

**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Subdirección de Posgrado
Doctorado en Ciencias con Orientación en Inmunología**



**Detección de Expresión de Marcadores de Agotamiento de Linfocitos T
a Nivel Local y Sistémico en Pacientes con CA de Riñón**

Presentado por:
MCN Raquel González Garza

Como requisito parcial para obtener el Grado de:
Doctorado en Ciencias con Orientación en Inmunología

Director de Tesis
Dr. Mario César Salinas Carmona

Co-Director
Dr. Adrián Gutiérrez González

Colaboradores
Dr. Manuel Mejía Torres
Dra. María de los Ángeles Castro Corona
Dr. Juan Pablo Flores Gutiérrez

Monterrey, Nuevo León. 11 de Agosto del 2025



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



UANL

FACULTAD DE MEDICINA

Dr. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Posgrado
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Nuevo León
PRESENTE

Por este conducto le comunicamos que hemos concluido la dirección y codirección de la tesis titulada **Detección de Expresión de Marcadores de Agotamiento de Linfocitos T a Nivel Local y Sistémico en Pacientes con CA de Riñón** presentada por la M.C.N. Raquel González Garza con la finalidad de obtener el grado de doctorado en ciencias con orientación en inmunología.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente
"Alere Flammam Veritatis"
Monterrey, Nuevo León a 11 de Agosto del 2025.

Dr. Mario César Salinas Carmona

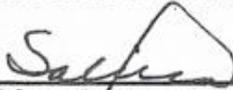
Director

Dr. Adrián Gutiérrez González

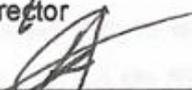
Co-Director

Detección de Expresión de Marcadores de Agotamiento de Linfocitos T a Nivel Local y Sistémico en Pacientes con CA de Riñón

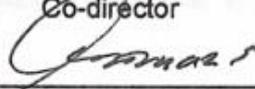
Aprobación de la Tesis:



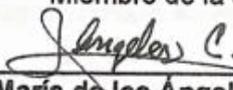
Dr. Mario César Salinas Carmona
Director



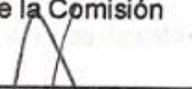
Dr. Adrián Gutiérrez González
Co-director



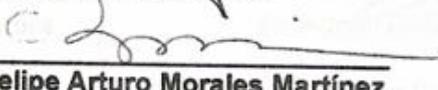
Dr. Manuel Guadalupe Mejía Torres
Miembro de la Comisión



Dra. María de los Angeles Castro Corona
Miembro de la Comisión



Dr. Juan Pablo Flores Gutiérrez
Miembro de la Comisión



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

Detección de Expresión de Marcadores de Agotamiento de Linfocitos T a Nivel Local y Sistémico en Pacientes con CA de Riñón

Presentado por: **M.C. Raquel González Garza**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Mario César Salinas Carmona y la co-dirección del Dr. Adrián Gutiérrez González.

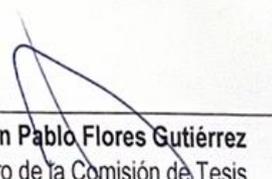
Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "José Eleuterio González" con el número de registro: **IN23-00002**

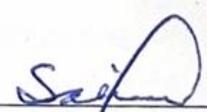
Atentamente,
Monterrey, N. L., 30 de Julio del 2025
La Comisión de Tesis


Dr. Adrián Gutiérrez González
Co-Director de Tesis


Dr. Manuel Mejía Torres
Miembro de la Comisión de Tesis


Dra. María de los Ángeles Castro Corona
Miembro de la Comisión de Tesis


Dr. Juan Pablo Flores Gutiérrez
Miembro de la Comisión de Tesis


Dr. Mario César Salinas Carmona
Director de Tesis

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO
OF - 2578 - 2025

01 AGO 2025
11:44am Brenda
RECIBIDO
FACULTAD DE MEDICINA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Av. Francisco I. Madero s/n y Av. Dr. Aguirre Pequeño, Mitrás Centro, Monterrey, Nuevo León, México, C.P. 64460
Tel. 81-83-29-41-54, 81-83-29-40-50 / www.medicina.uanl.mx

DEDICATORIA

A mi esposo David y mi hijo René,
Por ser mi fuerza, mi alegría y mi hogar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Mario César Salinas Carmona, director de esta tesis, por su guía constante, sus valiosas observaciones y por impulsar siempre mi pensamiento crítico.

Al Dr. Adrián Gutiérrez González, codirector de este proyecto, por sus aportaciones precisas y su apoyo incondicional en cada etapa del camino.

Al Dr. Manuel Mejía Torres, por su acompañamiento cercano, por haber compartido conmigo su conocimiento y experiencia, siempre con paciencia y generosidad.

A los profesores del Departamento de Inmunología, por brindarme las bases científicas y humanas necesarias para crecer en esta disciplina, y a mis compañeros del doctorado y maestría, por su amistad, colaboración y apoyo sincero.

Agradezco también al Servicio de Inmunología, al Servicio de Urología, al Servicio de Anatomía Patológica, a la Facultad de Medicina y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme el espacio académico para desarrollar este trabajo, y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado a través de la beca de posgrado.

Gracias a mis padres, por su amor inquebrantable y ejemplo de vida; a mi hermano, por siempre estar junto a mi; a mi esposo y a mi hijo, por ser mi hogar y mi motor cada día; y a mis amigos, por estar presentes en los momentos importantes.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento.

RESUMEN

M.C. Raquel González Garza

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León

Título del estudio: Detección de Expresión de Marcadores de Agotamiento de Linfocitos T a Nivel Local y Sistémico en Pacientes con CA de Riñón

Área de estudio: Inmunología

El carcinoma de células renales (RCC) es una enfermedad neoplásica asociada a un pronóstico no favorable. El tratamiento de la enfermedad avanzada suele requerir el uso de inmunoterapia; sin embargo, actualmente no existe un método confiable para predecir el éxito o fracaso terapéutico. Aunque la inmunohistoquímica es el estándar de oro para evaluar la expresión de antígenos tisulares, la citometría de flujo ofrece ventajas complementarias para el análisis de los marcadores de agotamiento, los cuales pueden orientar el uso de inhibidores de puntos de control inmunológico. En este estudio, describimos mediante un enfoque cuantitativo la expresión de cinco biomarcadores asociados con disfunción inmune en un grupo de 20 pacientes con diagnóstico de carcinoma de células renales subtipo células claras (ccRCC) en estadio localizado. Confirmamos que el tejido de ccRCC presenta una alta positividad para CD3, con baja expresión de PD-L1 y CTLA-4. En comparación con los controles sanos, los pacientes con RCC mostraron proporciones anormales de leucocitos tanto en sangre como en tejido tumoral. Además, se observó un aumento en la expresión de PD-1 y TIM-3 en células CD3⁺, pero una disminución de PD-L1 en monocitos CD14⁺, reducción que fue más marcada en los monocitos infiltrantes del tumor. Identificamos que la disminución de PD-1 y el incremento de la infiltración por células CD3⁺ se asociaron con peor pronóstico, según el grado nuclear. Finalmente, al evaluar los cambios tras la nefrectomía radical, observamos que la expresión de biomarcadores en sangre permaneció estable, mientras que los leucocitos circulantes se normalizaron.

En conjunto, nuestros resultados sugieren el uso complementario de la citometría de flujo convencional y la inmunohistoquímica, como una herramienta valiosa en la evaluación del riesgo y, posiblemente para predecir la respuesta a inmunoterapia en pacientes con ccRCC localizado.

FIRMA DIRECTOR DE TESIS
Safinas
Dr. Mario César Safinas Carmona

ÍNDICE GENERAL

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Microambiente Tumoral e Inmunopatología del ccRCC.....	3
2.2 Respuesta Inmune en RCC.....	5
2.3 Factores de Riesgo para RCC.....	10
2.4 Tratamientos para RCC.....	11
2.5 Terapias Dirigidas.....	13
2.6 Inmunoterapia con Anticuerpos Monoclonales.....	14
2.7 Predictores de Respuesta Clínica a la Inmunoterapia.....	15
3. Planteamiento del Problema.....	19
4.JUSTIFICACIÓN	21
5.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS	22
5.1 Pregunta de Investigación.....	22
5.2 Hipótesis.....	22
6.OBJETIVOS	23
6.1 Objetivo General.....	23
6.2 Objetivos Específicos.....	23
7.ESTRATEGÍA GENERAL	24
8.MATERIALES Y MÉTODOS	26
8.1 Pacientes y muestras de tejido.....	26
8.2 Inmunohistoquímica.....	27
8.3 Análisis digital en inmunohistoquímica.....	29
8.4 Digestión de tejidos.....	29
8.5 Citometría de Flujo.....	30
8.6 Análisis Estadístico.....	32
9. RESULTADOS	33
9.1 Características Clínicas de los Participantes.....	33
9.2 Análisis de inmunohistoquímica del infiltrado inmune en tejido tumoral de pacientes con ccRCC.....	33
9.3 Comparación entre las técnicas de inmunohistoquímica y citometría de flujo en la evaluación de biomarcadores inmunes.....	39
9.4 Evaluación del microambiente inmune en tejido renal, tumor y sangre periférica de pacientes con ccRCC.....	41
9.5 Asociación entre grado tumoral y marcadores de agotamiento en ccRCC.....	47
9.6 Evaluación inmunológica pre y post-nefrectomía en pacientes con ccRCC.....	48
9.7 Cambio en el Porcentaje de Leucocitos en Sangre Venosa Periférica Antes y Después de Nefrectomía en pacientes con ccRCC.....	50
10.DISCUSIÓN	54
11. Perspectivas Futuras.....	59
12.CONCLUSIÓN	60
13.BIBLIOGRAFÍA	61

14.ANEXOS	68
14.1 Cartas Comité	68
14.2 Protocolos	70
14.3 Constancias	73
14.4 Carátulas de Artículos Publicados	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusió.....	29
Tabla 2. Características de la población	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategias terapéuticas y mecanismo de acción de los inhibidores de punto de control inmunitario PD-1/PD-L1 en el tratamiento del cáncer	12
Figura 2. Corte teñido con H&E	34
Figura 3 Tinción de inmunohistoquímica para CD3 en ccRCC	35
Figura 4 Tinción de inmunohistoquímica para PD-L1 en cRCC	36
Figura 5 Tinción de inmunohistoquímica para CTLA-4 en ccRCC	36
Figura 6 Análisis de inmunohistoquímica	37
Figura 7 El biomarcador CD3 fue positivo en la mayoría de las muestras tumorales obtenidas de pacientes con RCC	38
Figura 8 Análisis de citometría de flujo	40
Figura 9 Los biomarcadores tisulares mostraron una correlación heterogénea entre los métodos de análisis por inmunohistoquímica y citometría de flujo	40
Figura 10 Porcentaje de células CD45+ en tejido tumoral y renal adyacente de paciente con ccRCC	41
Figura 11. Distribución de células mieloides y linfoides en sangre periférica y tejidos de pacientes con ccRCC	42
Figura 12. Los pacientes con RCC presentaron alteraciones en la dinámica de leucocitos y en biomarcadores sanguíneos en comparación con los controles sanos	44
Figura 13. Expresión de marcadores de agotamiento en linfocitos en sangre, riñón y tumor de pacientes con ccRCC	46
Figura 14. Los tumores de alto grado muestran linfocitosis y disminución en la expresión de PD-1 en sangre	48
Figura 15. Tras la nefrectomía, el desequilibrio de los linfocitos en sangre se restaura sin afectar la expresión de los biomarcadores	49
Figura 16. Gráficos de dispersión conectados que representan los porcentajes de granulocitos, monocitos y linfocitos en sangre venosa periférica antes y después de la nefrectomía radical en pacientes con ccRCC	51
Figura 17. Gráficos de dispersión conectados que representan los porcentajes de linfocitos CD8+, CD4+ y NKT+ en sangre venosa periférica	53

LISTA DE ABREVIATURAS

- RCC: Carcinoma de células renales
- ccRCC: Carcinoma de células renales subtipo células claras
- FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos
- HPRC: Carcinoma papilar renal hereditario
- OMS: Organización mundial de la salud
- pTNM: Clasificación Patológica de Tumor, Nódulo y Metástasis
- NG: Grado nuclear
- TME: Microambiente tumoral
- TIME: Microambiente inmunológico tumoral
- TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
- TNFR2: Receptor 2 del factor de necrosis tumoral
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
- VHL: Gen Von Hippel-Lindau
- BAP1: Gen BRCA1 Associated Protein-1
- MET: Protooncogén MET
- HIF: Factor inducible por hipoxia
- NK: Natural Killer
- NKT: Células T Natural Killer
- DCs: Células dendríticas
- Tregs: Linfocitos T reguladores
- CAFs: Fibroblastos asociados a cáncer
- TAMs: Macrófagos asociados a tumor
- MDSCs: Células supresoras derivadas de la médula ósea
- ECM: Matriz extracelular
- TKs: Tirosina cinasas
- Bcl2: B-cell lymphoma 2
- Bcl-XL: Bcl-2-like 1, isoforma larga
- CRP: Proteína C reactiva
- ctDNA: ADN tumoral circulante
- ARN: Ácido ribonucleico
- IL-8: Interleucina 8
- ARC: represor de la apoptosis con dominio de reclutamiento de caspasa
- XIAP: inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X
- NF- κ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- ICIs: Inhibidores de puntos de control inmunológico
- PD-1: Proteína de muerte celular programada 1
- PD-L1: Ligando de la proteína de muerte programada 1
- CTLA-4: Proteína 4 asociada al linfocito T citotóxico
- TIM-3: Inmunoglobulina y dominio mucina-3 de células T
- LAG-3: Gen 3 de activación de linfocitos
- DMEM: Medio esencial mínimo de Eagle por Dulbecco
- DPBS: Solución salina tamponada con fosfatos sin calcio ni magnesio
- IHQ: Inmunohistoquímica
- CF: Citometría de flujo

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la oncología ha enfrentado un escenario de creciente complejidad debido al aumento sostenido de la incidencia y mortalidad del cáncer alrededor del mundo. Este incremento no solo se asocia al envejecimiento de la población, sino también a la exposición acumulativa a factores ambientales. La magnitud del problema ha impulsado avances significativos en el diagnóstico, tratamiento y comprensión de la biología tumoral, con un énfasis cada vez mayor en tratamientos personalizados.

El carcinoma de células renales (RCC) es una enfermedad neoplásica agresiva del parénquima renal que representa entre el 2 y 3% de todos los cánceres diagnosticados. El subtipo de células claras (ccRCC) es la variante más común entre más de 20 variantes descritas, todas caracterizadas por su quimiorresistencia intrínseca. En general, el RCC presenta un mal pronóstico y la enfermedad avanzada, diagnosticada en hasta el 50% de los pacientes, tiene una mediana de supervivencia de 6 a 10 meses.

Para la enfermedad avanzada, es común utilizar terapias más recientes, como la terapia dirigida (inhibidores de tirosina cinasa o TKI) y los inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICIs), generalmente en combinación. Entre estos últimos, existen actualmente cinco anticuerpos monoclonales aprobados para RCC, dirigidos contra las proteínas: proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), su ligando (PD-L1) y la proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (CTLA-4), todos diseñados para revertir el programa de agotamiento asociado a los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs).

Desafortunadamente, los ICIs carecen de herramientas predictivas adecuadas para guiar su uso clínico, un recurso muy necesario dada la variabilidad en la tasa de respuesta y el desarrollo de eventos adversos. Se han propuesto diversos biomarcadores pronósticos y predictivos mediante análisis de tejido, estudios transcriptómicos o ambos, obteniéndose resultados contradictorios.

Con este objetivo, buscamos evaluar la expresión de marcadores comúnmente asociados a agotamiento y la dinámica de los linfocitos en diversos contextos: expresión tumoral y en

sangre, cambios asociados al tiempo tras el seguimiento clínico y el desempeño diferencial entre inmunohistoquímica (IHQ) y citometría de flujo (CF) en un grupo de 20 pacientes con RCC localizado.

2. ANTECEDENTES

El cáncer continúa siendo un importante problema de salud pública a nivel mundial, con un impacto creciente en países en desarrollo debido al envejecimiento poblacional, cambios en los estilos de vida y factores ambientales. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2022 se registraron más de 20 millones de nuevos casos y aproximadamente 10 millones de muertes relacionadas con enfermedades oncológicas(1). Esta carga creciente ha impulsado el desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras dirigidas a mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes. Entre los diversos tipos de cáncer, el carcinoma de células renales (RCC) representa una neoplasia agresiva y clínicamente desafiante.

El carcinoma de células renales (RCC) constituye un grupo de neoplasias malignas que afectan el parénquima renal y representan entre el 2% y 3% de todos los diagnósticos oncológicos a nivel mundial(2). Esta enfermedad es más frecuente en hombres, con una proporción aproximada de 2:1 respecto a mujeres, y su incidencia se incrementa en la sexta década de vida(3). Hasta el 70% de los casos se diagnostican de manera incidental y, de ellos, alrededor del 50% presentan enfermedad metastásica al momento del diagnóstico(4).

Si bien el RCC localizado puede ser curable, hasta un 30% de los pacientes progresan a enfermedad metastásica, la cual presenta una mediana de supervivencia de 6 a 10 meses(5). En cuanto a la distribución histológica, el subtipo de ccRCC es el más prevalente, representando el 80% de los casos. Le siguen el subtipo papilar (10-

15%), el de células cromóforas (4-5%), y otras variantes moleculares menos comunes (<1%)(6).

2.1 Microambiente Tumoral e Inmunopatología del ccRCC

Macroscópicamente, el ccRCC se presenta como una masa sólida de color amarillo, atribuible a su alto contenido de lipídico (lípidos neutros, fosfolípidos y colesterol). Histológicamente, se caracteriza por células con citoplasma claro o eosinofílico sostenido por una red vascular delicada(7).

La mayoría de los tumores renales malignos derivan del epitelio tubular, siendo el ccRCC el subtipo más predominante (75%), seguido del carcinoma papilar (pRCC) y el carcinoma cromóforo (chRCC), que en conjunto representan más del 90% de los casos. El ccRCC presenta peor pronóstico que los otros subtipos histológicos(8).

El microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés) del ccRCC, al igual que en otros tipos de cáncer, constituye un ecosistema celular complejo, conformado por células tumorales, células estromales y células inmunitarias. Este entorno favorece un estado inmunosupresor que promueve la progresión tumoral. Aunque los mecanismos exactos siguen sin estar completamente comprendidos, diversos mediadores solubles, como la interleucina-10 (IL-10), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y el VEGF, contribuyen a la inmunosupresión y al desarrollo tumoral(9). Además, el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), una citocina proinflamatoria, ha demostrado favorecer la progresión tumoral a través de su receptor TNFR2, el cual se expresa en células endoteliales dañadas y se ha vinculado con un mayor grado nuclear, crecimiento tumoral y riesgo de metástasis(10).

Las alteraciones en el TME también afectan la biología tumoral, su resistencia a tratamientos y su incidencia. En el ccRCC, la frecuente inactivación del gen supresor de tumores von Hippel Lindau (VHL) conlleva a la acumulación de factores inducibles

por hipoxia (HIF), lo cual intensifica la angiogénesis, estimula la glucólisis aeróbica (efecto Warburg) y favorece un metabolismo anómalo de ácidos grasos(10,11).

El infiltrado inmunológico del ccRCC incluye predominantemente células T CD8⁺, células Th1, células dendríticas (DCs), células natural killer (NK), neutrófilos y diversas poblaciones mieloides, mientras que se observan niveles bajos de células Th2 y células T reguladoras (Tregs), lo que indica un entorno inmunitario de predominio proinflamatorio(12,13). Las células residentes, como los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), macrófagos, linfocitos B, células endoteliales y células madre cancerígenas, participan en una red de comunicación intrincada facilitada por citocinas supresoras, factores solubles y componentes de la matriz extracelular (ECM). Estas interacciones favorecen la progresión tumoral al promover la proliferación celular, la supervivencia y la metástasis(14).

Sin embargo, no toda infiltración inmunitaria se asocia con un buen pronóstico. En el ccRCC, la presencia de linfocitos infiltrantes en el TME puede correlacionarse con desenlaces clínicos desfavorables. A pesar del aumento en la infiltración de células T CD8⁺ el microambiente inmunitario en ccRCC frecuentemente refleja un estado de disfunción o agotamiento linfocitario, lo cual conlleva a una resistencia frente a los ICIs y a la progresión de la enfermedad metastásica, como fue señalado por el estudio de Fujita y colaboradores en el año 2022(15).

La relevancia del TME, y en particular de la infiltración de leucocitos en el tumor, ha adquirido importancia como un determinante en la progresión tumoral. Salinas-Carmona en el año 2019 destacó la necesidad de considerar al microambiente inmunológico tumoral (TIME) como un elemento clave en el desarrollo del cáncer, proponiendo incluso su incorporación al sistema de estadificación TNM. Reconocer el microambiente inmunitario del tumor podría mejorar la precisión diagnóstica, facilitar la identificación de blancos terapéuticos y optimizar los

desenlaces clínicos(16).

El TIME cumple un papel central en la interacción entre el tumor y el hospedero con modificaciones dinámicas tanto en pacientes tratados como no tratados. Se ha demostrado que la presencia de macrófagos, células NK, linfocitos T y B influye en la dinámica de dicha interacción.

