Case Series and Proof-of-Concept Study. *Diagnostics*. 2024;14:741.
48. KlaverY, vanSteenbergenSCL, SleijferS, DebetsR, LamersCHJ. Plasma IFN- γ and IL-6 levels correlate with peripheral T-cell numbers but not toxicity in RCC patients treated with CAR T-cells. *Clinical Immunology*. 2016;169:107–13.
49. LamersCHJ, KlaverY, GratamaJW, SleijferS, DebetsR. Treatment of metastatic renal cell carcinoma (mRCC) with CAIX CAR-engineered T-cells—a completed study overview. *Biochem Soc Trans*. 2016;44:951–9.

CAPÍTULO XI

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Marco Alberto Ocaña Munguía

Candidato para obtener el título de Especialista en Urología

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina y Hospital Universitario

"Dr. José Eleuterio González"

Tesis:

"Detección de CTLA-4, PD-1, PD-L1 y TIM-3 en Linfocitos Infiltrantes de Tumor (TIL) y en linfocitos de sangre periférica en pacientes con diagnóstico de Carcinoma renal."

Nacido en Toluca, Estado de México, hijo de Francisco Javier Ocaña Ponce y María del Socorro Munguía Torres.

Educación: Egresado de la Universidad de Monterrey obteniendo el grado de Médico Cirujano y Partero en el 2019.

Experiencia Profesional: Residente de Quinto Año (5-5) de la Especialidad de Urología en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Protocolo: UR24-00007