

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Médicas

## Expresión del HLA-G e inmunidad antitumoral en el carcinoma renal de células claras

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional de  
La Plata en el área de Ciencias Médicas.

**Lic. María Belén Palma**

Directora: Prof. Dra. Marcela N. García

Codirectora: Dra. Diana Tronik-Le Roux

Lugar de trabajo: Cátedra de Citología, Histología y Embriología, FCM, UNLP  
La Plata, 2021.

## Expresión del HLA-G e inmunidad antitumoral en el carcinoma renal de células claras

### Resumen

El carcinoma renal de células claras (CRCC) es el más frecuente dentro de los carcinomas renales, constituyendo entre el 70-80% de los casos. Esta neoplasia posee un gran potencial de crecimiento e invasividad, inclusive antes de manifestarse clínicamente. Además, no responde a los tratamientos oncológicos habituales, como la quimio y la radioterapia, por lo que se han estado utilizando diversas terapias alternativas, en especial para los casos de CRCC avanzado y/o metastásico. Entre ellas, podemos mencionar a la terapia antiangiogénica y a la inmunoterapia, ambas basadas en la administración de anticuerpos monoclonales neutralizantes, del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o de puntos de control inmunológicos (PCI), respectivamente. Estas terapias han sido probadas extensamente en ensayos clínicos y han mostrado cierto éxito en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, en algunos casos la eficacia clínica ha sido limitada. Por lo que es de gran importancia ahondar en la biología tumoral del CRCC para desarrollar nuevos tratamientos que mejoren la supervivencia del paciente y los resultados clínicos.

El HLA-G es un PCI que, al interactuar con sus receptores inhibitorios, ILT2 e ILT4, presentes en la superficie de las células inmunes, genera un microambiente de inmunosupresión local. Esta proteína tiene una expresión restringida a unos pocos tejidos adultos sanos, pero aparece en ciertas patologías, como es el caso del CRCC que la utiliza como un mecanismo de evasión. Es por ello que se propone el bloqueo

de la expresión del HLA-G como nuevo blanco terapéutico, el cual sería tumor-específico y generaría pocos efectos adversos.

En el presente trabajo nos propusimos evaluar a nivel proteico la expresión de factores angiogénicos y del PCI HLA-G/ILTs en muestras de CRCC obtenidas de biopsias de pacientes. Los resultados mostraron una extensa y heterogénea distribución en la marcación, en todas las muestras tumorales analizadas, por lo que creemos que estos biomarcadores juegan un rol fundamental en la patogenia del CRCC. Por otro lado, hemos desarrollado cultivos celulares primarios de células tumorales (CT) crecidas a partir de las muestras de CRCC recibidas. Estos cultivos permitieron aislar a las CT del resto de células que conforman el estroma tumoral. Al medir los marcadores de interés en las CT obtenidas, tanto a nivel proteico como transcriptómico, confirmamos la extensa expresión del VEGF-A y del HLA-G, pero además, por primera vez encontramos que los principales receptores del HLA-G, ILT2 e ILT4, se expresan también en las CT.

Además, hemos obtenido y caracterizado a células madre mesenquimales de muestras de cordones umbilicales humanos (CMM-CU), con el fin de estudiar el efecto que éstas podrían ejercer sobre las CT. Las CMM-CU han sido propuestas en los últimos años como vehículo de drogas anti-tumorales por sus propiedades intrínsecas, entre las que podemos mencionar su tropismo hacia el lecho tumoral. Según nuestros estudios, estas células generan una inhibición importante en las células del sistema inmune, en parte debido a que también expresan HLA-G, y además liberan factores de crecimiento a su entorno. Estas características las convierte en células poco recomendables para su utilización en terapias oncológicas.

Por último, hemos logrado bloquear la expresión del HLA-G mediante edición génica con el sistema de CRISPR/Cas9 en dos líneas celulares tumorales en ensayos

*in vitro*. El silenciamiento de esta proteína generó una reactivación de la actividad de las células inmunitarias NK.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo sientan las bases para una potencial terapia contra el CRCC. El conocimiento generado podría ayudar a mejorar la efectividad de la terapia antiangiogénica y de la inmunoterapia, aumentando así la tasa de supervivencia de los pacientes. Proponemos además, que la combinación de ambas estrategias terapéuticas generaría una sinergia en el tratamiento de esta neoplasia.

**Palabras clave:** Carcinoma renal de células claras, HLA-G, angiogénesis, VEGF, CRISPR/Cas9.

## HLA-G expression and antitumor immunity in clear cell renal carcinoma

### Abstract

Clear cell renal carcinoma (CCRC) is the most frequent renal carcinoma and constitutes between 70-80% of total cases. This neoplasia is characterized by a high potential of growth and invasivity, even before clinical manifestations. Furthermore, it is unresponsive to habitual oncology treatments, such as chemo and radiotherapy. The antiangiogenic- and immune-therapy have been proposed as alternative strategies, especially for advanced or metastatic CCRC. These are based on the administration of neutralizing monoclonal antibodies to block the vascular endothelial growth factor (VEGF) or immune-checkpoints (IC), respectively. Both therapies have been already extensively tested in clinical trials and have shown some success in cancer treatment. However, the clinical effectiveness has been limited in some cases. Thus, it would be important to know more about the biology of the CCRC in order to develop new treatments to improve clinical outcomes and patient survival.