2.2 Respuesta Inmune en RCC

La respuesta inmune es un proceso altamente coordinado que permite al organismo defenderse frente a agentes extraños como virus, bacterias, hongos, parásitos, y también frente a células anormales que han sufrido transformaciones genéticas con potencial oncogénico(17). Este sistema complejo se divide en dos ramas funcionales: la inmunidad innata, que proporciona una defensa inmediata y no específica, y la inmunidad adaptativa, que reconoce antígenos específicos y desarrolla memoria inmunológica a largo plazo(18).

La inmunidad innata está mediada principalmente por células como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células natural killer (NK), y componentes solubles como el sistema del complemento y citocinas proinflamatorias. Estas células actúan como primera línea de defensa y desempeñan un papel clave en la activación de la inmunidad adaptativa al presentar antígenos a los linfocitos T y secretar señales inflamatorias(19).

Por su parte, la inmunidad adaptativa se caracteriza por la activación y expansión clonal de linfocitos T y linfocitos B. Los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) reconocen y destruyen células que presentan antígenos extraños o anormales en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC clase I), mientras que los linfocitos T cooperadores (CD4⁺) modulan la respuesta inmune a través de la

producción de citocinas y el soporte a otras células inmunitarias. Los linfocitos B, por otro lado, son responsables de la producción de anticuerpos y la neutralización de antígenos solubles. La acción conjunta de estas células permite no solo eliminar patógenos, sino también vigilar y eliminar células tumorales en etapas tempranas de transformación(20).

Uno de los mecanismos más importantes en la defensa contra el cáncer es la vigilancia inmunológica, un proceso por el cual el sistema inmune reconoce y elimina células que han adquirido alteraciones genéticas. Esta vigilancia está mediada principalmente por los linfocitos T CD8⁺ y las células NK, que reconocen antígenos tumorales y eliminan células transformadas antes de que progresen hacia una neoplasia establecida(15). Sin embargo, cuando esta vigilancia falla o se ve superada por mecanismos de evasión tumoral, se permite el desarrollo y progresión del cáncer(21).

Los tumores han desarrollado múltiples estrategias para evadir el reconocimiento inmunológico, tales como la pérdida de antígenos tumorales, la expresión de moléculas inmunosupresoras, la inducción de células reguladoras (Tregs y MDSCs) y la creación de un microambiente tumoral inmunosupresor(22). Una de las formas más estudiadas de evasión inmune es el agotamiento de linfocitos T, un estado funcional disfuncional inducido por estimulación antigénica crónica, en el cual los linfocitos pierden su capacidad citotóxica efectiva y expresan receptores inhibitorios como PD-1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3(23).

La comprensión de estos mecanismos ha dado lugar al desarrollo de inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICIs), terapias diseñadas para bloquear la interacción entre receptores inhibitorios y sus ligandos, reactivando así la respuesta inmunitaria antitumoral(24). Estas estrategias han demostrado eficacia en varios tipos de cáncer, incluyendo melanoma, cáncer de pulmón y RCC, entre otros. No obstante,

su eficacia no es uniforme en todos los pacientes, y su uso puede estar asociado a efectos adversos significativos, por lo que actualmente existe un gran interés en identificar biomarcadores predictivos de respuesta y toxicidad, y comprender con mayor profundidad los mecanismos de resistencia inmunológica en el contexto tumoral(25).

El crecimiento tumoral necesita de dos condiciones fundamentales: la transformación celular, ya sea genética o adquirida, y la disfunción inmunitaria(26). Este último aspecto explica la asociación entre los estados de inmunodeficiencia y el desarrollo del cáncer. La eliminación de células neoplásicas requiere la activación de la inmunidad citotóxica, mediada por la infiltración de linfocitos T CD8⁺ y células NK en el tumor(27).

La inmunidad antitumoral es altamente eficaz, lo que explica que, a pesar de la transformación y el daño celular son procesos constantes, el cáncer se manifieste únicamente en una minoría de individuos. Su desarrollo se atribuye en gran medida a fallas en la respuesta inmune(28).

Las células tumorales proliferan a tasas más elevadas que células normales. Esta proliferación acelerada, vinculada a cambios metabólicos que ocurren dentro del lecho tumoral, genera una inmunidad local disfuncional y favorece la selección de las células tumorales mejor adaptadas(9,29). La quimioterapia citotóxica aprovecha esta alta tasa proliferativa, por lo que los tratamientos citotóxicos se utilizan ampliamente en la mayoría de las enfermedades neoplásicas, con excepción del RCC(30).

En el caso particular del RCC, la respuesta inmune juega un papel paradójico. A pesar de que se observen niveles elevados de infiltración linfocitaria en los tumores, esta infiltración no siempre se traduce en una respuesta inmune efectiva, lo que refleja un estado de agotamiento o disfunción inmunológica(7).

Las peculiaridades del RCC incluyen su naturaleza intrínsecamente agresiva,

su alta infiltración lipídica, su elevada tasa de metástasis y su resistencia a la quimioterapia citotóxica(31). Esta quimio resistencia tiene múltiples causas, tanto intrínsecas (genéticas) como adquiridas. Es importante destacar que las células epiteliales renales poseen mecanismos de secreción de xenobióticos y sistemas antioxidantes intrínsecos que la protegen del daño tóxico(32).

Las células tumorales renales muestran una sobreexpresión de proteínas anti apoptóticas como Bcl-2, Bcl-XL, ARC (represor de la apoptosis con dominio de reclutamiento de caspasa) y XIAP (inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X). En contraste, las proteínas pro apoptóticas, como Bim, se encuentran disminuidas. La expresión de estas moléculas está regulada por las vías de señalización de NF- κ B y von Hippel-Lindau respectivamente(33,34).

Hasta dos tercios de los pacientes con RCC presentan mutaciones en el gen VHL(35). Este gen codifica una proteína con múltiples funciones, entre ellas, la regulación de la degradación proteica a través del proteasoma. Una de las proteínas blanco de esta vía es Bim, una molécula proapoptótica cuyos niveles se encuentran en pacientes con RCC(36). Por otro lado, el aumento de las vías anti apoptóticas también se ha asociado con quimiorresistencia, particularmente debido a la sobreexpresión de proteínas Bcl-2, ARC y XIAP(37). De manera concomitante, las células de RCC exhiben una fuerte dependencia de la glucólisis aeróbica, un fenómeno conocido como el efecto Warburg; el cual se ha relacionado con una menor eficacia de la inmunoterapia basada en inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICIs)(38). Este perfil metabólico ha sido propuesto recientemente como un blanco terapéutico para optimizar los esquemas de tratamiento combinado en el RCC(9).

A pesar de que en la mayoría de los tumores sólidos la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) se asocia con un mejor pronóstico, en el RCC su infiltración se ha relacionado con desenlaces clínicos desfavorables(39). Esta paradoja puede

atribuirse al desarrollo de un microambiente tumoral hostil, caracterizado por hipoxia, acidosis y una baja disponibilidad de nutrientes; condicione que favorecen la selección de células tumorales resistentes y, al mismo tiempo, deterioran la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos(40).

Estudios recientes han sugerido que la disbiosis intestinal también podría influir negativamente en la eficacia de los ICIs, al modificar la respuesta inmune antitumoral y afectar el pronóstico general en pacientes con neoplasias malignas(41). En este contexto, la disfunción de los linfocitos T puede atribuirse a mecanismos de tolerancia periférica, incluyendo anergia, supresión y agotamiento celular(42). Este agotamiento inmunológico, caracterizado por la expresión sostenida de receptores inhibitorios, puede ser revertido mediante el uso de ICIs los cuales bloquean la interacción entre dichos receptores y sus ligandos, siendo el eje PD-1/PD-L1 el más ampliamente estudiado en los TILs(23).

A pesar de que un número importante de pacientes con RCC logra una respuesta clínica completa tras la terapia con ICIs, una proporción considerable presenta únicamente respuestas parciales o incluso ausencia de respuesta, acompañadas en algunos casos de toxicidad sistémica significativa(25). Esta heterogeneidad terapéutica ha impulsado una intensa búsqueda de biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta a ICIs. Dichos marcadores pueden clasificarse en dos grandes grupos: aquellos que reflejan la progresión de la enfermedad y aquellos que predicen la respuesta a tratamientos específicos, como la inmunoterapia o terapias dirigidas(24).

Por lo tanto, contar con herramientas que permitan anticipar qué pacientes se beneficiarán más del tratamiento con ICIs y cuáles tienen mayor riesgo de presentar eventos adversos es esencial para un tratamiento personalizado en RCC. Sin embargo, actualmente no existen métodos estandarizados ni validados para evaluar

de manera integral la relación riesgo/beneficio de estas terapias.

2.3 Factores de Riesgo para RCC

Diversos factores de riesgo se han asociado al desarrollo de RCC, incluyendo alteraciones genéticas, características demográficas, antecedentes heredofamiliares, así como exposición a ciertos fármacos y sustancias químicas. A pesar de que la mayoría de los casos de RCC son esporádicos, un porcentaje importante puede explicarse por mutaciones germinales y síndromes hereditarios bien definidos(43).

En cuanto a la epidemiología, el RCC es más frecuente en adultos mayores, con una edad promedio al diagnóstico de entre 50 a 70 años. Su incidencia es aproximadamente 1.5 veces más frecuente en hombres que en mujeres, mientras que, en términos étnicos, es más común en nativos americanos y afroamericanos, y en menor en asiático-americanos(8).

Entre los síndromes hereditarios asociados al desarrollo del RCC se destacan: Enfermedad de Von Hippel-Lindau (VHL): mutaciones en el gen VHL; responsable del 5% de los casos de ccRCC; se asocia a tumores bilaterales y multifocales a edades tempranas(44). Síndrome de predisposición tumoral asociada a BAP1: afecta principalmente al ccRCC, con diagnóstico a edades jóvenes y potencial malignidad elevada(45). Carcinoma papilar renal hereditario (HPRC): asociado a mutaciones en el oncogén MET(46). Síndrome de Birt-Hogg-Dubé: mutaciones en el gen FLCN, asociado a tumores híbridos oncocíticos y, en menor frecuencia, a ccRCC y pRCC(47). Síndrome de Cowden: incrementa el riesgo de múltiples neoplasias, incluyendo RCC, con un riesgo estimado del 34%(48).

En conjunto, estos síndromes hereditarios representan entre el 2% y el 4% de todos los casos de RCC, requiriendo vigilancia especializada, diagnóstico genético y,

en la mayoría de los casos, un enfoque quirúrgico(43).

2.4 Tratamientos para RCC

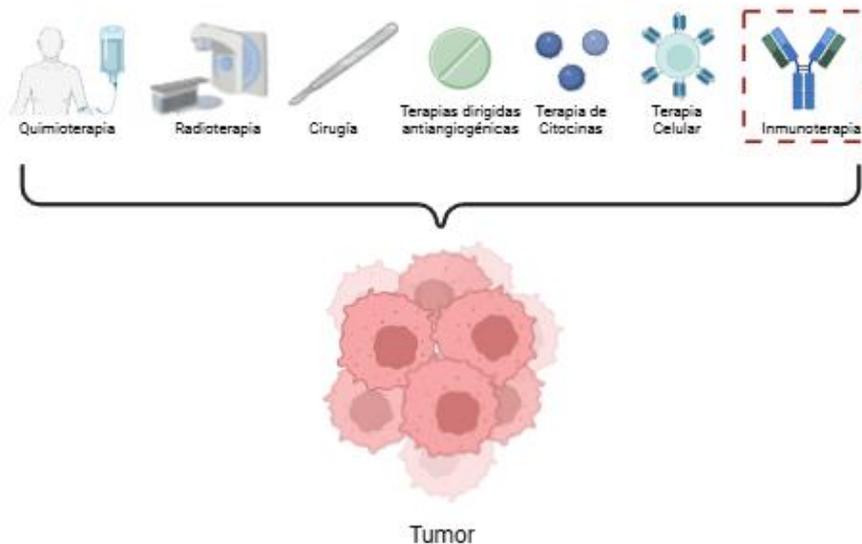
Los tratamientos actuales para el RCC incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia citotóxica, terapias dirigidas e inmunoterapia. La tasa de supervivencia en el RCC depende directamente del estadio clínico de la enfermedad. Las tasas de supervivencia a 5 años son de aproximadamente 93%, 72%, 40% y 12% para los estadios I al IV, respectivamente(49). Sin embargo, existen otros factores que influyen en el pronóstico general, como el grado nuclear, el tipo histológico y la presencia de necrosis tumoral(50). Afortunadamente, el uso generalizado de estudios de imagen abdominal ha contribuido a un mayor diagnóstico en estadios tempranos; los tumores detectados de forma incidental suelen estar asociados a un mejor pronóstico. Actualmente, entre el 60% y 70% de los casos de RCC se diagnostican inicialmente de forma incidental.

En casos localizados, la cirugía puede ser curativa. Las opciones quirúrgicas varían desde la nefrectomía parcial hasta la radical, incluyendo la resección de tejidos perirrenales más allá de la fascia de Gerota. En casos seleccionados, los enfoques mínimamente invasivos permiten preservar la función renal, reducir morbilidad y acortar la estancia hospitalaria(51).

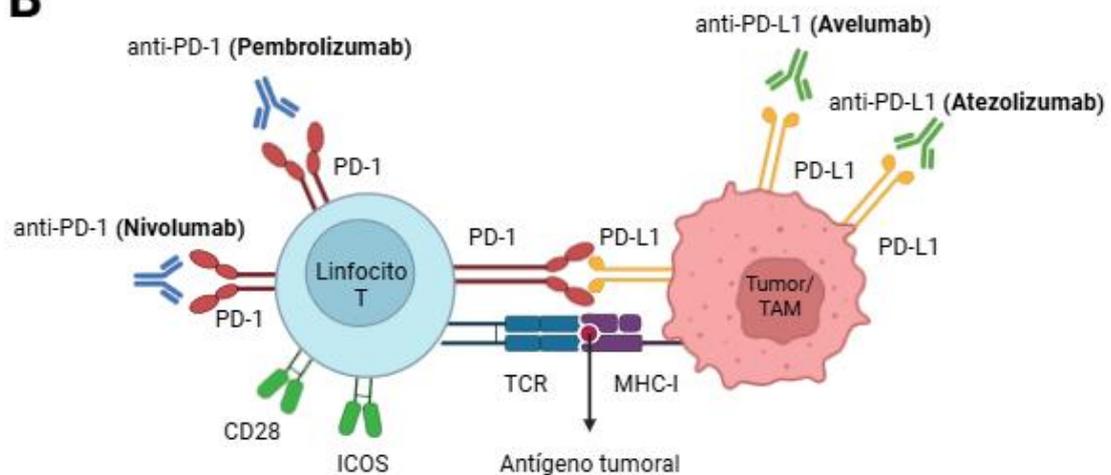
La radioterapia (RT) se utiliza como tratamiento adyuvante o paliativo en el RCC. Desde una perspectiva inmunológica, el término “efecto abscopal” hace referencia al fenómeno mediante el cual la radiación ionizante produce efectos en sitios distantes al tejido irradiado. Inicialmente observado en tejidos normales, este concepto ha evolucionado para describir la regresión de lesiones metastásicas no irradiadas directamente, lo cual sugiere que la RT localizada pueda desencadenar una respuesta

antitumoral sistémica, mediada por el sistema inmunológico(52). Los diferentes

A



B



tratamientos para RCC se pueden observar en la Figura 1.

Figura 1. Estrategias terapéuticas y mecanismo de acción de los inhibidores de punto de control inmunitario PD-1/PD-L1 en el tratamiento del cáncer

(A) Estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer, incluyendo quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapias dirigidas antiangiogénicas, terapia con citocinas, terapia celular e inmunoterapia (resultada en rojo). (B) Mecanismo de acción de los inhibidores de punto de control inmunitario PD-1/PD-L1. La interacción entre PD-1 en los linfocitos y PD-L1 en las células tumorales o en los macrófagos asociados al tumor (TAM) inhibe la respuesta inmune (1). Los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab) bloquean PD-1 en los linfocitos (2a), mientras que los anticuerpos anti-PD-L1 (Avelumab, Atezolizumab) bloquean PD-L1 en las células tumorales o en los TAM (2b), restaurando así la respuesta inmune contra el tumor.

2.5 Terapias Dirigidas

Las terapias dirigidas incluyen: a) inhibidores de tirosina quinasa (TKIs), pequeñas moléculas administradas por vía oral que interfieren con vías de señalización activadas por quinasas de tirosina, y b) inhibidores del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFi). Estas enzimas suelen estar hiperactivas en las células cancerosas, lo que conduce a un crecimiento descontrolado y a la progresión tumoral. Los TKIs ofrecen un enfoque terapéutico prometedor y una toxicidad menor en comparación con la quimioterapia convencional(53).

Los TKs (tirosina quinasas) son enzimas que facilitan la transferencia de fosfatos desde el trifosfato de adenosina (ATP) a proteínas específicas, modulando así señales de crecimiento celular y participando en diversos procesos reguladores normales. La activación aberrante de las TKs puede contribuir a la proliferación de células tumorales, efectos anti apoptóticos, angiogénesis y metástasis(54).

Los TKIs pueden clasificarse en reversibles o irreversibles. Los TKIs irreversibles forman un enlace covalente y bloquean el sitio de unión del ATP, mientras que los TKIs reversibles se subdividen en cuatro tipos: los inhibidores tipo I compiten por el sitio de unión del ATP en TKs activas, los inhibidores tipo II se unen a quinasas inactivas, los inhibidores tipo III interactúan con regiones fuera de la unión del ATP, y los inhibidores tipo IV se unen a sitios alostéricos separados del sitio de unión del ATP(55).

Entre los TKIs aprobados para el tratamiento del RCC se encuentran sunitinib, pazopanib, axitinib, cabozantinib y lenvatinib. Sunitinib es uno de los tratamientos de primera línea para el ccRCC metastásico(54). Estos fármacos han demostrado eficacia en la detención de la progresión tumoral y en la mejora de la supervivencia global.

No obstante, los TKIs pueden producir efectos adversos como fatiga, náuseas,

diarrea, hipertensión y erupciones cutáneas. En algunos casos, estos efectos pueden ser graves y requerir ajustes de dosis o la suspensión del tratamiento. Además, estas terapias no son curativas y es posible que la enfermedad progrese a pesar del tratamiento. Por ello, se continúa investigando en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

2.6 Inmunoterapia con Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra CTLA-4, PD-1 o su ligando PD-L1 han emergido como una estrategia terapéutica exitosa para el tratamiento del RCC avanzado(56). PD-1 y CTLA-4 son receptores inhibidores expresados en la membrana de las células T que regulan negativamente su activación, como un mecanismo fisiológico para prevenir la sobreestimulación inmune y el daño tisular. Sin embargo, numerosos tumores inducen la expresión de ligandos para estos receptores, bloqueando las funciones efectoras antitumorales de los linfocitos T y favoreciendo la progresión del cáncer. El uso de anticuerpos que inhiben estas interacciones permiten restaurar la función de las células T y potenciar la inmunidad antitumoral(57).

Entre los ICIs, el anticuerpo anti-PD1, nivolumab, fue el primero aprobado para RCC avanzado en 2015, con una tasa de supervivencia global del 25% en comparación con everolimus(58). Actualmente, existen cinco anticuerpos aprobados para el tratamiento del RCC avanzado: los inhibidores de PD-1 (pembrolizumab y nivolumab), inhibidor de CTLA-4 (ipilimumab) y los inhibidores de PD-L1 (atezolizumab y avelumab). La combinación de ipilimumab + nivolumab está aprobada como tratamiento de primera línea en pacientes con RCC metastásico(59).

A pesar del éxito clínico de los ICIs, las tasas de respuesta continúan siendo limitadas en algunos pacientes con RCC. Las monoterapias pueden inducir resistencia inmunológica compensatoria a través de la sobreexpresión de otros puntos de control inmunitario. Nuevos blancos terapéuticos como: LAG-3 (Gen 3 de Activación de Linfocitos), TIM-3 (Inmunoglobulina de Células T con Dominio de Mucina 3) y TIGIT (Inmunorreceptor de Células T con Dominios de Inmunoglobulina e ITIM), los cuales se están evaluando en ensayos clínicos. La co-expresión de estos receptores se ha observado tanto en modelos preclínicos como en pacientes con RCC, lo cual respalda su posible aplicación en terapias combinadas(60).

2.7 Predictores de Respuesta Clínica a la Inmunoterapia

El uso de inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICIs) ha revolucionado el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, entre ellos incluido el RCC. Sin embargo, su eficacia clínica varía significativamente entre pacientes. A pesar de los beneficios terapéuticos observados, los ICIs están asociados con una tasa media de mortalidad del 1%, principalmente atribuible a eventos adversos relacionados con la activación inmunitaria sistémica, conocidos como efectos adversos inmunomediados(25).

Desde la publicación de los resultados del estudio CheckMate-025, que demostró beneficios clínicos del uso de nivolumab en pacientes con RCC avanzado, el interés por identificar biomarcadores predictivos de respuesta a ICIs ha aumentado considerablemente. Esta necesidad surge del hecho de que la respuesta clínica a los ICIs no es predecible de forma uniforme, y muchos pacientes no experimentan un beneficio terapéutico significativo(58).