HLA-G is an IC that, through its interaction with the inhibitory receptors, ILT2 and ILT4, both mainly expressed by immune cells, generates a local immunosuppressive microenvironment. HLA-G has a restricted expression in normal adult tissues. However, its expression can be ectopically induced in some pathologies, such as in CCRC, which uses it as an evasion mechanism. Thus, the HLA-G expression blockade is a promising therapeutic target for new immunotherapies with relatively low chances of significant side effects.

In the present work, we proposed to evaluate the protein expression of angiogenic factors and the IC HLA-G/ILTs in samples derived from patient biopsies with a CCRC confirmed diagnosis. Extensive and heterogeneous staining was found in all tumor samples, thus we believe that these biomarkers play a fundamental role in the CCRC pathology. Also, we obtained primary cultures of tumor cells (TC) derived from the CCRC tumor samples, to isolate the TC from the rest of the tumoral stromal cells. In these samples were measured the same biomarkers, at protein and transcriptomic level. The results confirmed the extensive expression of HLA-G and VEGF-A in cultured TC. Moreover, the main receptors of HLA-G, ILT2 and ILT4, was found expressed for the first time in the cultured TC.

In addition, we have obtained and characterized mesenchymal stem cells from samples of human umbilical cords (MSC-UC), in order to study their effect on TC. In recent years, the use of MSC-UC has been considered a promising approach for the development of cell-based antitumoral drug delivery vehicles because of their intrinsic properties, including homing ability and tumor tropism. According to our results, these cells generate a significant inhibition of the immune system, in part because they express HLA-G, and they also release growth factors into their environment. Due to the characteristics mentioned, it would not be convenient to use the MSC-UC in cancer therapies.

Finally, we succeed to block HLA-G expression by gene editing with the CRISPR/Cas9 system in two tumor cell lines. The silencing of this protein generated a reactivation of the NK immune cells activity.

The obtained results throughout this work lay the foundations for potential therapies against CCRC. The knowledge generated could help improve the effectiveness of antiangiogenic-and immuno-therapy, and therefore increase the

survival rate of patients. These findings provide the rationale for co-targeting angiogenesis and the immune checkpoint HLA-G that would produce a synergy in the treatment of this neoplasia.

**Keywords:** clear cell renal carcinoma, HLA-G, angiogenesis, VEGF, CRISPR/Cas9.

## Agradecimientos

Otra etapa que llega a su fin, con tanto esfuerzo y dedicación, pero que significa el comienzo de algo nuevo. No solo crecí en cuanto a lo académico, sino que me sirvió para crecer como persona, para vivir experiencias hermosas y sobre todo para reafirmar que realmente amo la profesión que elegí desde que tenía 13 años.

Y en todo este camino recorrido muchas personas me acompañaron y formaron parte, y quiero aprovechar a dar las gracias:

A Marcela que fue la primera persona en confiar en mí, me apoyó y guió durante toda esta etapa, me enseñó muchas cosas tanto en lo profesional como en lo personal, y me abrió las puertas de la Cátedra de Histología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP, de la cual me siento parte del equipo de Docencia y de Investigación desde el primer día.

A todos mis compañeros de la Cátedra, son muchos por nombrar pero cada uno ocupa un lugar importante en mí. Ana, Lau, Fer, Dami, Pablo, Marina, Cami, Ailen, Su, Walter, Javi, Maite, Mari y Vladi.

A Santiago, porque aprendí mucho de sus brillantes ideas y siempre me dió la confianza para ir adelante y cumplir con las metas.

A toda esa gran familia que es el LIAN-FLENI, que si bien no compartimos el día a día, siempre me recibieron de la mejor manera. En especial, a Lucía, Ari, Ale y Charly que me enseñaron mucho.

A Diana, con quien tuve la oportunidad de trabajar en mis pasantías en Paris, pero la relación siguió más allá de esos meses, y seguiremos trabajando en equipo.

De Francia también me quedo con las divertidas mañanas con Marina, quien me ayudó en todo lo que tenía a su alcance. Al Dr. Carosella quien nos brindó la oportunidad de trabajar en colaboración.

Y el mayor agradecimiento es para mi familia. A mis papás que me enseñaron la responsabilidad y perseverancia en lo que uno hace, en seguir siempre hacia adelante apostando a más para llegar a las metas que uno se propone, y por sobre todas las cosas a respetar y ser agradecida con las personas. A mis hermanas, Ari y Valen, y mis abuelos, Alicia, Miguel y Mabel, que son grandes pilares en mi vida y siempre tienen las palabras justas. A mi abuelo Horacio que estaría muy feliz de verme "Dotora". A mis tíos y primos.

A mi otra familia, a mis amigos, que los elijo para toda la vida. Mary, Eglu, Mariu, Male, Vicky, Vickyta, Flor, Di, Nacho, Lulo, Nico y Fede. Escuchandome hablar de cosas raras, de células que tenía que darles de comer, de publicaciones, de becas, de estres, de llanto, de alegría, etc.

Y a Emma, la persona que elijo, mi pareja, mi sostén, mi familia. Quien me acompaña en cada decisión y cada momento.

## Índice general

Resumen .....	2
Abstract.....	5
Agradecimientos .....	8
Índice general.....	10
Abreviaturas .....	14
1 Introducción.....	17
1.1 Clasificación del CR.....	18
1.2 Histopatología del CRCC.....	20
1.3 Citogenética del CRCC.....	22
1.4 Signos y síntomas.....	24
1.5 Diagnóstico.....	25
1.6 Estadificación, invasividad y metástasis .....	27
1.7 Grado nuclear de Fuhrman.....	29
1.8 Tratamientos para el CRCC .....	30
1.8.1 Quirúrgico.....	30
1.8.2 Terapia antiangiogénica .....	32
1.8.3 Inmunoterapia .....	35
1.9 Pronóstico de los pacientes con CRCC.....	38
1.10 Antígeno leucocitario humano G (HLA-G) .....	39
1.10.1 Aspectos generales del punto de control inmunológico HLA-G/ILT 39	
1.10.2 Descripción del gen <i>hla-g</i> .....	40
1.10.3 Expresión de la proteína HLA-G.....	42
1.10.4 Receptores de la proteína HLA-G .....	42
1.10.5 Funciones de la proteína HLA-G .....	43
1.10.6 HLA-G en oncología.....	45
1.11 Nuevos enfoques para el tratamiento oncológico.....	48

1.11.1	Edición génica .....	48
1.11.2	Estrategia de vehiculización de drogas mediada por células madre mesenquimales (CMM).....	50
2	Hipótesis.....	53
3	Objetivo .....	53
3.1	Primera parte .....	53
3.2	Segunda parte.....	54
3.3	Tercera parte.....	54
4	Materiales y método.....	56
4.1	Pacientes y tumores .....	56
4.2	Cultivo celular primario a partir de las muestras de pacientes.....	56
4.3	Obtención y aislamiento de las CMM-CU .....	58
4.4	Líneas celulares estables.....	58
4.5	Cultivo, expansión y criopreservación de las líneas celulares utilizadas	59
4.6	Procesamiento de las muestras para el estudio microscópico.....	60
4.7	Determinación del índice de microdensidad vascular (MDV).....	61
4.8	Citometría de flujo .....	62
4.9	Western Blotting.....	63
4.10	Extracción de ADN genómico.....	64
4.11	Extracción de ARN total.....	65
4.12	Retrotranscripción del ARN.....	65
4.13	PCR a tiempo final, cualitativa.....	66
4.14	PCR cuantitativa (qPCR) .....	67
4.15	Purificación del producto de PCR del gel de agarosa.....	69
4.16	Purificación del producto de PCR de la mezcla de reacción .....	69
4.17	Diseño y clonado de los ARN guías para CRISPR/Cas9.....	70
4.18	Preparación de plásmidos - Transformación de bacterias competentes 72	
4.19	Preparación de plásmidos a gran escala (Maxi-prep).....	73

4.20	Transfección de las líneas celulares con el sistema CRISPR/Cas9.....	74
4.21	Aislamiento clonal de las RCC7/HLA-G1 editadas mediante CRISPR/Cas9 .....	75
4.22	Secuenciación .....	76
4.23	Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica .....	77
4.24	Purificación de células NK a partir de las PBMC .....	78
4.25	Ensayo de degranulación de las células NK.....	79
4.26	Ensayo de inmunomodulación <i>ex vivo</i> de linfocitos activados .....	81
4.27	Ensayo de proliferación celular .....	82
4.28	Análisis estadístico.....	83
5	Resultados. Primera Parte.....	85
5.1	Características clínico-patológicas de pacientes con CRCC.....	85
5.2	Estudio mediante IHQ de marcadores de angiogénesis, VEGF-A y CD34, y del punto de control inmunológico HLA-G/ILT4 .....	88
5.3	Análisis de la MDV y su relación con el VEGF-A.....	93
5.4	Obtención de cultivos celulares primarios a partir de CT crecidas de las muestras de pacientes con CRCC .....	96
5.4.1	Análisis de marcadores de superficie en las CT crecidas a partir de cultivos primarios de CRCC y en las células de tejido renal normal, mediante CF	99
5.4.2	Análisis de puntos de control inmunológicos (PCI) sobre la superficie de las CT crecidas a partir de cultivos primarios de CRCC, mediante CF. ....	101
5.4.3	Estudio de la expresión de VEGF-A, VEGF-C, HLA-G e ILT4 mediante RT-qPCR en las CT crecidas a partir de cultivos primarios de CRCC y en las células de tejido renal normal.....	102
5.4.4	Análisis de las isoformas del HLA-G presentes en las zonas tumORAles central y periférica mediante RT-PCR.....	105
6	Resultados. Segunda parte.....	109
6.1	Caracterización de las CMM-CU a través del análisis de marcadores de superficie mediante CF.....	109
6.2	Evaluación de la presencia de HLA-G en las CMM-CU .....	111