Entre los biomarcadores más consistentes hasta la fecha, destacan tres:

1. Proteína C-reactiva (CRP)

La CRP es un reactante de fase aguda ampliamente utilizado para evaluar inflamación sistémica. Dada la estrecha relación entre inflamación y carcinogénesis, su utilidad como marcador pronóstico ha sido propuesta. Diversos estudios han demostrado que niveles bajos de CRP, así como niveles normalizados bajos después de la administración de las primeras dosis de ICIs, se asocian con una mayor probabilidad de respuesta clínica favorable(61,62).

2. Linfocitos Infiltrantes de Tumor (TILs)

El perfil inmunológico de los TILs ha mostrado valor pronóstico en varios tipos de cáncer. En el caso del RCC, la infiltración por leucocitos inflamatorios, especialmente linfocitos CD8⁺, se ha correlacionado con mejores respuestas a la inmunoterapia(12,13,15). Sin embargo, en RCC los TILs también pueden presentar fenotipos disfuncionales, lo que puede limitar su utilidad como biomarcador único(12).

3. Expresión basal de marcadores de agotamiento en tejido tumoral

La expresión de receptores inhibitorios en linfocitos T, tales como PD-1, LAG-3, TIM-3 y CTLA-4, refleja un estado de agotamiento celular inducido por estimulación antigénica crónica. Aunque el eje PD-1/PD-L1 ha sido extensamente estudiado, la expresión basal de PD-L1 no ha demostrado consistencia como marcador predictivo en RCC. En cambio, la expresión de TIM-3 se ha correlacionado con mejor capacidad predictiva de respuesta clínica(63,64).

Estudios recientes han propuesto una serie de biomarcadores emergentes para predecir la respuesta clínica a la inmunoterapia con inhibidores de puntos de

control inmunitarios (ICIs) en pacientes con RCC(65). Uno de los hallazgos más relevantes es la disminución del ADM tumoral circulante (ctDNA), que se ha asociado con una reducción en la carga tumoral y, por ende, con una mejor respuesta terapéutica(66). Asimismo, se ha observado un incremento en la expresión de ciertas quimiocinas, como CXCL14, vinculadas con una mayor activación inmune local, lo que podría favorecer la infiltración linfocitaria y potenciar la eficacia de la inmunoterapia(67).

Otros estudios han identificado el aumento de microARNs circulantes, como miR-22 y miR-24, cuyas funciones están relacionadas con la regulación de la respuesta inmune y de los mecanismos apoptóticos(68). Además, la presencia de firmas transcripcionales inmunogénicas, determinadas mediante técnicas de secuenciación de ARN en tejido tumoral, ha demostrado reflejar un microambiente inmunológico favorable que podría potenciar la actividad de los linfocitos T e incrementar la sensibilidad al bloqueo de puntos de control(69).

Por otro lado, también se han descrito biomarcadores asociados a una menor eficacia de los ICIs o al desarrollo de efectos adversos inmunomediados. Por ejemplo, niveles elevados de interleucina-8 (IL-8) se han relacionado con un pronóstico desfavorable y pobre respuesta terapéutica, debido a su papel en el reclutamiento de células inmunosupresoras derivadas de la médula ósea (MDSCs), las cuales inhiben la actividad efectora de los linfocitos T(70). De igual forma, la disminución de Mir-146a, un microARN involucrado en el control negativo de la inflamación, se ha vinculado con una mayor susceptibilidad al desarrollo de eventos adversos relacionados con la inmuno-activación sistémica(69).

Desde el punto de vista técnico, muchos de estos biomarcadores, como las firmas transcriptómicas o los niveles de expresión de receptores inmunitarios,

requieren la obtención de tejido tumoral para su análisis mediante inmunohistoquímica o secuenciación, lo cual no siempre es viable, especialmente en pacientes en los que la biopsia no es segura o el tumor no es accesible. En este contexto, los biomarcadores periféricos han cobrado gran relevancia como alternativas no invasivas(71).

Evaluaciones realizadas en sangre periférica han mostrado que biomarcadores como ctDNA, microARNs, IL-8, CRP y eosinófilos circulantes pueden aportar información valiosa sobre la probabilidad de respuesta clínica. De manera particular, se ha reportado que un recuento elevado de eosinófilos en sangre se asocia con mejores desenlaces clínicos, lo cual resulta de interés dada la función inmunorreguladora de estas células en procesos inflamatorios y en la vigilancia inmunológica antitumoral(24).

En conjunto, la identificación y validación de biomarcadores que permiten predecir con precisión la respuesta a la inmunoterapia representa una prioridad en la investigación traslacional en RCC.

3. Planteamiento del Problema

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, constituyendo un importante problema de salud pública. Se caracteriza por el crecimiento descontrolado y la diseminación de células anómalas, lo que puede afectar diversos órganos y sistemas⁽¹⁾.

Entre múltiples neoplasias malignas descritas, el carcinoma de células renales (RCC) comprende un grupo heterogéneo de tumores originadas en el parénquima renal que representa entre el 2-3% de todas los tumores malignos en adultos⁽²⁾. En 2022, se reportaron a nivel mundial 434,419 nuevos casos y 155,702 muertes atribuibles a esta enfermedad⁽⁷²⁾. La incidencia del RCC alcanza su máximo en la sexta década de la vida⁽³⁾ y en su forma avanzada, presenta una supervivencia media de apenas 6 a 10 meses, con una tasa de supervivencia a dos años del 20%⁽⁴⁾.

El aumento en la detección de lesiones tempranas de RCC en la mayoría de los pacientes se atribuye al uso generalizado de técnicas de imagen como la tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RM)⁽⁴³⁾. Desde el punto de vista histológico, aproximadamente el 80% de los casos corresponden al subtipo de células claras (ccRCC), caracterizado por una elevada actividad metabólica y una resistencia intrínseca a la mayoría de las quimioterapias citotóxicas^(5,30). Debido a esta resistencia general tanto a la quimioterapia citotóxica como a la radioterapia, el RCC ha sido clásicamente considerado un tumor inmunogénico⁽⁷³⁾.

Cerca del 50% de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas, lo cual ha impulsado el uso de terapias dirigidas, como los inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y los inhibidores de puntos de control

inmunitario (ICIs), como parte del tratamiento de primera y segunda línea. Actualmente, la FDA ha aprobado tres ICIs dirigidos contra el receptor de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), su ligando (PD-L1), y la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4)(74–77).

A pesar de la disponibilidad de estas terapias, existen limitaciones en el conocimiento sobre la inmunidad antitumoral en el RCC. En particular, no existe un consenso para predecir con exactitud la respuesta individual a estas terapias inmunológicas. A pesar de que se han propuesto múltiples biomarcadores, estos se han centrado principalmente en la cuantificación de leucocitos infiltrantes en tejido tumoral(12,13) y en la expresión de PD-L1. Los ICIs actúan restaurando la función efectora de los linfocitos, tanto en el microambiente tumoral como en circulación, surge la hipótesis de que los mecanismos de disfunción inmunitaria podrían manifestarse a nivel sistémico. Por lo tanto, la evaluación cuantitativa de biomarcadores asociados al agotamiento inmunológico, tanto en sangre periférica como en tejido tumoral, podría ofrecer herramientas predictivas más integrales para guiar el tratamiento personalizado en pacientes con ccR

4.JUSTIFICACIÓN

La inmunoterapia con inhibidores de puntos de control (ICI) se ha consolidado como una de las principales estrategias terapéuticas en el tratamiento del RCC. Actualmente no se conocen biomarcadores predictivos para seleccionar a los pacientes candidatos al uso de esta terapia. La pieza tumoral obtenida por nefrectomía ha permitido identificar la presencia de estos marcadores, no se ha determinado si es posible detectarlos también en sangre venosa periférica.

5.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

5.1 Pregunta de Investigación

¿Existe relación entre la expresión de marcadores de agotamiento en linfocitos infiltrantes de tumor y linfocitos en sangre periférica en pacientes con CA renal?

5.2 Hipótesis

Los marcadores de agotamiento presentes en el tumor se identifican en linfocitos T circulantes.

6.OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Identificar marcadores de agotamiento en leucocitos de tejido tumoral y en sangre venosa periférica en pacientes con carcinoma de células renales.

6.2 Objetivos Específicos

1. Cuantificar la expresión de marcadores de agotamiento CTLA-4 y PD-L1 en tejido tumoral por inmunohistoquímica.
2. Analizar la expresión de PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3 en tejido renal adyacente y tejido tumoral de pacientes con ccRCC por medio de citometría de flujo.
3. Analizar la expresión de PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3 en sangre venosa periférica en pacientes con ccRCC por medio de citometría de flujo.
4. Evaluar de PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3 pre y posterior a la cirugía por medio de citometría de flujo.

7. ESTRATEGÍA GENERAL

El presente estudio tuvo como objetivo de identificar marcadores de agotamiento en leucocitos presentes en tejido tumoral y sangre venosa periférica de pacientes con ccRCC, se diseñó una estrategia experimental que integró procedimientos clínicos, histopatológicos, inmunohistoquímicos y citométricos. Esta aproximación multidimensional buscó caracterizar el estado funcional del sistema inmune local y sistémico, con énfasis en la expresión de receptores inhibitorios asociados al agotamiento inmunológico.

El estudio incluyó pacientes con diagnóstico confirmado de ccRCC localizado, sometidos a nefrectomía radical en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, así como un grupo control compuesto por sujetos sanos emparejados por edad y sexo. Se recolectaron muestras biológicas en dos puntos clave: antes de la cirugía (sangre venosa periférica) y durante el seguimiento clínico (10 a 12 meses después de la nefrectomía), además de muestras de tejido tumoral y tejido renal adyacente obtenidas tras el análisis histopatológico.

La evaluación de marcadores inmunológicos en tejido se realizó mediante inmunohistoquímica automatizada, utilizando anticuerpos dirigidos contra CD3, PD-L1 y CTLA-4, con escaneo digital de las laminillas y análisis cuantitativo por software especializado. Paralelamente, se desarrolló un protocolo de digestión mecánico-enzimática estandarizada para la disociación de tejido tumoral y adyacente, lo que permitió la obtención de suspensiones celulares viables para el análisis por citometría de flujo. En sangre venosa periférica y tejido disociado se analizaron poblaciones de linfocitos T (CD4⁺, CD8⁺ y NKT) y células mieloides, así como la expresión de receptores

de agotamiento inmunológico (PD-1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3) y de PD-L1 en células mieloides.

Los datos fueron evaluados mediante adquisición de 100,000 eventos por muestra en el citómetro de flujo LSR Fortessa, y analizados con criterios estandarizados.

Finalmente, se aplicaron métodos estadísticos apropiados para comparar las poblaciones celulares y la expresión de marcadores entre muestras prequirúrgicas, postquirúrgicas y controles, así como explorar correlaciones con variables clínicas relevantes.

8.MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Pacientes y muestras de tejido

Los criterios de inclusión comprendieron a todos los pacientes que se sometieron a nefrectomía radical por ccRCC localizado en el Servicio de Urología. Se reclutaron en el estudio veinte pacientes diagnosticados con ccRCC y diez sujetos control del mismo servicio, emparejados por edad y sexo. La investigación se llevó a cabo en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” entre enero de 2022 y enero de 2024. El estudio fue aprobado por el comité de ética institucional (número de aprobación: Protocolo IN23-00002), y todos los participantes firmaron un consentimiento informado previo a su inclusión en el estudio.

Tabla 1. Criterios de Inclusión y Exclusión

Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
Pacientes con diagnóstico de RCC localizado	Pacientes embarazadas
Ambos sexos	Pacientes con tratamiento de inmunosupresores o con diagnóstico de VIH
Mayores de 18 años	Pacientes con RCC metastásico

Se recolectaron 4mL de sangre venosa periférica al día previo a la nefrectomía programada y nuevamente tras un seguimiento clínico de 10 a 12 meses. Posterior análisis histopatológico, se obtuvieron 2g de tejido tumoral renal de la zona central del tumor y 2g de tejido renal adyacente, definidos macroscópicamente, en cada riñón extirpado por nefrectomía, además de 4mL adicionales de sangre venosa periférica

para su análisis de citometría. Se excluyeron del estudio aquellos pacientes con enfermedad metastásica y/o variantes histológicas distintas al ccRCC (Tabla 1). Los parámetros bioquímicos sanguíneos de los pacientes fueron reevaluados entre 8 y 12 meses posteriores a la cirugía.

8.2 Inmunohistoquímica

Se seleccionaron secciones representativas de especímenes quirúrgicos de ccRCC, las cuales fueron fijadas en formalina tamponada al 10% (solución de formaldehído en buffer fosfato, pH neutro) y posteriormente incluidas en parafina (medio hidrofóbico utilizado para la infiltración y endurecimiento tisular previo al corte.) Se seleccionaron un total de veinte casos con base en criterios morfológicos indicativos de ccRCC, y únicamente estas muestras fueron sometidas a una evaluación exhaustiva con parámetros histológicos, como multifocalidad, necrosis y características sarcomatoides.

Se cortaron secciones de 3 a 5µm de espesor utilizando un micrótopo y se colocaron cuidadosamente las secciones en los portaobjetos.

Se introdujeron los portaobjetos en un horno a 60°C durante 30 minutos y se realizó el desparafinado con tres cambios de xilol durante 5 minutos cada uno. Para la rehidratación se pasaron las laminillas por una serie de alcoholes: alcohol absoluto (2 veces, 3 minutos cada una), alcohol al 96% (2 minutos) y alcohol al 70% (2 minutos) para posteriormente lavar con agua destilada.

Las secciones representativas de tejido fijado en formalina e incluido en parafina fueron utilizadas para análisis posteriores. La evaluación del grado nuclear se realizó conforme al sistema de clasificación de la Sociedad Internacional de

Patología Urológica (ISUP), de acuerdo con la OMS Clasificación de Tumores.

Para el procedimiento de tinción, los portaobjetos fueron lavados inicialmente con agua jabonosa, seguidos de tres enjuagues con agua destilada, enjuague con metanol y secado al aire a temperatura ambiente. La inmunotinción se realizó utilizando el sistema automatizado Ventana (modelo Benchmark ULTRA, No 05342716001; Ventana Medical Systems). La recuperación antigénica se realizó con la solución Discovery CC1 (Cat. 950-500, CC1, prediluida, pH 8.0; Roche Diagnostics) durante 64 minutos a 100°C.

De acuerdo con el protocolo del sistema Ventana, se realizaron pasos de bloqueo de actividad peroxidasa endógena de manera automatizada.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo monoclonal de ratón anti-CTLA-4 (Cat. No. BSB 2880, clon BSB-88; Bio SB), anticuerpo monoclonal de conejo anti-PD-L1 (Cat. No. 790-4905, clon SP263; Ventana Medical Systems) y anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD3 (Cat. No. 790-4341, clon 2GV6; Ventana Medical Systems), todos diluidos a 1:50 y aplicados durante 32 minutos a 37°C. La reacción secundaria se realizó con el kit de detección Ventana OptiView DAB (Cat. No. 760-099; Ventana Medical Systems) para anti-CTLA-4 y anti-PD-L1, y el kit de detección AEC (Cat. No. 760-020; Ventana Medical Systems) para anti-CD3 durante 12 minutos adicionales.

Todos los procedimientos de tinción se realizaron meticulosamente siguiendo las instrucciones del fabricante para garantizar la consistencia y reproducibilidad de los resultados. El análisis clínico fue realizado por tres patólogos clínicos. Las laminillas completas fueron digitalizadas utilizando el escáner de portaobjetos Ventana DP200 (No. 08303916001; Ventana Medical Systems), y el análisis posterior fue realizado por los mismos tres patólogos clínicos.

8.3 Análisis digital en inmunohistoquímica

A partir de los escaneos completos de laminillas, se seleccionaron aleatoriamente entre 8 y 10 imágenes a 40x para su análisis detallado. Las laminillas teñidas por inmunohistoquímica fueron analizadas mediante dos métodos: análisis clínico convencional por patólogos calificados (evaluando el porcentaje de tejido positivo) y análisis digital de las imágenes escaneadas utilizando el software QuPath v0.5.1 para Windows(78). El análisis digital fue realizado por un investigador no patólogo capacitado, quien evaluó el porcentaje de células positivas (Figura 2).

Todos los análisis se llevaron a cabo en toda la extensión del núcleo tumoral, debido a la baja celularidad del estroma circundante. El porcentaje de células positivas se calculó utilizando la fórmula:

Porcentaje de células positivas = [Número de células positivas / (Número de células positivas + Número de células negativas)] x 100

8.4 Digestión de tejidos

Para el análisis tisular, se procesaron mecánica y enzimáticamente 2g de tejido tumoral y 2g de tejido renal adyacente en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS). Se trasladaron los tejidos y líquido a un tubo Falcon de 15ml.

Los tejidos se sometieron a una digestión enzimática con una solución que contenía colagenasa (500µl) (Cat. C9891; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a a concentración indicada por el fabricante, junto con hialuronidasa 10X (Cat. H3506; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 30 minutos. Los tubos Falcon se colocaron en el IncuShaker a 37°C en agitación a 200RPM durante 30 minutos.

Al término de la incubación se agregaron 10ml de DPBS frío y se centrifugó a

200 xg durante 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se suspendió. Posteriormente se agregaron 100µl de DNasa (Cat. 10104159001; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se agregaron 750µl de tripsina (Cat. 15090-046; Gibco, Waltham, MA) y EGTA (Cat. E3889; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) que se incubaron a temperatura ambiente durante un minuto.

Se agregaron 10ml de DPBS-FBS al 2% frío y se centrifugó a 200xg durante 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se suspendió.

A continuación, se preparó la dispasa (25mg en 5ml de DPBS) (Cat. 17105041; Gibco, Waltham, MA), Se agregó 1.5ml de la solución de dispasa y se incubó durante 5 minutos. Se agregó nuevamente 50µL de DNasa más 450µl de DPBS-FBS al 2% y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Se agregaron 2ml de una solución de lisis de eritrocitos a base de cloruro de amonio durante 10 minutos. Se centrifugó a 200xg por 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió.

Finalmente se eliminó el material particulado mediante filtración con un tamiz celular de 70 µm (Falcon, Cat. 352350, Miami, FL). Las células recuperadas fueron cuantificadas mediante cámara de Neubauer, utilizando una mezcla de 90µL de azul de tripano al 0.4% y 10µL de la suspensión celular. Posteriormente, las células viables fueron sometidas a tinción para su análisis por citometría de flujo.

8.5 Citometría de Flujo

Se tiñó una suspensión de 1×10^6 células de tejido para marcadores de linfocitos y células mieloides durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para las muestras de sangre, se utilizaron 50 µL de sangre venosa periférica total, que se tiñeron directamente y luego se sometieron a lisis de eritrocitos durante 20 minutos.

Para las muestras de tejido se utilizaron 100µL para cada tubo y se añadieron 30µL del cóctel de anticuerpos para la serie mieloide y 60µL para la serie linfoide. Se incubaron en oscuridad durante 15 minutos. Posteriormente se añadieron 2mL de PBS para cada uno de los tubos y se utilizó el vórtex. Se centrifugaron a 1300rpm durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Los tubos se resuspendieron en 300µL de PBS para leerlos en el equipo de citometría de flujo.

El cóctel de anticuerpos para linfocitos contenía: CD8 FITC (BD Cat. 555366, clon RPA-T8, 20 µL/muestra), PD-1 CD279 PE (BD Cat. 557946, clon MIHA, 20 µL/muestra), C4 BV605 (BD Cat. 562658, clon RPA-T4, 5 µL/muestra), CD3 APC-Cy7 (BD Cat. 557832, clon SK7, 5 µL/muestra), TIM-3 Alexa Fluor 647 (BD Cat. 56558, clon 7D3, 5 µL/muestra), LAG-3 PE (BD Cat. 565718, T47-530, 5 µL/muestra), CTLA-4 BV421 (BD Cat. 562743, clon BNI3, 5 µL/muestra).

El cóctel de anticuerpos para células mieloides incluyó: CD14 Alexa Flour (BD Cat. 557700, clon M2E2, 5 µL/muestra), PD-L1 BV421 (BD Cat. 563738, clon MIH1, 5 µL/muestra), CD45 PE (BD Cat. 568136, HI30, 5 µL/muestra) y solución de viabilidad 7-AAD (BD Cat. 559925, 5 µL/muestra).

Para cada muestra se adquirieron 100,000 eventos en el citómetro de flujo LSRFortessa (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Los porcentajes de células CD4⁺, CD8⁺ y NKT se calcularon con respecto a la población CD3⁺. Asimismo, los porcentajes de linfocitos (CD14⁻SSClow), monocitos (CD14⁺SSClow), neutrófilos (CD14⁻SSChigh) y macrófagos se calcularon con respecto a CD45⁺.

La fluorescencia de PD-1, LAG-3, TIM-3 y CTLA-4 se evaluó como intensidad media de fluorescencia (MFI) en las siguientes poblaciones: CD3⁺/CD4⁺ (células CD4), CD3⁺/CD8⁺ (células CD8) y CD3⁺/CD4⁻/CD8⁻ (células NKT). La fluorescencia de PD-L1 se evaluó en células con CD45⁺/CD14⁺ (monocitos), y CD45⁺/CD14⁻SSChigh (granulocitos) (Figura 4).

8.6 Análisis Estadístico

Tras confirmar la distribución paramétrica de los datos, se utilizaron pruebas t no pareadas o ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni para comparaciones entre dos o tres grupos, respectivamente. El análisis estadístico se realizó con los programas GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, Boston, MA, EE.UU.) y Microsoft Excel. Para el análisis de correlación se empleó la prueba de Pearson. Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$. Las medidas de tendencia central y dispersión se reportaron en las leyendas de las figuras.

9. RESULTADOS

9.1 Características Clínicas de los Participantes

Las características de los pacientes estudiados se resumen en la Tabla 1. La edad promedio de los pacientes fue de 59.4 ± 8 años. La mayoría de los pacientes fueron clasificados en estadio 3 en la escala pTNM y el 70% de los pacientes presentaron tumores con un grado nuclear ISUP >3. El grupo control incluyó participantes de la misma edad y comorbilidades (Tabla 2).

Tabla 2. Características de la población

Variable	Parámetro	Controles (N=10)	ccRCC (N=20)	P-valor
Edad (años)	Media (\pm D.E.)	60.8 (\pm 6.0)	59.4 (\pm 8.0)	0.61*
	Min.	51	44	
	Max.	72	71	
Sexo, N (%)	Femenino	6 (60%)	6 (30%)	NA
	Masculino	4 (40%)	14 (70%)	
pTNM, N	Estadio 1	NA	6 (30%)	NA
	Estadio 2		2 (10%)	
	Estadio 3		10 (50%)	
	Estadio 4		2 (10%)	
Grado Nuclear, N (%)	Grado 2	NA	6 (30%)	NA
	Grado 3		9 (45%)	
	Grado 4		5 (25%)	
Tamaño Tumoral (cm)	Media (\pm D.E.)	NA	8.2 (\pm 3.9)	NA
Necrosis, N (%)	Área > 50%	NA	2 (10%)	NA
	Área < 50%		18 (90%)	
Infiltración tumoral, N (%)	Positivo	NA	4 (20%)	NA
	Negativo		16 (80%)	

*Controles vs RCC, prueba T no pareada

9.2 Análisis de inmunohistoquímica del infiltrado inmune en tejido tumoral de pacientes con ccRCC

En la imagen histológica teñida con hematoxilina y eosina (HyE) (Fig. 2) se observa la interfase entre el tejido renal adyacente y la neoplasia de ccRCC. Esta zona de transición muestra un denso infiltrado inflamatorio crónico compuesto por células mononucleares, acompañado de fibrosis intersticial y glomérulos esclerosados. Los

glomérulos, visibles como estructuras redondeadas teñidas de rosa, presentan esclerosis con retracción y colapso del penacho glomerular, indicativos de daño isquémico y pérdida funcional. Entre ellos se identifican túbulos renales con luz abierta, intersticio y vasos sanguíneos. Justo después de la interfase, se distingue la zona tumoral con las características células de citoplasma claro propias del ccRCC. Esta imagen resalta la relación directa entre el parénquima renal normal, el daño inflamatorio crónico, y la proliferación neoplásica.

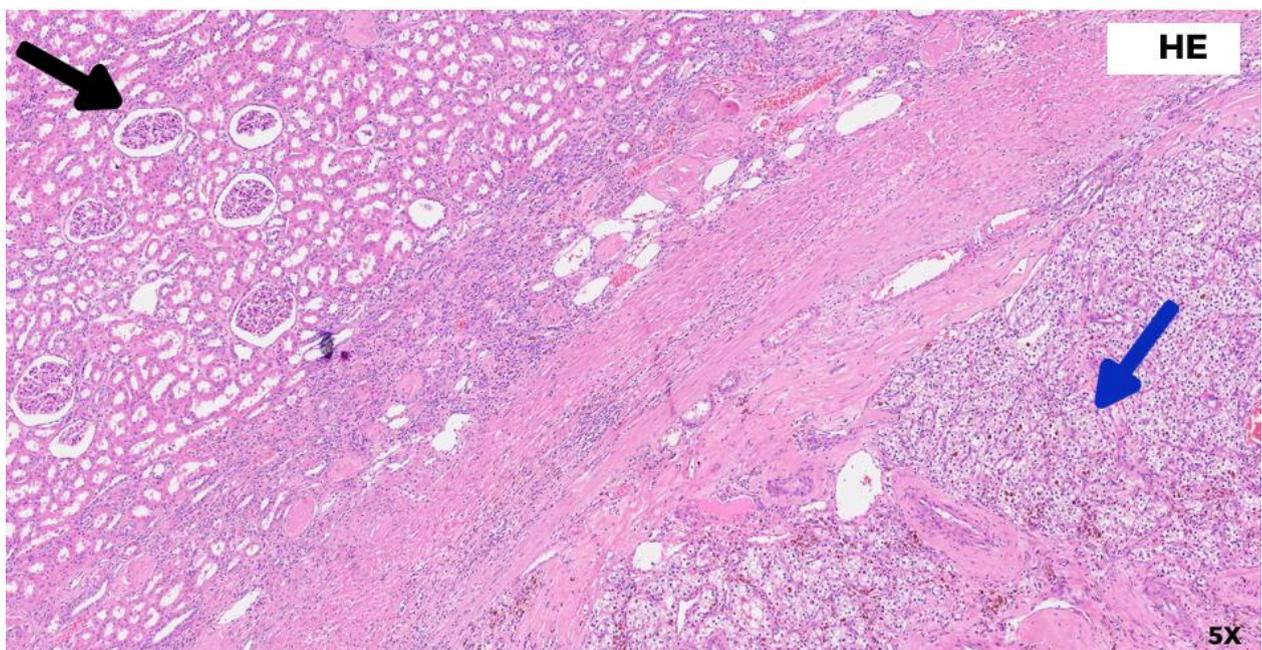


Figura 2. Corte teñido con H&E

Se observa la interfase entre el tejido renal y ccRCC, evidenciando inflamación crónica, fibrosis, glomerulos esclerosados e infiltrado mononuclear adyacente al área tumoral. La flecha negra indica glomerulos esclerosados dentro del parénquima renal no tumoral, mientras que la flecha azul señala el área tumoral correspondiente al ccRCC. Ejemplo representativo de una muestra histológica de paciente con ccRCC diagnosticado. Aumento 5X.

Se tiñeron secciones seriadas de tejido tumoral de RCC para los marcadores CD3, CTLA-4 y PD-L1. La tinción de IHQ para CD3 (Fig.2), utilizando cromógeno AEC (color rojo), revela una infiltración elevada de linfocitos T en el tejido tumoral de un paciente con ccRCC. Las células positivas se observan como pequeños elementos redondeados con citoplasma rojo y núcleo azul, distribuidos entre las células tumorales claras, las cuales no expresan el marcador (negativas). Estas células tumorales se

reconocen por su citoplasma amplio y claro y sus núcleos teñidos con hematoxilina. La distribución de los linfocitos CD3 sugiere un patrón de infiltración no organizada, característico del microambiente tumoral inmunorregulado de ccRCC.

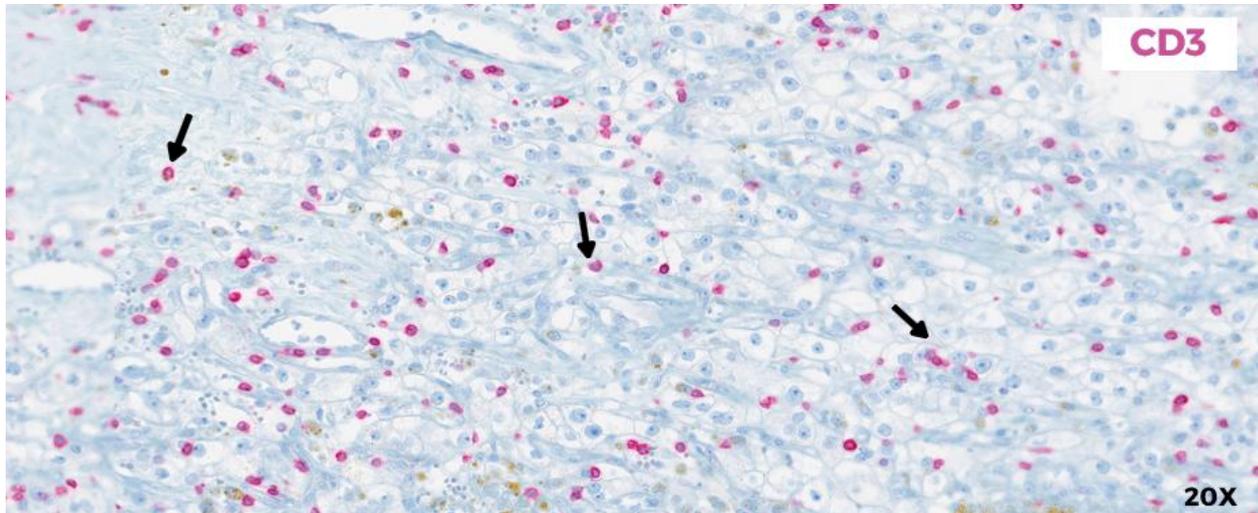


Figura 3 Tinción de inmunohistoquímica para CD3 en ccRCC

Se observa infiltrado de linfocitos T (CD3, en rojo) entre las células tumorales de citoplasma claro, negativas al marcador. Las flechas negras señalan linfocitos T CD3⁺ infiltrando el parénquima tumoral. Aumento 20X.

La tinción de IHQ para PD-L1 (Fig.4), utilizando el cromógeno DAB (3,3'-Diaminobenzidina), muestra un patrón de positividad membranosa en células inmunes infiltrantes del estroma tumoral. Estas células, identificadas morfológicamente como linfocitos o macrófagos, se localizan predominantemente en la periferia de la neoplasia, formando un borde de linfocitos infiltrantes como parte de la respuesta inmunitaria del huésped. Las células tumorales con citoplasma claro no expresan PD-L1, evidenciando negatividad para el marcador. La presencia de PD-L1 en el estroma sugiere un microambiente inmunosupresor activo y refleja una interacción dinámica entre las células del sistema inmune y el tumor.

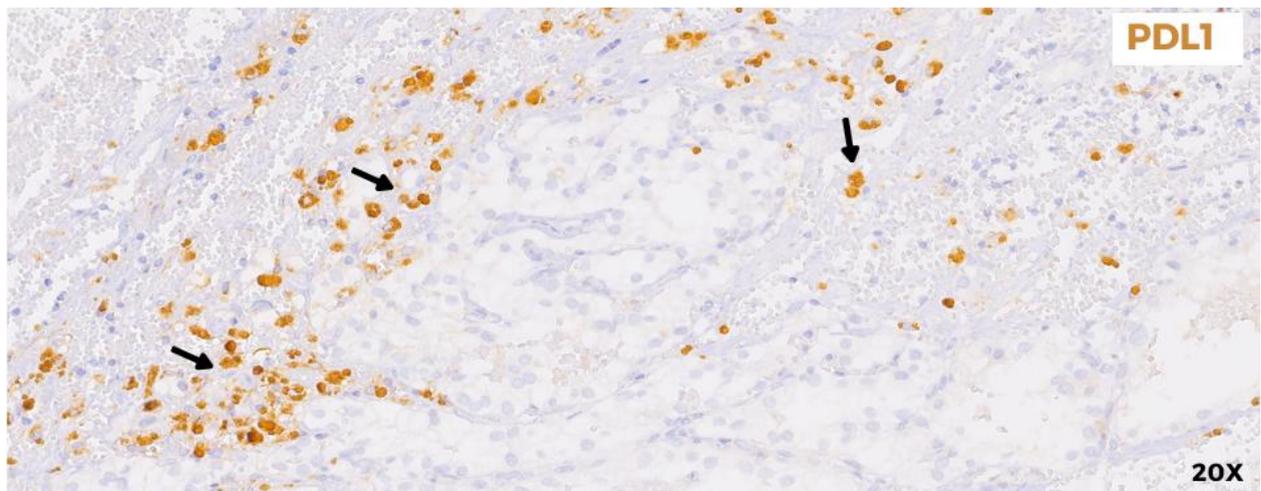


Figura 4 Tinción de inmunohistoquímica para PD-L1 en cRCC

Se observa un patrón de positividad membranosa en células inmunes del estroma tumoral, localizadas en la periferia de la neoplasia. Las flechas negras indican células inmunes PD-L1⁺ (en marrón) en la región estromal peritumoral. Aumento 20X.

Un patrón similar se observó para la marca de CTLA-4 (Fig.5), con expresión citoplasmática focal en células inmunes estromales, sin marcaje en las células neoplásicas.

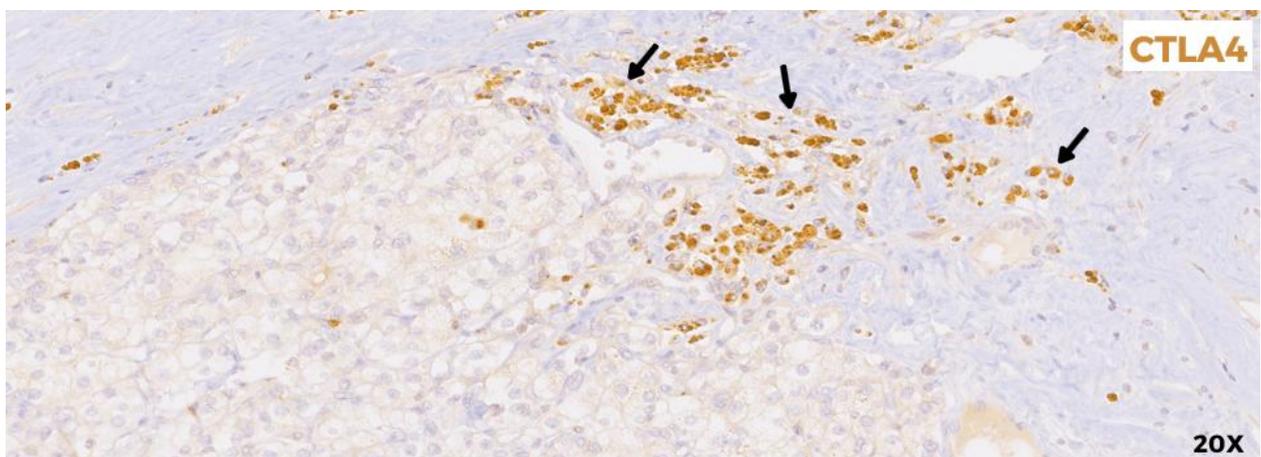


Figura 5 Tinción de inmunohistoquímica para CTLA-4 en ccRCC

Se observa un patrón de positividad membranosa en células inmunes del estroma tumoral, localizadas en la periferia de la neoplasia. Las flechas negras indican células inmunes CTLA-4⁺ (en marrón) en la región estromal peritumoral. Aumento 20X.

Tras la evaluación clínica de las muestras, comparamos dos métodos adicionales de análisis realizados en imágenes digitales escaneadas de láminas de tejido. Todos los análisis se realizaron en el núcleo del tumor (Fig.6).

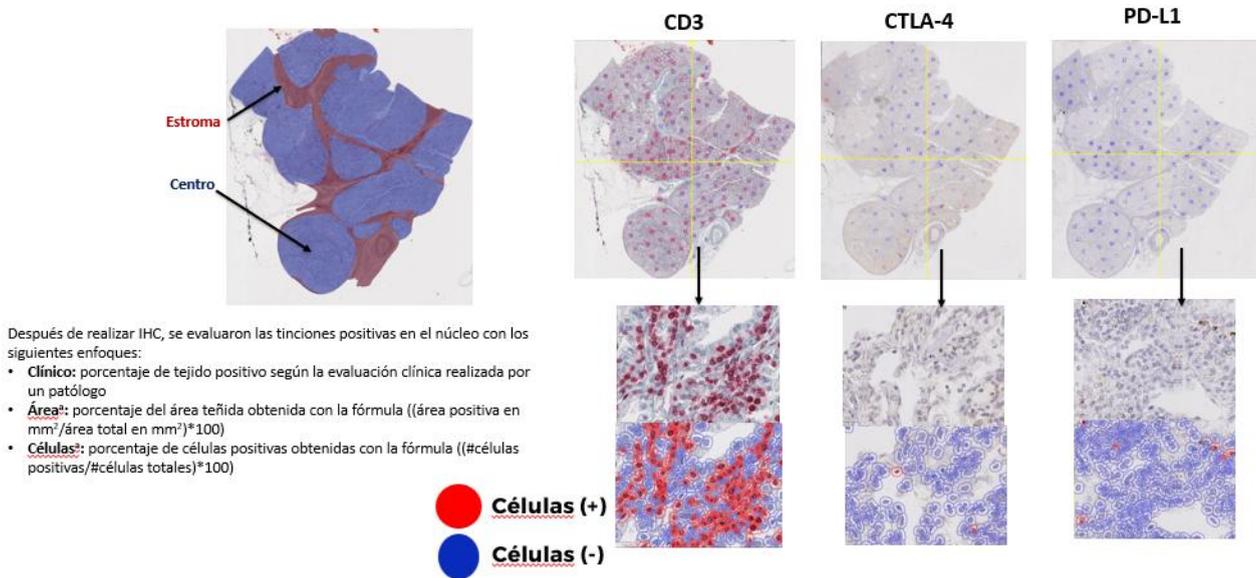


Figura 6 Análisis de inmunohistoquímica

Después de definir el centro del tumor (A), se evaluó un área muestreada aleatoriamente para la presencia de células o área positivas (B) como porcentajes. El área positiva se definió en relación con el área total del núcleo. Las células positivas se definieron en relación con la suma de células positivas y negativas en el área del núcleo.

Casi todas las muestras analizadas resultaron positivas para CD3, algunas con más del 40% del tejido teñido (Figura 7A). En contraste, la mayoría de las laminillas teñidas para CTLA-4 (Figura 7C) y PD-L1 (Figura 7E) fueron negativas o mostraron una tinción escasa para estos biomarcadores.

El desempeño de ambos métodos de cuantificación fue similar de acuerdo con los análisis de correlación de Pearson para CD3 (Figura 7B) y CTLA-4

(Figura 7D), pero no se alcanzó significancia estadística para PD-L1 (Figura 7F). Estos resultados confirmaron que los tumores de RCC se encuentran densamente infiltrados por linfocitos, pero, a diferencia de la mayoría de los tumores sólidos, esta infiltración se asocia con un mal pronóstico.

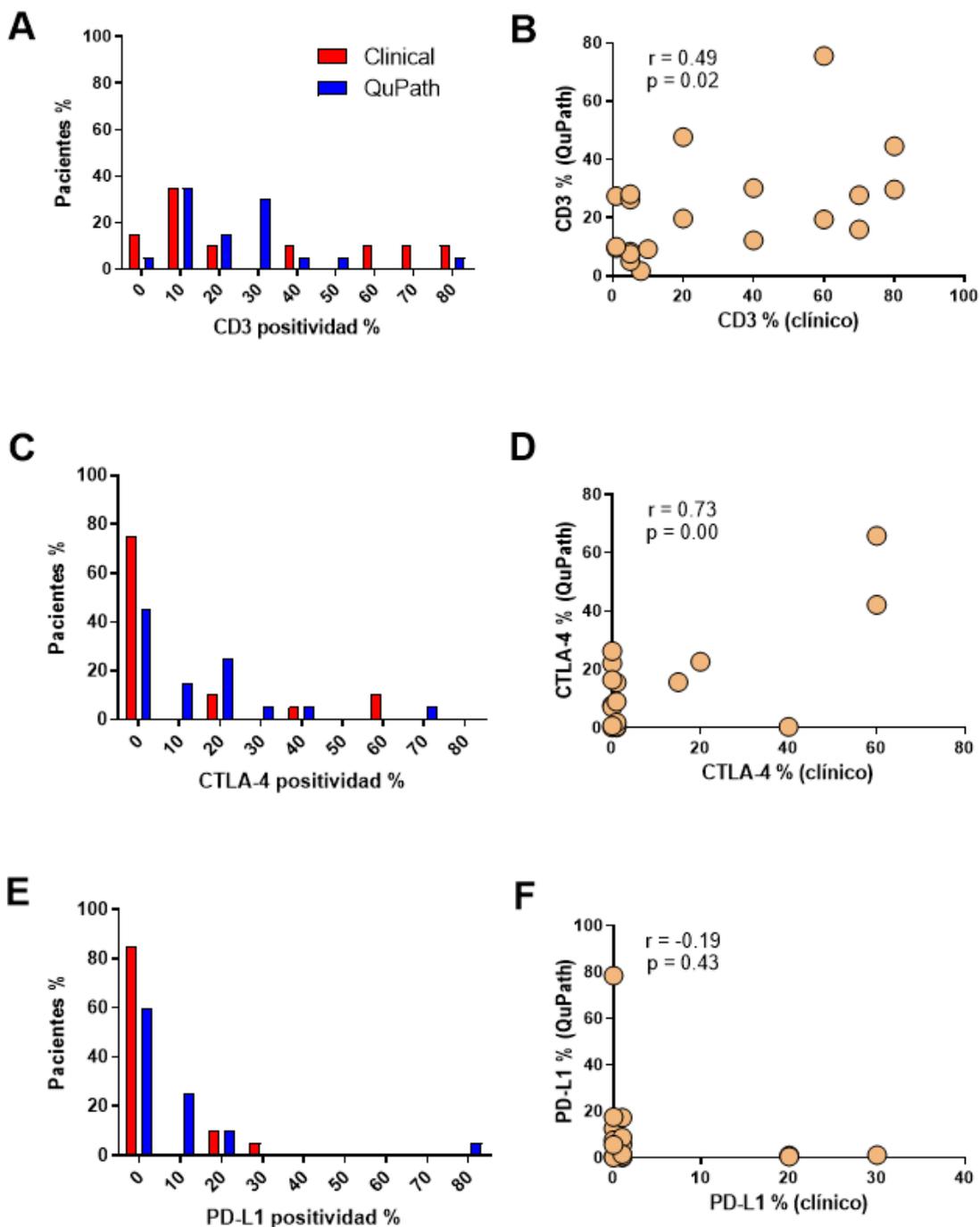


Figura 7 El biomarcador CD3 fue positivo en la mayoría de las muestras tumorales obtenidas de pacientes con RCC

El tejido tumoral fue analizado mediante inmunohistoquímica para los biomarcadores (A) CD3, (C) CTLA-

4, y PD-L1 (E). El porcentaje de tejido positivo fue cuantificado mediante dos métodos: evaluación clínica por tres patólogos y análisis digital de laminillas escaneadas utilizando el software QuPath. Los paneles B, D y F muestran una correlación entre ambos métodos para cada marcador. Análisis de correlación de Pearson, N=20 pacientes.