6.3	Estudio del efecto inmunomodulador de las CMM-CU sobre linfocitos activados obtenidos de sangre periférica en un ensayo <i>ex vivo</i> .....	112
6.4	Co-cultivo de las CMM-CU y las CT obtenidas de muestras de pacientes con CRCC. Ensayo de proliferación celular. ....	114
7	Resultados. Tercera parte .....	116
7.1	Expresión del HLA-G en las líneas celulares JEG-3 y RCC7/HLA-G1	116
7.2	Transfección del sistema CRISPR/Cas9 en la línea celular RCC7/HLA- G1	117
7.3	Transfección del sistema CRISPR/Cas9 en la línea celular JEG-3 .....	120
7.4	Transfección del sistema CRISPR/Cas9 con los 4 ARN guías simultáneamente en la línea celular JEG-3. ....	125
7.5	Ensayo de degranulación de las células NK en co-cultivo con células JEG-3 sin editar (HLA-G +) y con las JEG-3 editadas (HLA-G -) .....	127
8	Discusión.....	130
8.1	Primera parte.....	131
8.2	Segunda parte.....	143
8.3	Tercera parte.....	147
9	Conclusiones.....	152
10	Referencias bibliográficas.....	154

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AAANE	Aminoácidos no esenciales
ADN <sub>c</sub>	ADN copia
ADN <sub>g</sub>	ADN genómico
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Células presentadoras de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARN <sub>g</sub>	ARN guía
ARN <sub>m</sub>	ARN mensajero
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineación local básica
Cas9	CRISPR associated nuclease 9
CD	Cúmulo de diferenciación
CD	Células dendríticas
CF	Citometría de flujo
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
CK	Citoqueratina
CM	Células madre
CMM	Células madre mesenquimales
CMM-CU	Células madre mesenquimales de cordón umbilical
COBIMED	Comité de Bioética y Ética de la Investigación de la FCM de la UNLP
CR	Carcinoma Renal
CRCC	Carcinoma renal de células claras
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats
CT	Células tumorales
CT	Dominio citoplasmático
CTLA-4	Antígeno de linfocitos T citotóxicos-4
DEIS	Dirección de Estadísticas e Información en Salud
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxi-ribonucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DSB	Ruptura de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EP-CAM	Molécula de adhesión de células epiteliales
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU.
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína Fluorescente Verde

HDR	Reparación dirigida por homología
H-E	Hematoxilina-eosina
HFF	Línea celular de fibroblastos humanos
HIF	Factor inducible por hipoxia
HLA-G	Antígeno Leucocitario Humano G
IARC	Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer
IC	Immunecheckpoint
ICE	Synthego's Inference of CRISPR edits
IFN- $\gamma$	Interferón- gamma
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
ILT2	Receptor de tipo inmunoglobulina transcripto 2
ILT4	Receptor de tipo inmunoglobulina transcripto 4
IMGT/HLA	Base de Datos Internacional de Inmunogenética
InDels	Inserciones/Deleciones
ISUP	Sociedad Internacional de Patología Urológica
JEG-3	Línea celular de coriocarcinoma
KIR2DL4	Receptor de tipo inmunoglobulina asesino 2DL4
LAG-3	Gen activador de linfocitos 3
LAMP-1	Proteína de membrana asociada al lisosoma-1
LILRB	Receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos de la subfamilia B
LP	Lisado de plaquetas
MDSC	Células supresoras de estirpe mieloide
MDV	Microdensidad vascular
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MUC	Mucinas
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
NK	Células naturales asesinas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAGE	Electroforesis con gel de poliacrilamida
PAM	Protospacer adjacent motif
pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCI	Punto de control inmunológico
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1
PD-L1	Ligando de la proteína de muerte celular programada 1
PET	Tomografía por emisión de positrones