9.3 Comparación entre las técnicas de inmunohistoquímica y citometría de flujo en la evaluación de biomarcadores inmunes

Dada la naturaleza semicuantitativa de la inmunohistoquímica (IHQ), a continuación, se buscó comparar el desempeño de la citometría de flujo (CF) en la evaluación de los mismos biomarcadores, específicamente CTLA-4 y PD-L1, dentro de las subpoblaciones linfocitarias definidas por la expresión de CD3, CD4 y CD8.

Para ello, una muestra de tejido tumoral fue sometida a digestión enzimática y posteriormente teñida para su análisis por citometría. Los resultados obtenidos se correlacionaron con los datos de IHQ mediante la prueba de correlación de Pearson (Figura 9A). En las comparaciones paralelas, la mayoría de las variables no mostraron correlación significativa; no obstante, se identificaron correlaciones positivas entre CD3 y PD-L1 (Figura 9B), así como entre CTLA-4 y el porcentaje de células CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (células T doblemente negativas, probablemente células NKT; Figura 9C).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la citometría de flujo representa una herramienta valiosa como método complementario para la evaluación del riesgo en pacientes con ccRCC. Los análisis de CTLA-4 y PD-L1 se realizaron en linfocitos y células mieloides, respectivamente. (Fig.8)

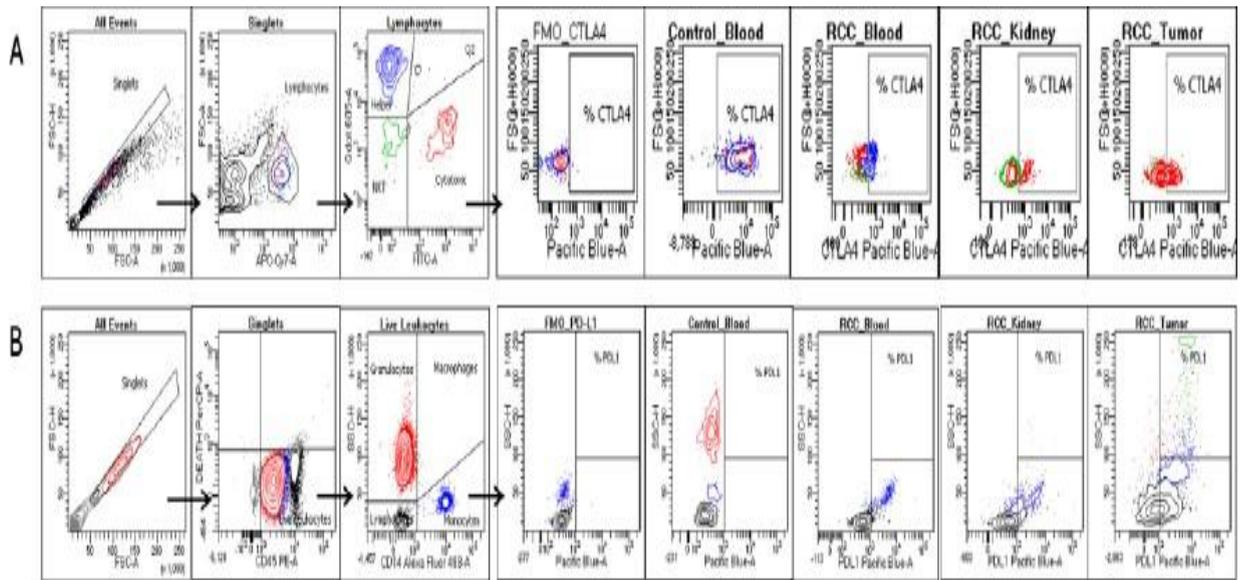


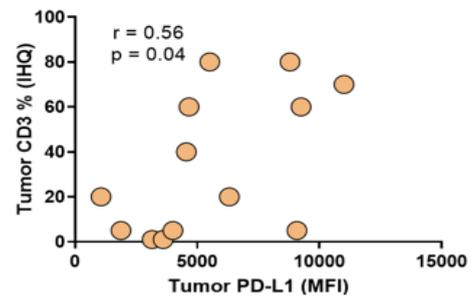
Figura 8 Análisis de citometría de flujo

Los linfocitos se definieron por morfología y combinaciones de CD3, CD4 y CD8 (A). Las células mieloideas se definieron por morfología y combinaciones de CD45 y CD14 (B). Los valores de expresión para los marcadores de agotamiento se mostraron como cambios de pliegue en relación con los valores FMO

A

Análisis de correlación de Pearson para datos de tejidos			
Tumor IHQ	Tumor CF	valor r	valor p
CD3 %	CD3 %	0.34	0.21
CD3 %	CD8 %	0.19	0.50
CD3 %	CD4 %	0.02	0.95
CD3 %	PD-L1 (MFI)	0.56	0.04
CTLA-4 %	CTLA-4 (MFI)	-0.15	0.64
CTLA-4 %	% CD3 ⁺ DN	0.58	0.03
PD-L1 %	PD-L1 (MFI)	0.53	0.06

B



C

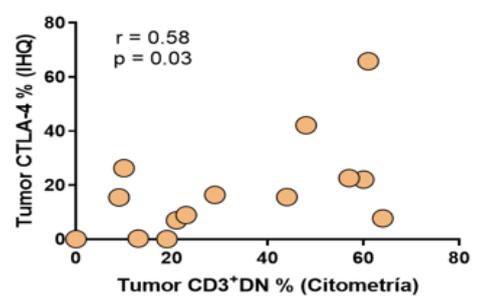


Figura 9 Los biomarcadores tisulares mostraron una correlación heterogénea entre los métodos de análisis por inmunohistoquímica y citometría de flujo

En paralelo al análisis de IHQ, el tejido tumoral fue disgregado y teñido para CD3, CD4, CD8, CTLA-4 y PD-L1 con fines de análisis citométrico. (A) Los parámetros obtenidos de IHQ y citometría de flujo (CF) fueron comparados mediante la prueba de correlación de Pearson. (B) Se observaron correlaciones positivas entre CD3 y PD-L1, y (C) entre CTLA-4 y el porcentaje de células tumorales CD3+CD4+CD8+. Análisis de correlación de Pearson, N=13-14 pacientes.

9.4 Evaluación del microambiente inmune en tejido renal, tumor y sangre periférica de pacientes con ccRCC

A continuación, mediante análisis por citometría de flujo, se cuantificó el porcentaje de leucocitos (células CD45⁺) en tejido tumoral y en tejido renal adyacente no neoplásico (riñón) de 12 pacientes con ccRCC (Fig.10). Los resultados muestran un aumento significativo en la proporción de células CD45⁺ en el tumor comparado con el riñón peritumoral ($p < 0.05$, prueba de Mann-Whitney). Este incremento sugiere una infiltración activa del tumor por parte del sistema inmunológico, reflejando la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) y macrófagos asociados al tumor (TAMs).

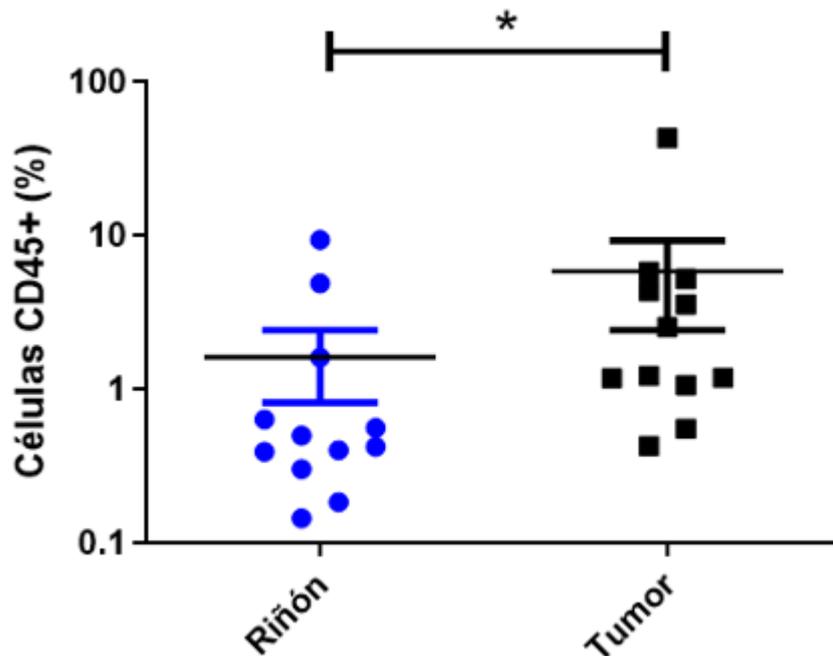


Figura 10 Porcentaje de células CD45⁺ en tejido tumoral y renal adyacente de paciente con ccRCC

N=12. Media \pm D.E. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney; $p < 0.05$.

Se realizó un análisis de composición inmunológica del infiltrado leucocitario en sangre periférica, tejido tumoral y tejido renal adyacente de 20 pacientes con

ccRCC, comparado con 10 controles sanos (Fig.11). La figura muestra la proporción relativa de subpoblaciones mieloides (Fig.11A) y linfoides (Fig.11B). En el panel A, se observa que los controles (bct) presentan una proporción equilibrada entre monocitos y células polimorfonucleares antes (bt0) y después (bt1) de la nefrectomía. En tejido tumoral (ttm), se destaca un marcado aumento en la proporción de macrófagos, ausente en otras condiciones. En el panel B, los linfocitos CD8⁺ son la subpoblación predominante en tejido tumoral, a diferencia de los controles y del tejido renal adyacente (tkd), donde se observa una mayor proporción de linfocitos CD4⁺.

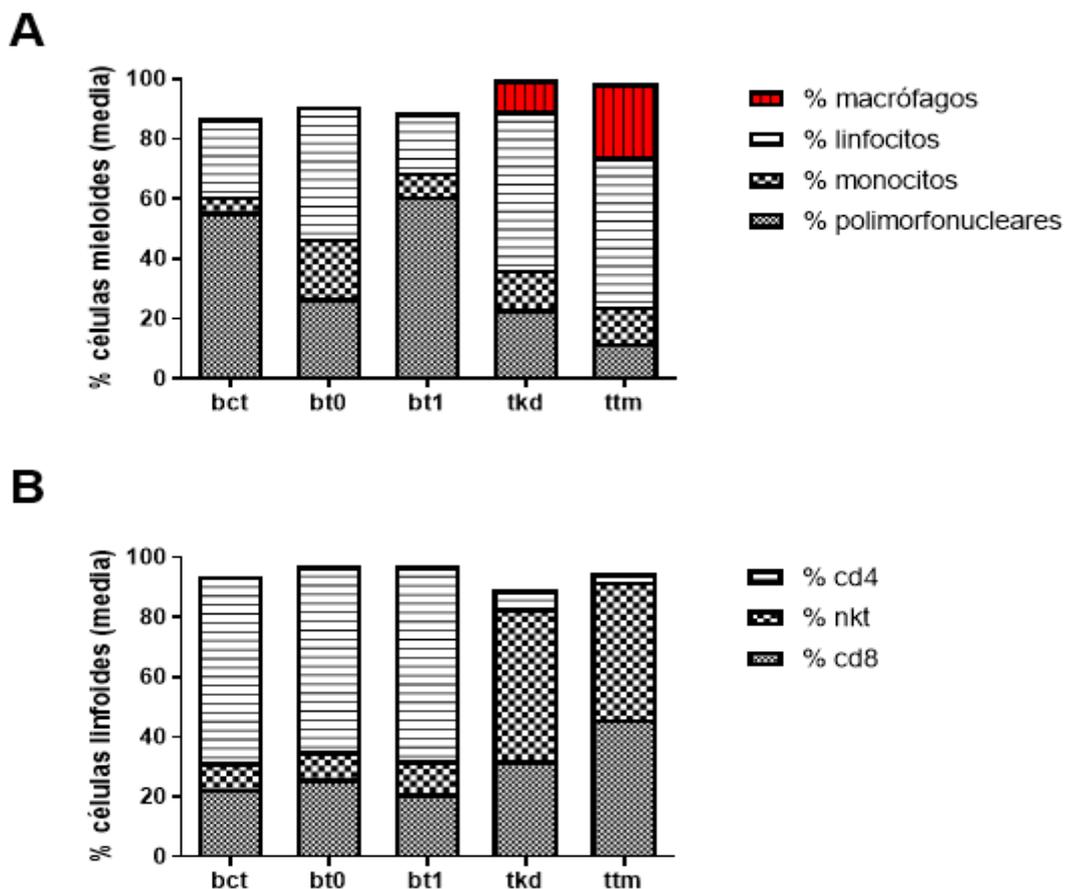


Figura 11. Distribución de células mieloides y linfoides en sangre periférica y tejidos de pacientes con ccRCC.

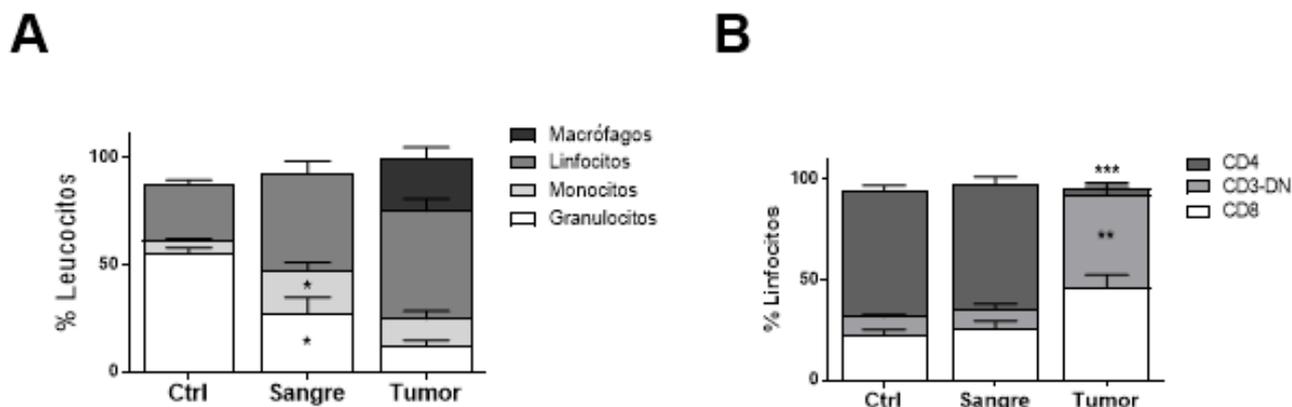
Se muestran las proporciones medias de células mieloides y linfoides en diferentes compartimentos analizados por citometría de flujo. BCT: sangre venosa periférica de controles sanos; BT0: sangre venosa periférica de pacientes antes de la nefrectomía; BT1: sangre venosa periférica de pacientes después de la nefrectomía; TKD: tejido renal no tumoral; TTM: tejido tumoral. N=20.

Se analizó la expresión periférica de biomarcadores de agotamiento inmunológico por medio de citometría de flujo, en comparación con sujetos control sanos (Figura 12). Nuestros resultados mostraron que los pacientes presentaban proporciones anómalas de leucocitos sanguíneos en comparación con los valores observados en los controles sanos. Además, en el tejido tumoral, los linfocitos fueron células predominantes, seguidos por macrófagos (Figura 12A). Dentro de las subpoblaciones linfocitarias, no se observaron diferencias en sangre, pero el tumor mostró una infiltración de células CD8⁺ y CD3-DN, con una evidente ausencia de linfocitos CD4⁺ (Figura 12B).

La expresión de los biomarcadores de agotamiento fue dependiente del fenotipo, con distintos niveles de expresión respecto a los leucocitos de los participantes sanos. (Figura 12C). Por ejemplo, la expresión de PD-1 y TIM-3 aumentó únicamente en células CD3⁺; sin embargo, al considerar todas las poblaciones linfocitarias (T, B y NK), los resultados mostraron una disminución en la expresión de LAG-3 y CTLA-4, sin cambios significativos en PD-1 y TIM-3.

La expresión de PD-L1 se encontró disminuida tanto en sangre (Figura 12C) como en los monocitos dentro del tejido tumoral (Figura 12D). Exceptuando PD-1, la expresión de todos los marcadores analizados fue menor en el tumor en comparación con sangre periférica en pacientes con ccRCC localizado (Figura 12D). De manera interesante, solo la subpoblación de células CD3-DN mostró una mayor expresión de PD-1 (no mostrado).

En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión sistémica de estos biomarcadores puede distinguir a los pacientes con RCC de los controles sanos, aunque probablemente con un bajo grado de especificidad. En cuanto a su utilidad para la evaluación del riesgo, aún no está claro el significado clínico de la presencia o ausencia de dichos biomarcadores



C

Expresión de Marcadores en Sangre (Relativo a Controles)					
	CD3	CD4	CD8	Todos	Mono
PD-1	Aumentado	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	-
LAG-3	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Disminuido	-
TIM-3	Aumentado	Aumentado	Aumentado	Sin cambios	-
CTLA-4	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Disminuido	-
PD-L1	-	-	-	-	Disminuido

D

Expresión de Marcadores en Tumor (Relativo a Sangre)					
	CD3	CD4	CD8	Todos	Mono
PD-1	Sin cambios	-	Sin cambios	Sin cambios	-
LAG-3	Disminuido	-	Disminuido	Disminuido	-
TIM-3	Disminuido	-	Disminuido	Sin cambios	-
CTLA-4	Disminuido	-	Disminuido	Sin cambios	-
PD-L1	-	-	-	-	Disminuido

Figura 12. Los pacientes con RCC presentaron alteraciones en la dinámica de leucocitos y en biomarcadores sanguíneos en comparación con los controles sanos.

La dinámica de leucocitos se comparó entre pacientes (sangre) y controles sanos (Ctrl) en sangre y entre tumor y sangre en los pacientes. (A) Los pacientes mostraron alteraciones en la proporción de leucocitos

en sangre en comparación con los controles sanos, y la infiltración tisular estuvo dominada por linfocitos. (B) No se observaron alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos en sangre, pero el tejido tumoral mostró una marcada ausencia de células T CD4+. (C) En Sangre y (D) en tejido tumoral, los leucocitos presentaron un perfil característico de expresión de biomarcadores de agotamiento, evaluado por citometría de flujo. Se utilizó la prueba t no pareada para las comparaciones estadísticas entre sangre de controles y pacientes, así como entre tumor y sangre en los pacientes. N= 5-10. Media \pm D.E. CD3-DN: Células CD3+CD4-CD8-; Mono= monocitos; Todos: incluidos todos los linfocitos (T, B y NKT).

A continuación, se cuantificó las marcas asociadas al agotamiento linfoide PD-1, CTLA-4, LAG-3 y TIM-3 entre los distintos tejidos, incluyendo ahora el tejido renal adyacente dentro de las subpoblaciones linfocitarias CD4⁺, CD8⁺ y NKT de pacientes con ccRCC (Figura 12). Consistentemente, los linfocitos CD8⁺ son las células que mayoritariamente expresan PD-1 independientemente del tejido medido (Fig. 12A). Por otro lado, la marca CTLA-4 es consistentemente expresada por los linfocitos CD4⁺ en proporciones comparables entre tejidos (Fig. 13B). En contraste, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de LAG-3 y TIM-3 entre los tejidos (Fig. 13C y 13D). Lo anterior sugiere que las marcas de inhibición funcional linfoide se modulan distintamente entre poblaciones linfoides y que la cooperación entre subpoblaciones de linfocitos T es indispensable.

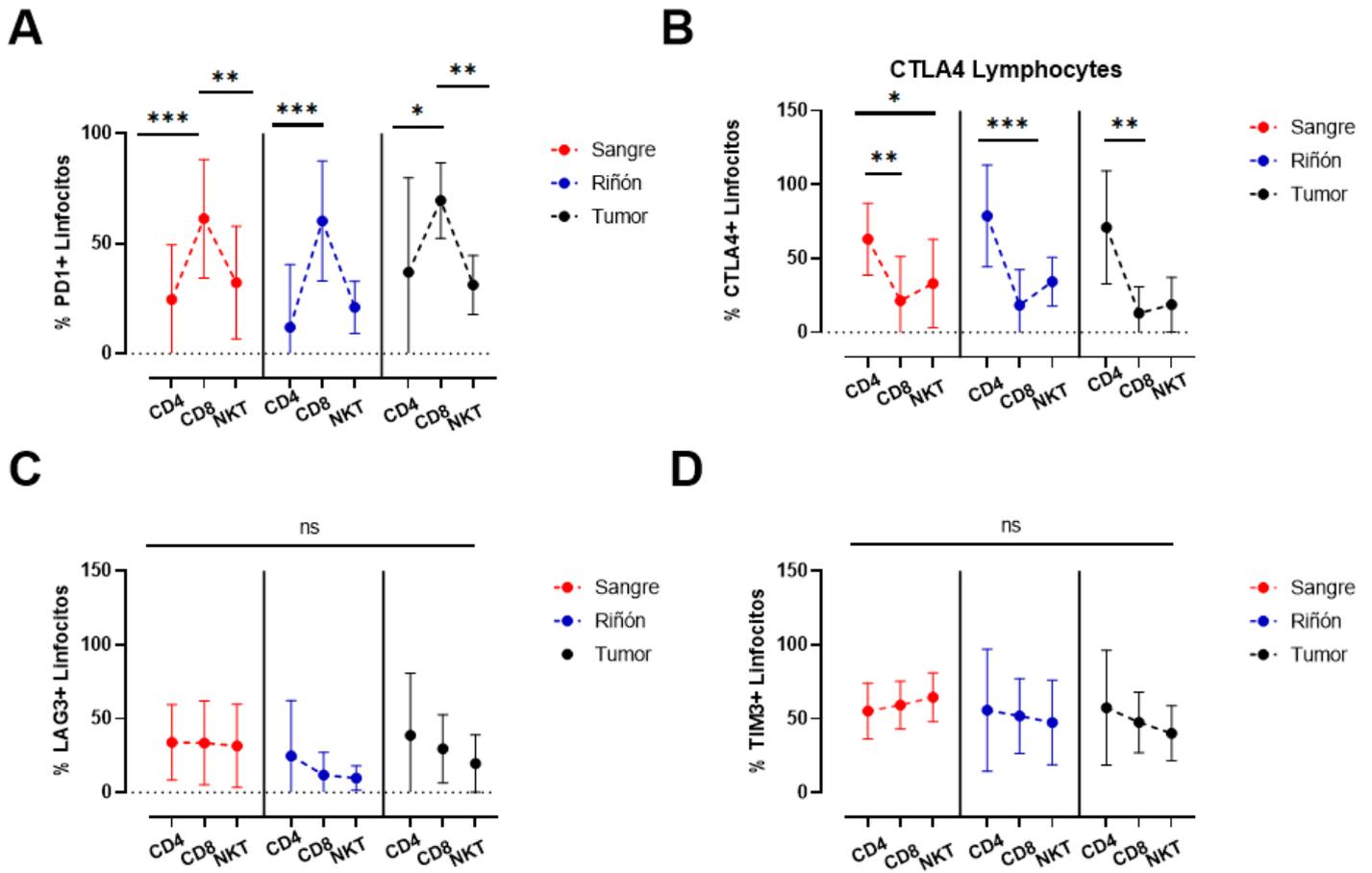


Figura 13. Expresión de marcadores de agotamiento en linfocitos en sangre, riñón y tumor de pacientes con ccRCC.

Expresión de PD-1 (A), CTLA-4 (B), LAG-3 (C) y TIM-3 (D) en linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y NKT en sangre, tejido renal y tumoral (N=18). Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparación entre grupos. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Datos expresados como media ± D.E.

9.5 Asociación entre grado tumoral y marcadores de agotamiento en ccRCC

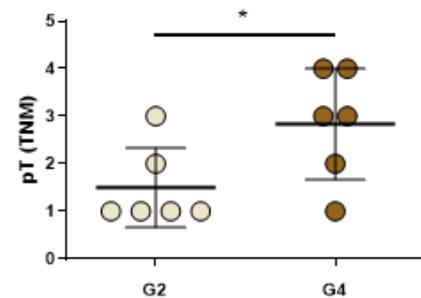
Para evaluar la relevancia de los datos obtenidos por citometría de flujo, se comparó la expresión de biomarcadores entre dos subgrupos de pacientes de acuerdo con el grado nuclear (Fig. 14A). Se observó que los tumores de mayor grado presentaron un mayor tamaño (Fig. 14B), un incremento en el porcentaje de linfocitos tanto en sangre (no mostrado) como en tejido tumoral (Fig. 14C), pero niveles reducidos de receptores PD-1 en los linfocitos sanguíneos (Fig. 14D). Estos datos podrían predecir una menor respuesta a la inmunoterapia dirigida contra PD-1 en estadios avanzados de la enfermedad.

A

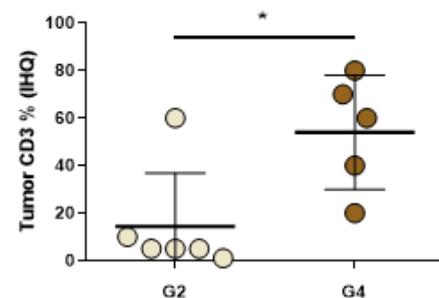
Análisis de datos según grado tumoral en pacientes con RCC			
	Grado 2	Grado 4	Valor P
Datos Clínicos			
Edad (años)	61.5 ± 8.6	60.2 ± 7.7	0.783
pTumor (TNM)	1.5 ± 0.8	2.8 ± 1.2	0.046
% CD3 ^A	14.3 ± 22.6	54 ± 24.1	0.020
% CTLA-4 ^A	17 ± 26.3	4.2 ± 8.8	0.329
% PD-L1 ^A	0.5 ± 0.5	4.8 ± 8.5	0.243
Datos de Citometría de Flujo (Tumor)			
% Monocitos	13.2 ± 13.9	11.8 ± 9.5	0.865
% Linfocitos	70.5 ± 17.2	55.8 ± 16.3	0.213
PD-1 ^B (MFI)	1580 ± 845	1979 ± 2568	0.778
LAG-3 ^B (MFI)	885 ± 372	917 ± 628	0.932
TIM-3 ^B (MFI)	498 ± 301	1125 ± 1105	0.315
CTLA-4 ^B (MFI)	393 ± 255	825 ± 449	0.145
PD-L1 ^C (MFI)	3072 ± 1178	5279 ± 3298	0.206
Datos de Citometría de Flujo (Sangre)			
% Monocitos	7 ± 1.8	23.5 ± 20.4	0.158
% Linfocitos	23.5 ± 6.2	57.8 ± 22.8	0.027
PD-1 ^B (MFI)	2580 ± 267	1462 ± 636	0.023
LAG-3 ^B (MFI)	3317 ± 1282	1987 ± 1051	0.205
TIM-3 ^B (MFI)	1008 ± 283	1880 ± 1268	0.228
CTLA-4 ^B (MFI)	2776 ± 3436	2785 ± 2000	0.997
PD-L1 ^C (MFI)	6628 ± 2962	4499 ± 3460	0.386

Media ± DE; A, Inmunohistoquímica tumoral; B, Expresión en linfocitos; C, Expresión en monocitos.

B



C



D

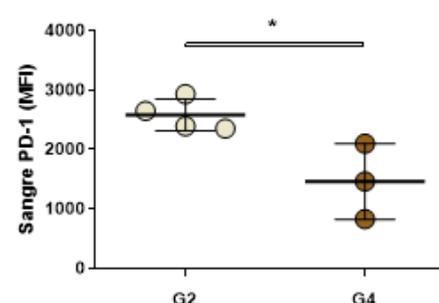


Figura 14. Los tumores de alto grado muestran linfocitosis y disminución en la expresión de PD-1 en sangre.

(A) Los pacientes fueron clasificados según el grado nuclear y se sometieron a comparaciones multiparamétricas. (B y C) Los pacientes con tumores de grado 4 presentaron un mayor tamaño tumoral (B), mayor inmunotinción para CD3 (C) y un incremento en el porcentaje de linfocitos circulantes (no mostrado). (D) En contraste, los pacientes con RCC de grado 4 mostraron una disminución en la expresión de PD-1 en sangre. Prueba t no pareada. N=3-6 pacientes por muestra. Media \pm D.E.

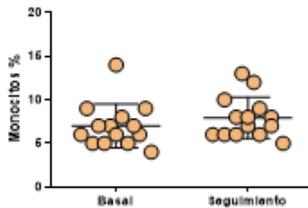
9.6 Evaluación inmunológica pre y post-nefrectomía en pacientes con ccRCC

Para evaluar el efecto de la nefrectomía terapéutica sobre los biomarcadores periféricos en sangre, analizamos los receptores linfocitarios antes de la intervención quirúrgica y tras 8 a 12 meses de seguimiento (Fig. 15). Se observaron cambios en los biomarcadores PD-1 y PD-L1, aunque sin significancia estadística, posiblemente debido al tamaño reducido de nuestra muestra. De forma interesante, el porcentaje de monocitos en sangre permaneció sin cambios (Fig. 15B), mientras que el porcentaje de linfocitos aumentó tras el seguimiento (Fig. 15C). Un análisis más detallado indicó que los linfocitos CD4 no se modificaron (Fig. 15D), pero los linfocitos CD8 disminuyeron (Fig. 15E), con un aumento concomitante de las células CD3+DN (Fig. 15F). En conjunto, estos datos sugieren que la extirpación quirúrgica del tumor afectó las subpoblaciones de linfocitos citotóxicos sin alterar la expresión basal de los biomarcadores de agotamiento evaluados.

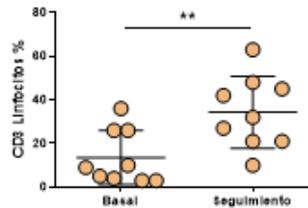
A

Cambios en los parámetros sanguíneos después de la nefrectomía			
Parámetros (% o MFI)	Basal (± D.E.)	Seguimiento (± D.E.)	Valor P
Monocitos (%)	7.0 ± 2.5	7.9 ± 2.4	0.323
PD-L1	7880 ± 3647	11155 ± 5676	0.097
Todos los Linfocitos (%)	34.4 ± 20.3	37.1 ± 23.4	0.746
CD3 Linfocitos (%)	13.6 ± 12.4	34.3 ± 16.5	0.008
PD-1	4019 ± 1510	5317 ± 2210	0.152
LAG-3	5618 ± 2624	5622 ± 5148	0.998
TIM-3	1736 ± 321	1897 ± 808	0.603
CTLA-4	10037 ± 3637	13597 ± 6015	0.245
CD4 Linfocitos (%)	44.3 ± 8.4	51.4 ± 15.1	0.229
PD-1	3499 ± 1127	4252 ± 737	0.089
LAG-3	5130 ± 1847	4300 ± 2683	0.442
TIM-3	1494 ± 383	1613 ± 512	0.573
CTLA-4	9962 ± 3744	11639 ± 2966	0.349
CD8 Linfocitos (%)	29.2 ± 11.7	18.9 ± 8.8	0.037
PD-1	3960 ± 1184	4580 ± 978	0.216
LAG-3	4998 ± 1913	4156 ± 3161	0.493
TIM-3	1590 ± 402	1642 ± 563	0.819
CTLA-4	8869 ± 3034	9932 ± 3107	0.533
CD3-DN Linfocitos (%)	6.2 ± 2.7	12.0 ± 7.1	0.032

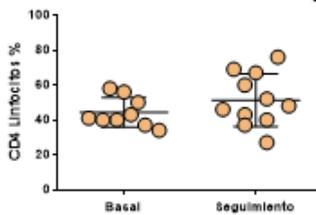
B



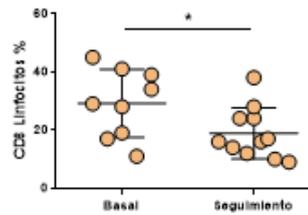
C



D



E



F

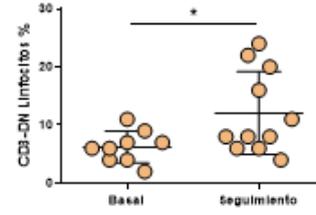


Figura 15. Tras la nefrectomía, el desequilibrio de los linfocitos en sangre se restaura sin afectar la expresión de los biomarcadores.

(A) Los parámetros sanguíneos fueron reevaluados 12 meses después de la nefrectomía terapéutica. Los linfocitos circulantes regresaron a porcentajes fisiológicos, pero los biomarcadores de agotamiento evaluados no mostraron cambios. (B) Los monocitos y (D) los linfocitos CD4⁺ nos mostraron cambios después del seguimiento. (C) Los linfocitos CD3⁺ y (E) los CD8⁺ regresaron a valores fisiológicos tras el seguimiento. (F) La población de células CD3⁺CD4⁻CD8⁻ aumentó después de la nefrectomía; véase el texto para discusión. Prueba t no pareada. N= 9-14 pacientes por muestra. Media ± D.E.

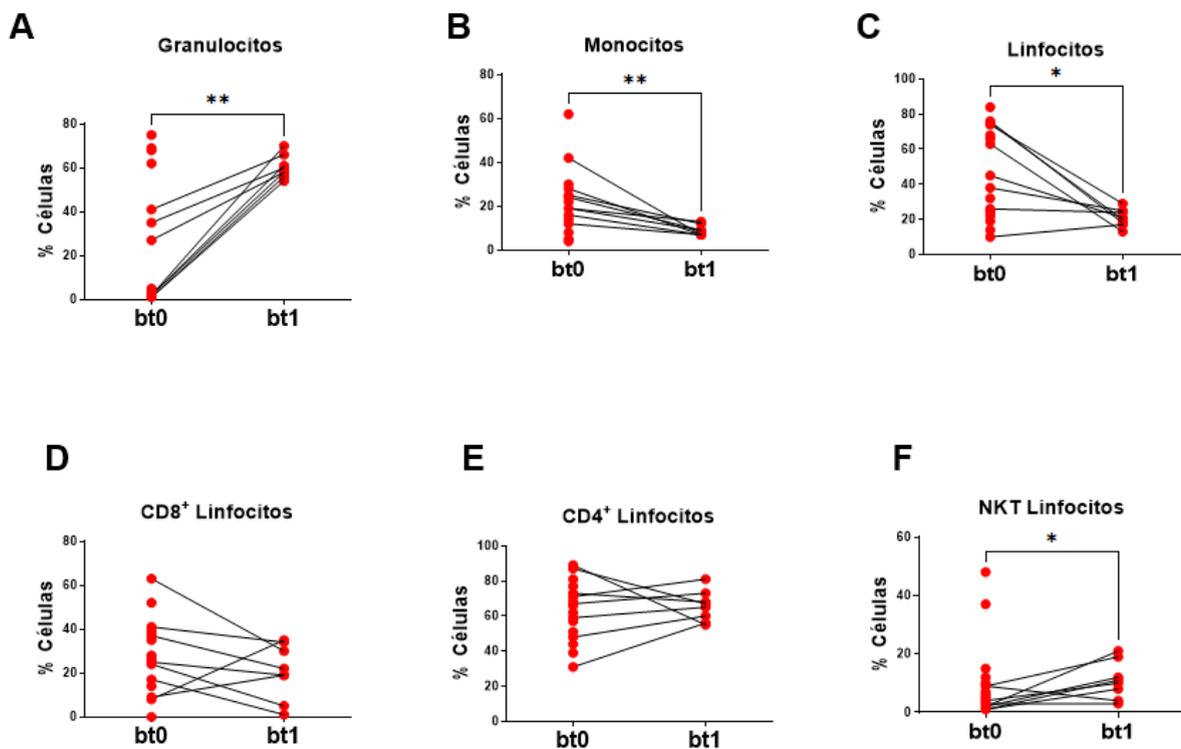
9.7 Cambio en el Porcentaje de Leucocitos en Sangre Venosa Periférica Antes y Después de Nefrectomía en pacientes con ccRCC

Se analizó la sangre venosa periférica de los pacientes con ccRCC en dos momentos diferentes: antes de la nefrectomía radical (bt0) y seis meses después de la cirugía (bt1) (Fig. 16). Los resultados muestran cambios significativos en las poblaciones sanguíneas; se observó un aumento significativo en el porcentaje de granulocitos (Fig 16A) en sangre seis meses después de la nefrectomía en comparación con los niveles antes de la cirugía. En contraste, los monocitos (Fig. 16B) mostraron una disminución significativa en su porcentaje entre bt0 y bt1, indicando una reducción en esta población celular tras la intervención. Asimismo, el porcentaje de linfocitos también disminuyó significativamente en bt1 (Fig. 16C). Estos cambios en la composición de las células sanguíneas sugieren una respuesta inmunitaria relacionada con la reducción de la carga tumoral en pacientes con ccRCC.

Los resultados en el caso de los linfocitos CD8⁺ (Fig. 16D) no mostraron cambios significativos en los porcentajes entre ambos tiempos, lo que sugiere una estabilidad en esta población de células citotóxicas tras la cirugía. Para los linfocitos CD4⁺ (Fig. 16E), tampoco se detectaron diferencias significativas, indicando que esta subpoblación de células T se mantiene relativamente constante en ambos momentos. Sin embargo, los linfocitos NKT (Fig. 16F) mostraron una disminución significativa en bt1 en comparación con bt0, lo cual podría estar asociado a la reducción de la carga tumoral o cambios en el microambiente tumoral tras la intervención.

Estos datos sugieren que, aunque algunas subpoblaciones de linfocitos no varían después de la nefrectomía, las células NKT presentan una disminución notable,

lo que podría tener implicaciones en la respuesta inmunitaria postquirúrgica en



pacientes con RCC.

Figura 16. Gráficos de dispersión conectados que representan los porcentajes de granulocitos, monocitos y linfocitos en sangre venosa periférica antes y después de la nefrectomía radical en pacientes con ccRCC.

(A) Granulocitos, (B) Monocitos, (C) Linfocitos totales, (D) Linfocitos CD8⁺, (E) Linfocitos CD4⁺, (F) Linfocitos NKT. Se muestran cambios individuales por paciente entre el tiempo preoperatorio (bt0) y postoperatorio (bt1). Los análisis se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. El valor de p se indica como *p<0.05, **p<0.01.

Finalmente, se evaluaron los subgrupos de linfocitos antes y después de la nefrectomía radical. La Figura 17 muestra dos conjuntos de gráficos que representan los porcentajes de linfocitos CD8⁺ (Fig. 17A y D), CD4⁺(Fig. 17B y E) y NKT⁺ (Fig.17C y F) para los marcadores de agotamiento PD-1 y CTLA-4 en sangre venosa periférica de pacientes con ccRCC. En el panel A los gráficos muestran una disminución significativa en la expresión de PD-1 en los tres subgrupos de linfocitos. Por otro lado,

la marca de CTLA-4 únicamente disminuyó en los linfocitos CD4⁺.

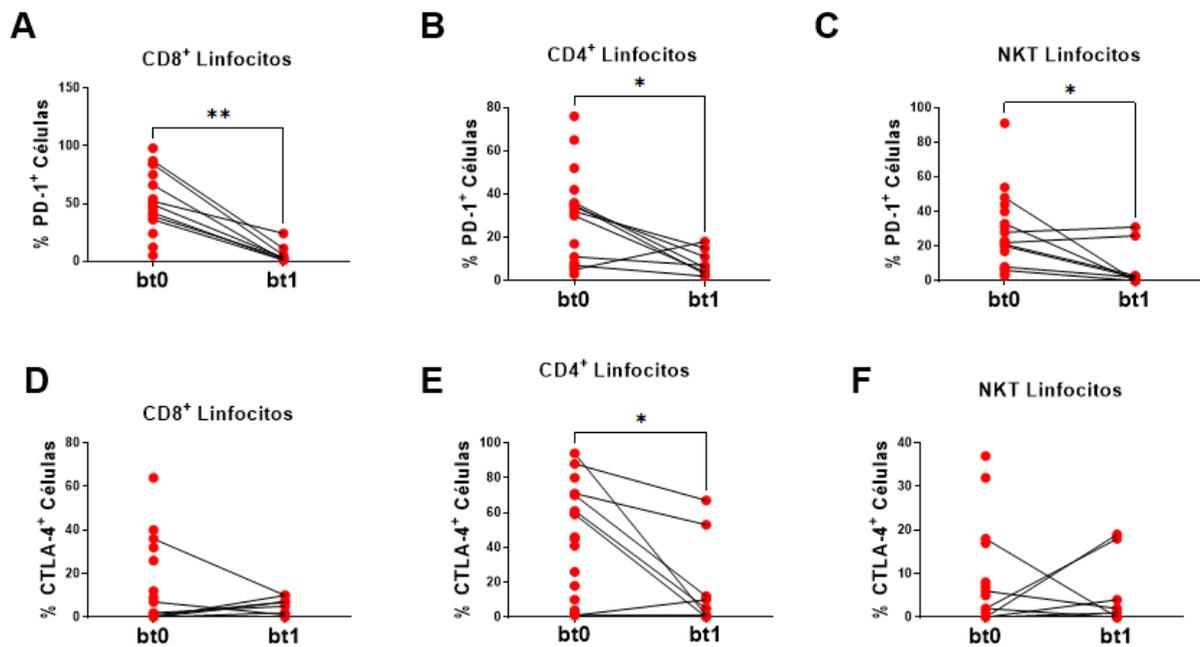


Figura 17. Gráficos de dispersión conectados que representan los porcentajes de linfocitos CD8+, CD4+ y NKT+ en sangre venosa periférica.