PM	Peso molecular
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
qPCR	Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa
RCC7	Línea celular de carcinoma renal
RNAseq	RNA-sequencing
RNM	Resonancia nuclear magnética
RPL7	Proteína ribosómica 60S L7
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Retrotranscripción
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results Program
SEM	Error estándar de la media
SFB	Suero Fetal Bovino
TAC	Tomografía axial computarizada
TBS	Tampón salino Tris
TCGA	The Cancer Genome Atlas
Teff	T efectores
TEM	Tasa estandarizada por población mundial
TIGIT	Inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM
TIM-3	Inmunoglobulina de células T con dominio de mucina-3
TM	Dominio transmembrana
TNM	Tumor-Nódulo-Metástasis
Treg	T reguladoras
UTR	Región no traducida
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor del VEGF
VHL	Von Hippel-Lindau
VISTA	Supresor de Ig de dominio V de la activación de células T
WB	Western Blotting
$\alpha$ MEM	Medio Esencial Mínimo alfa
$\beta$ m	Beta-2-microglobulina

# 1 Introducción

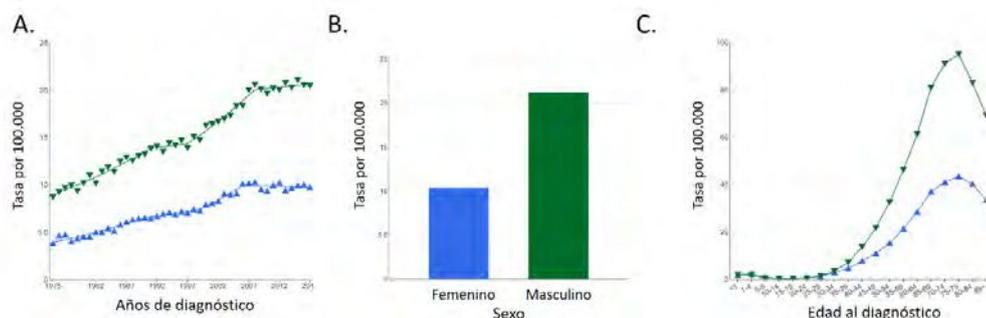
El cáncer se origina cuando cualquier célula del organismo comienza a crecer en forma descontrolada evadiendo la vigilancia del sistema inmune y pudiendo adquirir la capacidad de propagarse a distintos tejidos y órganos. Particularmente abordaremos el carcinoma renal (CR), también conocido como adenocarcinoma de células renales. El CR supone el 80-85% de las neoplasias malignas del riñón en adultos.

Tiene su origen en el epitelio de los túbulos renales, tanto de la corteza o de la médula. Esto determina el subtipo histológico, lo que implica diferentes pronósticos e incluso distintas respuestas al tratamiento médico.

El CR constituye el 3% de todas las neoplasias malignas del adulto y se ha constatado un aumento progresivo en su incidencia en los últimos años, probablemente como resultado del mayor número de pruebas diagnósticas realizadas en el contexto del estudio de otras enfermedades o dolencias, como son la tomografía axial computada y la ecografía abdominal, hallándose de manera incidental la presencia de masas ocupantes renales anormales (Figura 1.1A).

Según la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (siglas en inglés IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la Argentina el CR ocupa el 5<sup>to</sup> lugar de incidencia, representando el 3,9% de los nuevos casos de cáncer, y constituye la 8<sup>va</sup> causa de mortalidad, considerando hombres y mujeres. En el año 2020, la incidencia en hombres fue de 15,3 casos cada 100.000 habitantes, y en mujeres fue de 7,4 cada 100.000 habitantes (tasa estandarizada por edad según población mundial estándar, TEM). La Dirección de Estadísticas e Información en Salud del Ministerio de Salud de la Nación (DEIS) informó que en el año 2018, el

cáncer de riñón y pelvis renal provocó el 3,3% de las muertes por cáncer en ambos sexos. Como podemos observar de los datos estadísticos mencionados, la incidencia del CR es mayor en hombres que en mujeres (con una relación aproximada de 2:1) (Figura 1.1B). El diagnóstico ocurre frecuentemente entre los 55 y 74 años (Figura 1.1C), con un promedio de edad diagnóstica de 64 años, según el registro SEER (del inglés: *Surveillance, Epidemiology and End Results Program*) del Instituto Nacional del Cáncer (siglás en inglés NCI).



**Figura 1.1:** Gráficos del SEER del NCI (<https://seer.cancer.gov/>). **A.** Tendencias a largo plazo en las tasas de incidencia ajustadas por edad SEER, 1975-2017. **B.** Tasas de incidencia según el sexo, periodo 2013-2017 (todas las razas, todas las edades, todas las etapas). **C.** Tasas de incidencia por edad en el momento del diagnóstico, periodo 2013-2017. En celeste se muestran los datos del sexo femenino, y en verde del masculino.

## 1.1 Clasificación del CR

La clasificación de las neoplasias renales ha evolucionado en las últimas décadas. La más reciente surgió a partir del Consenso de Vancouver de la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP), donde se realizó una revisión de la clasificación anterior de la OMS de 2004 [1] teniendo en consideración los nuevos conocimientos respecto a la patología, epidemiología y genética, proporcionando las bases para la nueva clasificación de tumores renales 2016 de la OMS [2]. Tabla 1.1.

**Tabla 1.1:** Clasificación histológica de tumores renales (OMS), Traducida al español.  
Título original: “*WHO classification of tumours of the kidney*” [2]

Tumores de células renales	Tumores mesenquimales en el adulto
Carcinoma renal de células claras	Leiomioma
Multilocular quístico de bajo potencial maligno	Angiosarcoma
Carcinoma papilar	Rabdomiosarcoma
Carcinoma renal asociado a leiomiomatosis hereditaria	Osteosarcoma
Carcinoma de células cromóforas	Sarcoma sinovial
Carcinoma de túbulos colectores	Sarcoma de Ewing
Carcinoma medular	Angiomiolipoma
Carcinoma por deficiencia de succinato deshidrogenasa	Angiomiolipoma epitelioides
Carcinoma tubular mucinoso	Leiomioma
Carcinoma tubuloquístico	Hemangioma
Enfermedad quística adquirida asociada a carcinoma renal	Linfangioma
Carcinoma papilar de células claras	Hemangioblastoma
Carcinoma de células renales sin clasificar	Tumor de células yuxtglomerulares
Adenoma papilar	Tumor del intersticio renomedular
Oncocitoma	Schwannoma
Tumores metanéfricos	Tumores mixtos epitelio-estromales familiares
Adenoma metanéfrico	Nefroma quístico
Fibroadenoma metanéfrico	Tumor mixto epitelial y estromal
Tumor estromal metanéfrico	
Nefroblásticos y quísticos en niños	Tumores neuroendócrinos
Restos nefrogénicos	Tumor neuroendócrino bien diferenciado
Nefroblastoma	Carcinoma neuroendócrino de células grandes
Nefroblastoma quístico parcialmente diferenciado	Carcinoma neuroendócrino de células pequeñas
Nefroma quístico pediátrico	Feocromocitoma
Tumores mesenquimales en niños	Otros tumores
Sarcoma de células claras	Neoplasias renales hematopoyéticas
Tumor rabdoide	Tumor de células germinales
Nefroma mesoblástico congénito	
Tumor renal osificante de la infancia	Tumores metastásicos

Si bien en la Tabla 1.1 se mencionan todos los tipos de tumores de células renales, debemos destacar al carcinoma renal de células claras (CRCC) por ser el más frecuente de ellos. El mismo constituye aproximadamente el 70-80% de los casos de CR, siendo menos comunes los tipos histológicos papilar, cromóforo, tumores del ducto de Bellini y sarcomatoides [3].

El CRCC es una neoplasia con un gran potencial de crecimiento e invasividad, inclusive antes de manifestarse clínicamente. Además, no responde a los tratamientos oncológicos habituales, como la quimio y la radioterapia, por lo que es de gran importancia conocer su biología tumoral.

## 1.2 Histopatología del CRCC

A nivel macroscópico, se presenta como lesiones solitarias y unilaterales que ocupan la corteza renal, pero al crecer terminan reemplazando al menos parcialmente la médula y se extienden al tejido perirrenal. Pueden aparecer lesiones bilaterales sincrónicas o asincrónicas en el 2% de los casos, generalmente asociadas a la enfermedad de Von Hippel-Lindau (VHL) [4]. Cuando se observa un corte en fresco del tumor, éste presenta una coloración amarillenta o parduzca y un aspecto blando multilobulado. En los tumores de gran tamaño con frecuencia se encuentran cambios quísticos que pueden sufrir calcificaciones, necrosis y hemorragias intratumorales. Pueden hallarse también áreas fibrosas y de aspecto hialino. Estos tumores están bien delimitados del tejido renal adyacente por una cápsula fibrosa que puede ser o no continua. Las áreas blanquecinas suelen estar relacionadas con la transformación sarcomatoide que a veces ocurre en este tumor, lo cual le confiere un aspecto más sólido. Ocasionalmente, el CRCC está constituido por quistes hasta

el punto de ser confundido con lesiones no tumorales. Estos casos se corresponden con la variante multilocular, un subtipo de carcinoma de células claras raro y de bajo grado [5].