(A) Marcador de agotamiento PD-1. Estos datos indican cambios en la composición de las células sanguíneas en pacientes con ccRCC antes y después de la nefrectomía radical. Prueba Wilcoxon. El valor de p se indica como $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. (B) Marcador de agotamiento CTLA-4. Estos datos indican cambios en la composición de las células sanguíneas en pacientes con ccRCC antes y después de la nefrectomía radical. Prueba Wilcoxon. El valor de p se indica como $*p < 0.05$.

10.DISCUSIÓN

El carcinoma renal es una enfermedad neoplásica que afecta a pacientes en su sexta y séptima década de vida⁽²⁾. Entre sus variantes, hasta el 80% de los diagnósticos corresponden al ccRCC, una enfermedad agresiva caracterizada por su quimio resistencia intrínseca y mal pronóstico⁽⁵⁾. En etapas tempranas, el ccRCC puede curarse prácticamente nefrectomía; sin embargo, la enfermedad avanzada requiere el uso de terapias más recientes y prometedoras, como la inmunoterapia y los tratamientos sistémicos dirigidos⁽²⁴⁾. Estas terapias presentan diversos desafíos, y actualmente no existen herramientas validadas para seleccionar adecuadamente a los pacientes candidatos en términos de respuesta clínica y aparición de eventos adversos⁽⁷⁹⁾. Para abordar esta problemática, nos propusimos describir la expresión de cinco biomarcadores comúnmente utilizados en inmunoterapia (PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 y CTLA-4) en tejidos obtenidos de un grupo de pacientes con ccRCC localizado.

Nuestros resultados coinciden con reportes previos que describen al ccRCC como un tumor altamente inmunogénico, mostrando una elevada expresión de CD3, pero niveles moderados de CTLA-4 y PD-L1 (Fig. 7, paneles A, C y E, respectivamente). En la mayoría de los cánceres, una alta expresión de CD3 se asocia generalmente a un buen pronóstico; sin embargo, en el caso del ccRCC, la evidencia sugiere lo contrario^(11,39,65). Al analizar la inmunotinción tisular, se observó una correlación positiva entre el análisis clínico de la IHQ y el análisis digital con QuPath para CD3 y CTLA-4, pero no para PD-L1 (Fig. 7, paneles B, D y F), lo cual respalda la utilidad de métodos alternativos de cuantificación. Además, no se

encontraron correlaciones directas entre la IHQ y la citometría de flujo para los mismos marcadores (por ejemplo, CTLA-4/CTLA-4 y PD-L1/PD-L1), aunque sí se observaron correlaciones positivas entre CD3/PD-L1 y CTLA-4/células CD3-DN (Fig. 9), lo que sugiere una estrecha relación entre los ligandos de agotamiento y sus receptores correspondientes en los linfocitos infiltrantes.

Realizamos un análisis comparativo entre tejido tumoral y tejido renal adyacente, el cual reveló un incremento significativo en el porcentaje de células CD45⁺ dentro del tumor (Fig. 10), lo que sugiere una mayor infiltración de leucocitos en el microambiente tumoral. Esta observación es consistente con la respuesta inmunitaria que suelen desencadenar los tumores, la cual conduce al reclutamiento e infiltración de células inmunes hacia el sitio tumoral. CD45⁺ se expresa en niveles elevados en diversas células inmunes, incluidas las células linfoides infiltrantes de tumor (TILs) y los macrófagos asociados al tumor (TAMs). El aumento en la proporción de células CD45⁺ en el tejido tumoral refleja la presencia activa de estas poblaciones inmunes en el microambiente tumoral⁽⁸⁰⁾.

Posteriormente, llevamos a cabo un análisis detallado de la composición inmunológica del infiltrado leucocitario en sangre periférica, tejido tumoral y tejido renal adyacente (Fig. 11). En el compartimiento de células mieloides (Fig. 11A), los linfocitos constituyeron la población predominante en todos los grupos, tanto en sangre como en tejidos, mientras que en el compartimiento linfoide (Fig. 11B), se observó una notoria reducción de linfocitos CD4⁺ en el tejido tumoral, acompañado por un aumento relativo de linfocitos CD8⁺ y NKT. Este cambio fenotípico podría indicar una respuesta inmune disfuncional asociado al agotamiento dentro del TME⁽⁸¹⁾.

Más adelante, analizamos la expresión del panel completo de biomarcadores en tres localizaciones: leucocitos tumorales en pacientes, leucocitos en sangre

periférica de los mismos pacientes y leucocitos en sangre periférica de controles sanos pareados por edad (Fig. 12). Los resultados mostraron que los pacientes presentaban proporciones anómalas de leucocitos en sangre comparados con los controles sanos (Fig. 12A), así como una ausencia marcada de linfocitos CD4⁺ en el tejido tumoral, acompañada por un aumento relativo de linfocitos CD3-DN (Fig. 12B). Una baja infiltración de linfocitos CD4 ha sido asociada con un mal pronóstico en pacientes con sarcoma y carcinoma cervicouterino^(82,83). La abundancia relativa de linfocitos CD3-DN (posiblemente células NKT) podría estar relacionada con la capacidad intrínseca de estas células para reconocer antígenos lipídicos⁽⁸⁴⁻⁸⁷⁾. Además, el RCC se ha asociado con la presencia de linfocitos circulantes doble positivos (CD4⁺, CD8⁺) y con linfocitos tumorales pobremente reactivos en ensayos ex vivo^(88,89). Estudios previos han propuesto el uso del cociente neutrófilo-linfocito⁽⁹⁰⁾ y los niveles séricos de proteína C reactiva⁽⁶¹⁾ como posibles biomarcadores costo-efectivos para predecir la respuesta a inmunoterapia en pacientes con RCC.

En sangre, los pacientes con ccRCC mostraron una mayor expresión de PD-1 y TIM-3 en linfocitos CD3⁺, junto con una menor expresión de PD-L1 en células CD14⁺ en comparación con los controles sanos (Fig. 12C). Además, dentro del mismo grupo de pacientes, el tejido tumoral mostró una menor expresión de LAG-3, TIM-3 y CTLA-4 en linfocitos CD3⁺ así como una disminución en la expresión de PD-L1 en células CD14⁺ en comparación con los leucocitos en sangre periférica, lo que sugiere alteraciones funcionales más profundas en los leucocitos infiltrantes del tumor (Fig. 12D). Estos resultados podrían explicar la falta de respuesta a inmunoterapia a pesar de la elevada infiltración linfocitaria. En este sentido, es importante destacar que el agotamiento inmune no es un fenómeno mediado por un solo receptor, sino que involucra múltiples receptores⁽⁹¹⁾, lo cual resalta el valor potencial de la citometría de flujo como método complementario para evaluar el agotamiento inmunológico,

aunque serán necesarios estudios confirmatorios. Dado que la mayoría de los estudios de citometría en este campo tienen fines pronósticos o predictivos⁽⁵⁰⁾, nuestro estudio se planteó únicamente con un enfoque descriptivo respecto a la expresión de estos biomarcadores.

Los resultados obtenidos en la Figura 13 profundizan en la caracterización de la expresión de marcadores de agotamiento de acuerdo con la localización y subpoblación linfoide. Observamos que la expresión de PD-1 (Fig. 13A) fue mayor en linfocitos CD4+, CD8+ y NKT en sangre y tejido renal adyacente, con una reducción notable en el tumor. Sin embargo, los linfocitos CD4+ del tumor conservaron una expresión elevada de PD-1, lo que puede representar un subgrupo funcionalmente agotado. En cuanto a CTLA-4 (Fig. 13B), su expresión disminuyó significativamente en el tejido tumoral en comparación con los otros tejidos. Estos hallazgos resultan particularmente relevantes al considerar el papel de los TILs como mediadores clave de la inmunidad antitumoral en el RCC⁽⁹³⁾. Un dato valioso de este análisis es que la expresión de PD-1 y CTLA-4 en linfocitos T, puede medirse en sangre, lo cual representa una alternativa no invasiva para evaluar marcadores asociados al agotamiento inmunológico para identificar a los pacientes que responderían mejor a la inmunoterapia con ICI.

Para evaluar la relevancia clínica de la expresión de biomarcadores en pacientes con RCC, dividimos el grupo según el grado nuclear, dada la conocida relación inversa entre el grado nuclear y el desenlace clínico^(8,94). Nuestros resultados indicaron que los tumores de grado 4 presentaron mayor tamaño, mayor infiltración tumoral por células CD3+, linfocitosis en sangre y una disminución en la expresión de PD-1 en sangre, todo esto en comparación con tumores de grado 2 (Fig. 14). De forma interesante, el análisis de citometría del tejido tumoral no logró detectar estas diferencias asociadas al grado nuclear.

Finalmente, para evaluar las variaciones a corto plazo en los biomarcadores sanguíneos, analizamos la expresión de receptores de agotamiento antes y después de la nefrectomía en un subgrupo de pacientes. Aunque la expresión de todos los biomarcadores permaneció estable, se observaron cambios relevantes en la proporción de linfocitos citotóxicos, lo que sugiere una revisión homeostática hacia valores fisiológicos sin alteraciones adicionales en los linfocitos CD4⁺ ni en las células mieloides (Fig. 15). Este hallazgo concuerda con datos previos que muestran alteraciones en la dinámica leucocitaria asociadas a la progresión del RCC, aunque limitadas a pacientes de bajo riesgo⁽⁹⁵⁾.

Somos conscientes de las limitaciones de nuestro estudio, entre ellas, el reducido número de participantes, el seguimiento a corto plazo y el enfoque limitado a fenotipos celulares CD3⁺ y CD14⁺ en la evaluación de biomarcadores de agotamiento. Sin embargo, consideramos que nuestros hallazgos son valiosos debido al carácter clínico del estudio, el uso combinado de inmunohistoquímica y citometría de flujo, el análisis simultáneo de tejido tumoral y sangre, y la inclusión homogénea de pacientes con RCC localizado. En el futuro, será necesario realizar un estudio prospectivo para evaluar la relevancia clínica de estos biomarcadores como herramientas pronósticas y predictivas que guíen el uso de inmunoterapia en pacientes con RCC.

11. Perspectivas Futuras

Actualmente existen diversas limitaciones que impiden la implementación formal de biomarcadores para predecir la respuesta a los inhibidores de puntos de control inmunitarios. Una de las principales barreras es la inconsistencia en los resultados reportados, la cual se atribuye, en gran medida, a la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas y al reducido número de pacientes incluidos en los análisis clínicos. Esta falta de representatividad limita la generalización de los hallazgos y dificulta el establecimiento de criterios clínicos sólidos.

Adicionalmente, la ausencia de estandarización en los métodos experimentales y reactivos utilizados ha obstaculizado la replicación de estudios pioneros en distintos contextos clínicos. Esta variabilidad metodológica genera discrepancias en los resultados obtenidos y retrasa la validación de biomarcadores con potencial clínico.

Otro desafío importante radica en el conocimiento limitado de los mecanismos de resistencia a ICIs y su relación con la expresión de los posibles biomarcadores. Esta falta de comprensión no solo dificulta la predicción de la eficacia terapéutica, sino también la evaluación de la seguridad clínica del uso de inmunoterapia, especialmente en pacientes con enfermedad avanzada o comorbilidades asociadas.

Finalmente, la resistencia intrínseca del RCC a la quimioterapia y la necesidad de implementar esquemas terapéuticos complejos y combinados plantean un obstáculo adicional para establecer un enfoque racional y uniforme en el estudio de la expresión de biomarcadores tumorales.

12.CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio confirman que los marcadores de agotamiento identificados en el microambiente tumoral también pueden ser detectados en linfocitos T circulantes en pacientes con carcinoma de células renales subtipo células claras (ccRCC).

13.BIBLIOGRAFÍA

1. Schwartz SM. Epidemiology of Cancer. Clin Chem. 1 de enero de 2024;70(1):140-9.
2. Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. World J Oncol. junio de 2020;11(3):79-87.
3. Bukavina L, Bensalah K, Bray F, Carlo M, Challacombe B, Karam JA, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma: 2022 Update. Eur Urol. 1 de noviembre de 2022;82(5):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. diciembre de 2017;3(6):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 Int. 30 de agosto de 2023;23(1):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. J Cancer. 9 de septiembre de 2021;12(21):6563-75.
7. Frew IJ, Moch H. A clearer view of the molecular complexity of clear cell renal cell carcinoma. Annu Rev Pathol. 2015;10:263-89.
8. Warren AY, Harrison D. WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. World J Urol. 2018;36(12):1913-26.
9. Jian Y, Yang K, Sun X, Zhao J, Huang K, Aldanakh A, et al. Current Advance of Immune Evasion Mechanisms and Emerging Immunotherapies in Renal Cell Carcinoma. Front Immunol. 2021;12:639636.
10. Qi H, Ohh M. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein sensitizes renal cell carcinoma cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB-dependent antiapoptotic pathway. Cancer Res. 1 de noviembre de 2003;63(21):7076-80.
11. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. Nat Rev Clin Oncol. diciembre de 2017;14(12):717-34.
12. Kim JH, Kim GH, Ryu YM, Kim SY, Kim HD, 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. Front Oncol. 2022;12:969569.
13. 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. 13 de mayo de 2024;41(6):150.

14. Errarte P, Larrinaga G, López JI. The role of cancer-associated fibroblasts in renal cell carcinoma. An example of tumor modulation through tumor/non-tumor cell interactions. *J Adv Res.* enero de 2020;21:103-8.
15. Fujita K, Kimura G, Tsuzuki T, Kato T, Banno E, Kazama A, et al. The Association of Tumor Immune Microenvironment of the Primary Lesion with Time to Metastasis in Patients with Renal Cell Carcinoma: A Retrospective Analysis. *Cancers.* 26 de octubre de 2022;14(21):5258.
16. Salinas-Carmona MC. TNMI may improve current cancer staging. *J Cancerol.* 24 de julio de 2019;6:28-30.
17. Ozga AJ, Chow MT, Luster AD. Chemokines and the immune response to cancer. *Immunity.* 11 de mayo de 2021;54(5):859-74.
18. Faenza I, Blalock WL. Innate Immunity: A Balance between Disease and Adaption to Stress. *Biomolecules.* 23 de mayo de 2022;12(5):737.
19. Natoli G, Ostuni R. Adaptation and memory in immune responses. *Nat Immunol.* julio de 2019;20(7):783-92.
20. Deets KA, Vance RE. Inflammasomes and adaptive immune responses. *Nat Immunol.* abril de 2021;22(4):412-22.
21. Zindl CL, Chaplin DD. Tumor Immune Evasion. *Science.* 7 de mayo de 2010;328(5979):697-8.
22. Simonaggio A, Epailard N, Pobel C, Moreira M, Oudard S, Vano YA. Tumor Microenvironment Features as Predictive Biomarkers of Response to Immune Checkpoint Inhibitors (ICI) in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma (mccRCC). *Cancers.* enero de 2021;13(2):231.
23. Pichler R, Siska PJ, Tymoszyk P, Martowicz A, Untergasser G, Mayr R, et al. A chemokine network of T cell exhaustion and metabolic reprogramming in renal cell carcinoma. *Front Immunol [Internet].* 16 de marzo de 2023 [citado 29 de julio de 2025];14. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1095195/full>
24. González-Garza R, Gutiérrez-González A, Salinas-Carmona M, Mejía-Torres M. Biomarkers for evaluating the clinical response to immune checkpoint inhibitors in renal cell carcinoma (Review). *Oncol Rep.* 14 de octubre de 2024;52(6):164.
25. Wang DY, Salem JE, Cohen JV, Chandra S, Menzer C, Ye F, et al. Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 1 de diciembre de 2018;4(12):1721-8.
26. Karras P, Black JRM, McGranahan N, Marine JC. Decoding the interplay between genetic and non-genetic drivers of metastasis. *Nature.* mayo de 2024;629(8012):543-54.
27. Ucche S, Hayakawa Y. Immunological Aspects of Cancer Cell Metabolism. *Int J Mol Sci.* enero de 2024;25(10):5288.
28. Bucciol G, Delafontaine S, Meyts I, Poli C. Inborn errors of immunity: A field without frontiers. *Immunol Rev.* marzo de 2024;322(1):15-27.
29. Zhang Q, Lin B, Chen H, Ye Y, Huang Y, Chen Z, et al. Lipid metabolism-related gene expression in the immune microenvironment predicts prognostic outcomes in renal cell carcinoma. *Front Immunol [Internet].* 27 de noviembre de 2023 [citado 29 de julio de

2025];14. Disponible en:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1324205/full>

30. Ma Y, Adjemian S, Mattarollo SR, Yamazaki T, Aymeric L, Yang H, et al. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity*. 18 de abril de 2013;38(4):729-41.
31. 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 Organo Uff Della Soc Ital Nefrol*. 20 de junio de 2022;39(3):2022-vol3.
32. Mickisch G, Bier H, Bergler W, Bak M, Tschada R, Alken P. P-170 Glycoprotein, Glutathione and Associated Enzymes in Relation to Chemoresistance of Primary Human Renal Cell Carcinomas. *Urol Int*. 1990;45(3):170-6.
33. Morais C, Gobe G, Johnson DW, Healy H. Inhibition of nuclear factor kappa B transcription activity drives a synergistic effect of pyrrolidine dithiocarbamate and cisplatin for treatment of renal cell carcinoma. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. abril de 2010;15(4):412-25.
34. Yang WZ, Zhou H, Yan Y. XIAP underlies apoptosis resistance of renal cell carcinoma cells. *Mol Med Rep*. enero de 2018;17(1):125-30.
35. Büscheck F, Fraune C, Simon R, Kluth M, Hube-Magg C, Möller-Koop C, et al. Prevalence and clinical significance of VHL mutations and 3p25 deletions in renal tumor subtypes. *Oncotarget*. 21 de enero de 2020;11(3):237-49.
36. Guo Y, Schoell M, Freeman R. The von Hippel-Lindau protein sensitizes renal carcinoma cells to apoptotic stimuli through stabilization of BIMEL. *Oncogene*. 23 de abril de 2009;28(16):1864-74.
37. Toth C, Funke S, Nitsche V, Liverts A, Zlachevska V, Gasis M, et al. The role of apoptosis repressor with a CARD domain (ARC) in the therapeutic resistance of renal cell carcinoma (RCC): the crucial role of ARC in the inhibition of extrinsic and intrinsic apoptotic signalling. *Cell Commun Signal CCS*. 2 de mayo de 2017;15(1):16.
38. Ascierto ML, McMiller TL, Berger AE, Danilova L, Anders RA, Netto GJ, et al. The Intratumoral Balance between Metabolic and Immunologic Gene Expression Is Associated with Anti-PD-1 Response in Patients with Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 1 de septiembre de 2016;4(9):726-33.
39. 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-naïve clear cell renal cell cancer. *Int Urol Nephrol*. 1 de diciembre de 2021;53(12):2493-503.
40. Kawashima A, Kanazawa T, Kidani Y, Yoshida T, Hirata M, Nishida K, et al. Tumour grade significantly correlates with total dysfunction of tumour tissue-infiltrating lymphocytes in renal cell carcinoma. *Sci Rep*. 10 de abril de 2020;10(1):6220.
41. Derosa L, Hellmann MD, Spaziano M, Halpenny D, Fidelle M, Rizvi H, et al. Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 de junio de 2018;29(6):1437-44.
42. Xing Y, Hogquist KA. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1 de junio de 2012;4(6):a006957.
43. Makino T, Kadomoto S, Izumi K, Mizokami A. Epidemiology and Prevention of Renal Cell

- Carcinoma. *Cancers*. enero de 2022;14(16):4059.
44. Chevrier S, Levine JH, Zanotelli VRT, Silina K, Schulz D, Bacac M, et al. An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell*. mayo de 2017;169(4):736-749.e18.
 45. Rai K, Pilarski R, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH. Comprehensive review of *BAP1* tumor predisposition syndrome with report of two new cases. *Clin Genet*. marzo de 2016;89(3):285-94.
 46. Courthod G, Tucci M, Di Maio M, Scagliotti GV. Papillary renal cell carcinoma: A review of the current therapeutic landscape. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1 de octubre de 2015;96(1):100-12.
 47. Schmidt LS, Linehan WM. Molecular genetics and clinical features of Birt–Hogg–Dubé syndrome. *Nat Rev Urol*. octubre de 2015;12(10):558-69.
 48. Gammon A, Jaspersen K, Champine M. Genetic basis of Cowden syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet*. julio de 2016;Volume 9:83-92.
 49. Mohanty SK, Lobo A, Cheng L. The 2022 revision of the World Health Organization classification of tumors of the urinary system and male genital organs: advances and challenges. *Hum Pathol*. junio de 2023;136:123-43.
 50. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras*. 2015;48(3):166-74.
 51. Roos FC, Steffens S, Junker K, Janssen M, Becker F, Wegener G, et al. Survival advantage of partial over radical nephrectomy in patients presenting with localized renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 26 de mayo de 2014;14(1):372.
 52. Tselis N, Chatzikonstantinou G. Treating the Chameleon: Radiotherapy in the management of Renal Cell Cancer. *Clin Transl Radiat Oncol*. mayo de 2019;16:7-14.
 53. Thomson RJ, Moshirfar M, Ronquillo Y. Tyrosine Kinase Inhibitors. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [citado 25 de abril de 2025]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563322/>
 54. Vento JA, Rini BI. Treatment of Refractory Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Cancers*. 13 de octubre de 2022;14(20):5005.
 55. Michaelis J, Grabbert M, Sigle A, Yilmaz M, Schlager D, Gratzke C, et al. Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Metastatised Renal Cell Carcinoma-Future or the Past? *Cancers*. 3 de agosto de 2022;14(15):3777.
 56. Jaafar J, Fernandez E, Alwan H, Philippe J. Programmed cell death-1 and programmed cell death ligand-1 antibodies-induced dysthyroidism. *Endocr Connect*. mayo de 2018;7(5):R196-211.
 57. Wu M, Huang Q, Xie Y, Wu X, Ma H, Zhang Y, et al. Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 12 de marzo de 2022;15(1):24.
 58. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 5 de noviembre de 2015;373(19):1803-13.