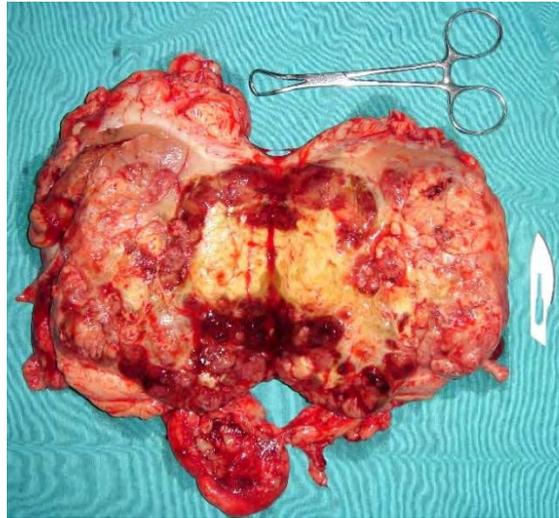
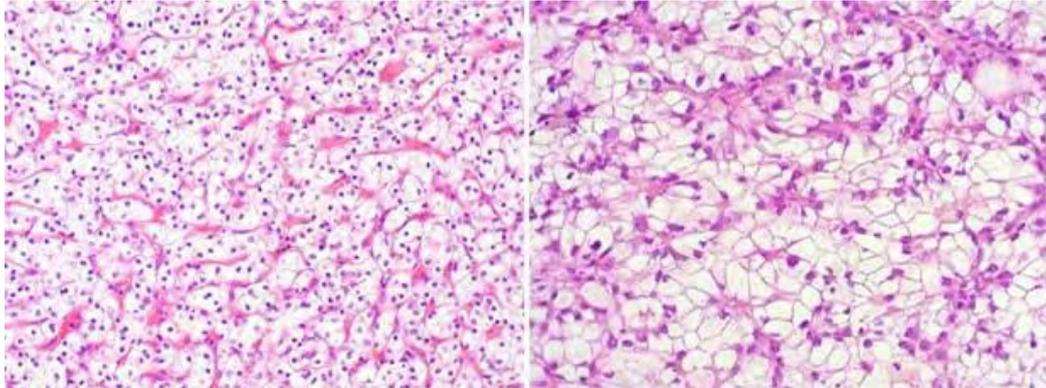


Figura 1.2: Aspecto macroscópico del CRCC. Hospital “Evita Pueblo” de Berazategui.

A nivel microscópico, el CRCC muestra una histología altamente característica. Las células poseen un citoplasma ópticamente claro o vacío, que casi no se tiñe con la técnica histológica de rutina de hematoxilina-eosina (H-E), y una membrana citoplasmática muy bien definida. Este aspecto claro se debe a la presencia de glucógeno y lípidos en el interior celular. En ocasiones las células muestran citoplasmas débilmente eosinófilos en torno al núcleo, circunstancia observada en casos de alto grado nuclear.

Las células tumorales se disponen formando nidos, estructuras alveolares, cordones y papilas, o tapizando quistes de tamaño variable. El estroma contiene una red capilar muy prominente y típica, siendo un tumor altamente vascularizado [6]. Las zonas centrales del tumor pueden mostrar áreas cicatriciales, esclerosis o edema. En los tumores grandes es frecuente encontrar hemorragia y necrosis, y

suelen verse acúmulos de hematíes en las luces de las estructuras alveolares. El núcleo puede mostrar características variables en cuanto al tamaño y forma, y dependiendo del tumor puede presentar nucléolos. Estos parámetros sirven para determinar el grado nuclear de Furhman, como se explicará más adelante.



**Figura 1.3:** Aspecto microscópico convencional del CRCC, (H-E, a la izquierda 200X, a la derecha 400X). Recuperada de <https://www.webpathology.com>.

Mediante inmunohistoquímica, se realizan ciertas marcaciones para corroborar la identidad del tumor. Específicamente, los CRCC coexpresan citoqueratinas de bajo peso molecular (CKs 8, 18, 19) y vimentina. Esta doble tinción característica suele ser un dato importante a la hora de evaluar el origen tumoral en una metástasis a distancia de un tumor primario desconocido. Los CRCC también expresan antígeno de membrana epitelial (EMA), antígeno del CRCC, CD10, MUC1 y MUC3, y suelen ser negativos para inhibina, A103 y CK7 [7].