59. Albiges L, Rodriguez L, Kim SW, Im SA, Carcereny E, Rha S, et al. Safety and clinical activity of MEDI5752, a PD-1/CTLA-4 bispecific checkpoint inhibitor, as monotherapy in patients (pts) with advanced renal cell carcinoma (RCC): Preliminary results from an FTIH trial. *J Clin Oncol*. 1 de junio de 2022;40:107-107.
60. Takamatsu K, Tanaka N, Hakozaki K, Takahashi R, Teranishi Y, Murakami T, et al. Profiling the inhibitory receptors LAG-3, TIM-3, and TIGIT in renal cell carcinoma reveals malignancy. *Nat Commun*. 20 de septiembre de 2021;12(1):5547.
61. Ishihara H, Takagi T, Kondo T, Fukuda H, Tachibana H, Yoshida K, et al. Predictive impact of an early change in serum C-reactive protein levels in nivolumab therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. mayo de 2020;38(5):526-32.
62. Yano Y, Ohno T, Komura K, Fukuokaya W, Uchimoto T, Adachi T, et al. Serum C-reactive Protein Level Predicts Overall Survival for Clear Cell and Non-Clear Cell Renal Cell Carcinoma Treated with Ipilimumab plus Nivolumab. *Cancers*. 17 de noviembre de 2022;14(22):5659.
63. 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). *J Clin Oncol*. 1 de septiembre de 2022;40(25):2913-23.
64. Motzer RJ, Choueiri TK, McDermott DF, Powles T, Vano YA, Gupta S, et al. Biomarker analysis from CheckMate 214: nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in renal cell carcinoma. *J Immunother Cancer*. 18 de marzo de 2022;10(3):e004316.
65. Bromwich EJ, McArdle PA, Canna K, McMillan DC, McNicol AM, 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*. noviembre de 2003;89(10):1906-8.
66. Koh Y, Nakano K, Katayama K, Yamamichi G, Yumiba S, Tomiyama E, et al. Early dynamics of circulating tumor DNA predict clinical response to immune checkpoint inhibitors in metastatic renal cell carcinoma. *Int J Urol*. 2022;29(5):462-9.
67. Incorvaia L, Fanale D, Badalamenti G, Brando C, Bono M, De Luca I, et al. A “Lymphocyte MicroRNA Signature” as Predictive Biomarker of Immunotherapy Response and Plasma PD-1/PD-L1 Expression Levels in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Pointing towards Epigenetic Reprogramming. *Cancers*. noviembre de 2020;12(11):3396.
68. Schalper KA, Carleton M, Zhou M, Chen T, Feng Y, Huang SP, et al. Elevated serum interleukin-8 is associated with enhanced intratumor neutrophils and reduced clinical benefit of immune-checkpoint inhibitors. *Nat Med*. mayo de 2020;26(5):688-92.
69. Ivanova E, Asadullina D, Rakhimov R, Izmailov A, Izmailov A, Gilyazova G, et al. Exosomal miRNA-146a is downregulated in clear cell renal cell carcinoma patients with severe immune-related adverse events. *Non-Coding RNA Res*. septiembre de 2022;7(3):159-63.
70. Petitprez F, Ayadi M, de Reyniès A, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Job S. Review of Prognostic Expression Markers for Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol*. 2021;11:643065.
71. Lee CH, Shah AY, Rasco D, Rao A, Taylor MH, Di Simone C, et al. Lenvatinib plus pembrolizumab in patients with either treatment-naive or previously treated metastatic renal cell carcinoma (Study 111/KEYNOTE-146): a phase 1b/2 study. *Lancet Oncol*. julio de

2021;22(7):946-58.

72. 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 Cancer J Clin.* 2024;74(3):229-63.
73. Majidpoor J, Mortezaee K. Interleukin-2 therapy of cancer-clinical perspectives. *Int Immunopharmacol.* 1 de septiembre de 2021;98:107836.
74. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 21 de marzo de 2019;380(12):1103-15.
75. 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. *N Engl J Med.* 5 de abril de 2018;378(14):1277-90.
76. 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 Off J Eur Soc Med Oncol.* marzo de 2016;27(3):441-8.
77. 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.* 15 de junio de 2019;393(10189):2404-15.
78. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 4 de diciembre de 2017;7(1):16878.
79. Saliby RM, Saad E, Kashima S, Schoenfeld DA, Braun DA. Update on Biomarkers in Renal Cell Carcinoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* enero de 2024;44(2):e430734.
80. Khatami F, Nasir Shirazi M, Aghamir SMK. A Systematic Review of Circulating Tumor Cells in Renal Cell Carcinoma. *Transl Res Urol [Internet].* enero de 2021 [citado 11 de junio de 2025];3(1). Disponible en: <https://doi.org/10.22034/tru.2020.257587.1050>
81. Braun DA, Street K, Burke KP, Cookmeyer DL, Denize T, Pedersen CB, et al. Progressive immune dysfunction with advancing disease stage in renal cell carcinoma. *Cancer Cell.* 10 de mayo de 2021;39(5):632-648.e8.
82. 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.* 1 de enero de 2021;49(1):0300060520981539.
83. Shah AY, Kotecha RR, Lemke EA, Chandramohan A, Chaim JL, Msaouel P, et al. Outcomes of patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma treated with second-line VEGFR-TKI after first-line immune checkpoint inhibitors. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* junio de 2019;114:67-75.
84. 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.* 24 de noviembre de 2017;8:1769.
85. 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 Lett.* 28 de agosto de 2021;514:48-62.

86. 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. *Eur J Immunol.* 2007;37(6):1431-41.
87. Tiwary S, Berzofsky JA, Terabe M. Altered Lipid Tumor Environment and Its Potential Effects on NKT Cell Function in Tumor Immunity. *Front Immunol [Internet].* 18 de septiembre de 2019 [citado 14 de agosto de 2024];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.02187/full>
88. Wang QJ, Hanada KI, Yang JC. Characterization of a novel nonclassical T cell clone with broad reactivity against human renal cell carcinomas. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de septiembre de 2008;181(6):3769-76.
89. 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.* septiembre de 2013;112(5):686-96.
90. Young M, Tapia JC, Szabados B, Jovaisaite A, Jackson-Spence F, Nally E, et al. NLR Outperforms Low Hemoglobin and High Platelet Count as Predictive and Prognostic Biomarker in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Genitourin Cancer.* junio de 2024;22(3):102072.
91. Giraldo NA, Becht E, Vano Y, Petitprez F, Lacroix L, Validire P, et al. Tumor-Infiltrating and Peripheral Blood T-cell Immunophenotypes Predict Early Relapse in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1 de agosto de 2017;23(15):4416-28.
92. Kawashima A, Kanazawa T, Kidani Y, Yoshida T, Hirata M, Nishida K, et al. Tumour grade significantly correlates with total dysfunction of tumour tissue-infiltrating lymphocytes in renal cell carcinoma. *Sci Rep.* 10 de abril de 2020;10(1):6220.
93. Zhou Y, Jiang D, Chu X, Cheng W, Huang S, Wang J, et al. Prognostic value of peripheral blood T lymphocyte subsets in clear cell renal cell carcinoma. *Transl Androl Urol.* enero de 2021;10(1):326-35.
94. Kawakami F, Sircar K, Rodriguez-Canales J, Fellman BM, Urbauer DL, Tamboli P, et al. PD-L1 and Tumor Infiltrating Lymphocytes Status in Patients with Renal Cell Carcinoma and Sarcomatoid Dedifferentiation. *Cancer.* 15 de diciembre de 2017;123(24):4823-31.
95. Ozbek E, Besiroglu H, Ozer K, Horsanali MO, Gorgel SN. Systemic immune inflammation index is a promising non-invasive marker for the prognosis of the patients with localized renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol.* agosto de 2020;52(8):1455-63.

14.ANEXOS

14.1 Cartas Comité

 UANL <small>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</small>	 <small>FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO</small>
--	---

DR. C. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA
Servicio de Inmunología.
Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
Presente. -

Estimado Dr. C. Salinas:

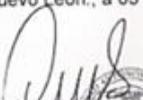
Por medio de la presente, me permito informarle que el Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" ha revisado el informe **IP24-00041** presentado a este Comité, correspondiente al protocolo de investigación clínica:

Titulado "Detección de Expresión de Marcadores de Agotamiento de Linfocitos T a Nivel Local y Sistémico en Pacientes con CA de riñón" registrado con la clave IN23-00002.

Por lo que la aprobación del estudio arriba citado se mantiene vigente al **11 de enero de 2025**, le pedimos atentamente nos siga manteniendo informados del avance anualmente de este proyecto, así como de desviaciones o cambios del protocolo para eliminar peligros inmediatos a los sujetos del estudio, cambios que incrementan el riesgo para los sujetos y/o que afecten significativamente la conducción del estudio, las reacciones adversas que sean serias e inesperadas, al igual que de nueva información que pueda afectar en forma adversa la seguridad de los sujetos o la conducción del estudio.

Esta renovación fue sometida a destiempo, sin embargo, de acuerdo a nuestros procedimientos, el comité a mi cargo tiene como función principal salvaguardar la seguridad y garantizar el bienestar y los derechos de todos los participantes en investigación desde que son reclutados hasta que finalizan su participación en el estudio. Por lo que el seguimiento, vigilancia y protección que se les da a los mismos no se vio afectado.

Atentamente,
"Alere Flammam Veritatis"
Monterrey, Nuevo León., a 03 de abril de 2024


DR. med. OSCAR DE LA GARZA CASTRO
Presidente del Comité de Ética en Investigación
No. registro CEI: CONBIOÉTICA-19-CEI-001-20160404

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

Comité de Ética en Investigación
Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzállez s n, Col. Miras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México
Teléfonos: 81 8329 4050, Ext. 2970 a 2974. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduani.com


Full AAHRPP Accredited
September 14, 2022



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

DR. C. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA
Servicio de Inmunología,
Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
Presente. -

Estimado Dr. C. Salinas:

Por medio de la presente, me permito informarle que el Comité de Investigación del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" ha revisado el informe IP24-00041 presentado a este Comité, correspondiente al protocolo de investigación clínica:

Titulado "Detección de Expresión de Marcadores de Agotamiento de Linfocitos T a Nivel Local y Sistémico en Pacientes con CA de riñón" registrado con la clave IN23-00002.

Por lo que la aprobación del estudio arriba citado se mantiene vigente al **11 de enero de 2025**, le pedimos atentamente nos siga manteniendo informados del avance anual de este proyecto, así como de desviaciones o cambios del protocolo para eliminar peligros inmediatos a los sujetos del estudio, cambios que incrementan el riesgo para los sujetos y/o que afecten significativamente la conducción del estudio, las reacciones adversas que sean serias e inesperadas, al igual que de nueva información que pueda afectar en forma adversa la seguridad de los sujetos o la conducción del estudio.

Esta renovación fue sometida a destiempo, sin embargo, de acuerdo a nuestros procedimientos, el comité a mi cargo tiene como función principal salvaguardar la seguridad y garantizar el bienestar y los derechos de todos los participantes en investigación desde que son reclutados hasta que finalizan su participación en el estudio. Por lo que el seguimiento, vigilancia y protección que se les da a los mismos no se vió afectado.

Atentamente,

"Alero Flammam Veritatis"

Monterrey, Nuevo León., a 03 de abril de 2024

DR. med. DIANA ELSA FLORES ALVARADO
Presidenta del Comité de Investigación
No. registro COFEPRIS: 15 CI 19 039 067

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

Comité de Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México
Teléfonos: 81 8329 4050. Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduani.com



14.2 Protocolos

Protocolo de Digestión Enzimática del Tejido Renal y Tumoral

1. Pesar 2g de tejido tumoral y 2g de tejido renal adyacente.
2. Colocar cada muestra en tubos Falcon de 15mL con medio DMEM + 5% FBS.
3. Agregar 500 μ L de colagenasa (Cat. C9891; Sigma-Aldrich) según concentración del fabricante.
4. Agregar hialuronidasa 10X (Cat. H3506; Sigma-Aldrich).
5. Incubar en IncuShaker a 37°C, 200 RPM, durante 30 minutos.
6. Agregar 10mL de DPBS frío, centrifugar a 200xg, 5 min a 4°C.
7. Descartar sobrenadante y resuspender pellet celular.
8. Agregar 100 μ L de DNasa (Cat. 10104159001; Roche), incubar 1 min a temperatura ambiente.
9. Agregar 750 μ L de tripsina (Cat. 15090-046; Gibco) y EGTA (Cat. E3889; Sigma-Aldrich), incubar 1 min a temperatura ambiente.
10. Agregar 10mL de DPBS-FBS al 2% frío, centrifugar a 200xg, 5 min a 4°C.
11. Preparar dispasa: 25mg en 5mL de DPBS (Cat. 17105041; Gibco).
12. Agregar 1.5mL de dispasa, incubar 5 minutos.
13. Agregar 50 μ L de DNasa + 450 μ L de DPBS-FBS al 2%, incubar 1 min.
14. Agregar 2mL de solución de lisis de eritrocitos con cloruro de amonio, incubar 10 min.
15. Centrifugar a 200xg, 5 min a 4°C y resuspender pellet.
16. Filtrar con tamiz celular de 70 μ m (Cat. 352350; Falcon).
17. Contar células con cámara de Neubauer usando azul de tripano (90 μ L azul 0.4% + 10 μ L de muestra).

Protocolo de Extracción de Células Mononucleares de Sangre Periférica

1. Recolectar 4mL de sangre venosa periférica en tubos con EDTA.
2. Diluir la sangre 1:1 con DPBS.
3. En tubos Falcon, colocar 3mL de Ficoll-Paque.
4. Agregar la mezcla de sangre con cuidado sobre la capa de Ficoll.
5. Centrifugar a 400 xg durante 30 minutos a temperatura ambiente, sin freno.
6. Recuperar la capa de interfase (PBMC).
7. Lavar con 10mL de DPBS, centrifugar a 200xg, 10 minutos.
8. Repetir el lavado.
9. Contar las células con cámara de Neubauer usando azul de tripano.
10. Proceder a la tinción para citometría de flujo o almacenar a -80°C en FBS + 10% DMSO.

Protocolo de Inmunohistoquímica

1. Cortar secciones de tejido fijado en formalina al 10% e incluido en parafina a 3-5 μ m de espesor.
2. Colocar en portaobjetos y hornear a 60°C por 30 minutos.
3. Desparafinar con xilol (3 cambios, 5 min cada uno).
4. Rehidratar en gradiente de alcoholes: absoluto (2x3 min), 96% (2min), 70% (2min).
5. Lavar con agua destilada.
6. Recuperación antigénica: Discovery CC1 (pH 8.0) durante 64 min a 100°C (Ventana).
7. Lavar con metanol y secar al aire.
8. Bloquear peroxidasa endógena automáticamente (sistema Ventana Benchmark ULTRA).
9. Incubar con anticuerpos primarios (1:50, 32 min a 37°C): CTLA-4 (BSB-88), PD-L1 (SP263), CD3 (2GV6).
10. Aplicar anticuerpos secundarios: DAB (anti-CTLA-4, anti PD-L1), AEC (anti-CD3) por 12 min.
11. Lavar, deshidratar, montar con medio de montaje.
12. Digitalizar con escáner Ventana DP200.
13. Evaluación por patólogos y análisis digital con QuPath v0.5.1.

14.3 Constancias



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This certifies that the following person attended and participated in

IMMUNOLOGY2024™
Annual Meeting
of
The American Association of Immunologists
on May 3 - 7, 2024.

Raquel Gonzalez Garza

*Loretta L. Doan, Ph.D., Chief Executive Officer
The American Association of Immunologists, Inc.*

LA SECRETARÍA DE SALUD

Otorga la presente

CONSTANCIA

**Raquel González Garza, Manuel Mejía Torres, Mario César Salinas
Carmona, Adrián Gutiérrez González, Juan Pablo Flores Gutiérrez**

Por su **Participación** con el trabajo de investigación titulado:
"Análisis comparativo de la expresión de los marcadores de agotamiento PD-1 y CTLA-4 en
sangre y tejido tumoral obtenido de pacientes con carcinoma renal de células claras"
en la modalidad **TRABAJO EN EXTENSO**, en la categoría II. **Investigación en Ciencias Básicas**; en el curso **PRESENCIAL** de:

«23 ENCUENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD»

Realizado el 3 y 4 de agosto de 2023

Duración: **16 horas**

Créditos: **4**



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
DIRECTOR DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN EN SALUD
Y CALIDAD



LIC. ROSA MARÍA ALCALÁ ROBLEDO
JEFA DEL DEPARTAMENTO ESTATAL DE ENSEÑANZA Y
CAPACITACIÓN

DESIC/DEEC / No. Curso: 48/2023 Folio: 114

La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Subdirección de Investigación

otorga
La presente

CONSTANCIA

a
Raquel González Garza, Mario César Salinas Carmona, Adrián Gutiérrez González, Juan P. Flores Gutiérrez,
Manuel Guadalupe Mejía Torres

Por la presentación en forma POSTER DIGITAL del trabajo titulado:

"COMPARATIVE ANALYSIS OF PD-1 AND CTLA-4 EXPRESSION IN LYMPHOCYTES FROM PERIPHERAL BLOOD AND TUMOR TISSUE IN PATIENTS
WITH RENAL CELL CARCINOMA."



32° Congreso Nacional de
Investigación e Innovación
en Medicina
"Thinking Amidst Global Adversity"

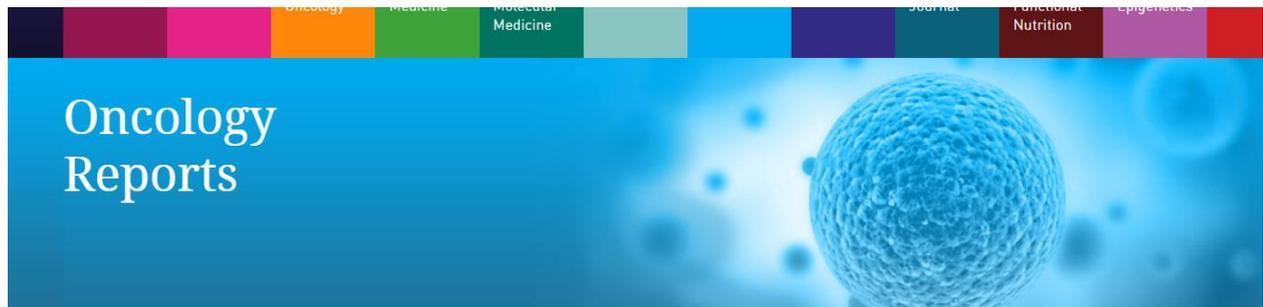
Llevando a cabo del 26 al 28 de octubre en Monterrey, NL, México
"Alere Flammam Veritatis"


Dr. med. Adrián Camacho Ortiz
Subdirector de Investigación


Dr. med. Oscar Vidal Gutiérrez
Director


Dr. Leonardo Guadalupe Mancillas Adame
Secretario de la Facultad de Medicina y la Investigación

14.4 Carátulas de Artículos Publicados



- Journal Home
- Current Issue
- Forthcoming Issue
- Special Issues
- Most Read
- Most Cited [Dimensions]
- Most Cited [CrossRef]
- Social Media
- Archive

Biomarkers for evaluating the clinical response to immune checkpoint inhibitors in renal cell carcinoma (Review)

Authors: Raquel González-Garza, Adrián Gutiérrez-González, Mario César Salinas-Carmona,  Manuel Mejía-Torres

[View Affiliations](#)

Published online on: October 14, 2024 <https://doi.org/10.3892/or.2024.8823>

Article Number: 164

Metrics: Total Views: **500** [Spandidos Publications: **500** | PMC Statistics: **0**]

Total PDF Downloads: **153** [Spandidos Publications: **153** | PMC Statistics: **0**]



December-2024
Volume 52 Issue 6
Print ISSN: 1021-335X
Online ISSN: 1791-2431
[Sign up for eToc alerts](#)
[Recommend to Library](#)