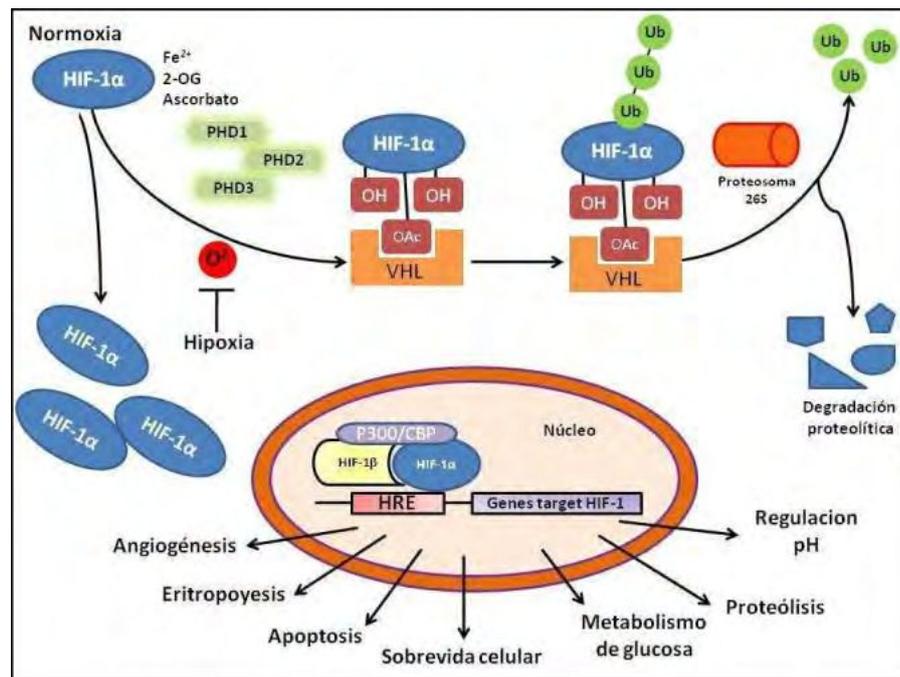
### 1.3 Citogenética del CRCC

Más del 90% de los CRCC muestran la típica alteración citogenética en el brazo corto del cromosoma 3, pudiendo encontrarse desde la pérdida completa del brazo

hasta translocaciones o deleciones. De hecho, entre el 30% y el 56% de los CRCC esporádicos tienen mutaciones en el gen *vhl* y hasta el 19% tienen silenciamiento del mismo.

El gen *vhl* fue mapeado en el brazo corto del cromosoma 3 [8], y se demostró que codifica para una proteína (pVHL) que forma un complejo con actividad de ubiquitin- ligasa E3. Tras su formación, este complejo reconoce específicamente las subunidades  $\alpha$  de dos factores de transcripción, los factores inducibles por hipoxia (HIF) 1A y 2A, y los dirige para su degradación a lo largo de la ruta ubiquitina-proteasoma [9]. En condiciones de normoxia, la hidroxilación dependiente de oxígeno de HIF en residuos de prolina específicos desencadena la unión de pVHL, la ubiquitinación y la posterior degradación proteosomal de HIF 1A y 2A.

Por el contrario, en condiciones de hipoxia, se inhibe la hidroxilación de los HIF, estos no pueden unir la pVHL y las dos proteínas forman un complejo estable con la subunidad HIF-1 $\beta$  expresada constitutivamente; este complejo se traslada posteriormente al núcleo celular, se une al ADN en los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE), y de este modo se activa la expresión de una gran variedad de genes. Las mutaciones o el silenciamiento del gen *vhl* hacen que la proteína no pueda unirse a los HIF, simulando una situación de hipoxia y desencadenando la activación transcripcional de una amplia serie de factores reguladores de la angiogénesis, del crecimiento y del ciclo celular, los cuales llevan al desarrollo de los tumores. Uno de los genes activados por HIF mejor caracterizados es el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A), que codifica la proteína de unión a heparina. VEGF-A induce de forma robusta la proliferación y migración de las células endoteliales vasculares y es esencial para la angiogénesis fisiológica y patológica [10].



**Figura 1.4:** Mecanismo de acción de la proteína pVHL. La ausencia de esta proteína simula un estado de hipoxia y se activan las cascadas transcripcionales asociadas al HIF. Imagen traducida de [11].

## 1.4 Signos y síntomas

Muchos tumores renales permanecen asintomáticos hasta bien avanzado el curso natural de la enfermedad. En la actualidad, más del 50% de los CRCC se detectan de manera incidental al utilizar técnicas de diagnóstico por imagen para evaluar enfermedades intercurrentes. Muy pocos pacientes, entre un 6-10%, suelen presentar uno o varios síntomas de la tríada clásica: dolor en el flanco, hematuria macroscópica y masa abdominal palpable. El 78% de los tumores <3cm son descubiertos incidentalmente, mientras que los >5cm son diagnosticados debido a algún tipo de síntoma [12].

Alrededor del 30% de los pacientes con CRCC sintomático, poseen síndromes paraneoplásicos que también son estigmas clínicos que deben hacer sospechar la

presencia de un cáncer de células renales. Los síntomas más comunes son hipertensión, falta de apetito, pérdida de peso, pirexia, sudoración nocturna, neuromiopatía, amiloidosis, elevación de la velocidad de sedimentación globular, anemia, disfunción hepática, hipercalcemia y/o varicocele izquierdo de aparición súbita [13]. Una minoría de los pacientes debuta con síntomas directamente causados por la enfermedad diseminada, como dolor óseo, tos persistente o deterioro del estado general, entre otros.

## 1.5 Diagnóstico

Si el paciente presenta alguno de los síntomas concordantes con una afección renal, se debe realizar un examen físico, acompañado de análisis clínicos de sangre y orina, y alguno de los estudios por imágenes que se mencionan a continuación. Los casos sintomáticos suelen estar asociados a estadios avanzados de la enfermedad y son de mal pronóstico.

Como mencionamos anteriormente, en la mayoría de los casos de tumores renales, los pacientes son asintomáticos y se los diagnostica de manera incidental por una ecografía abdominal, una tomografía axial computarizada (TAC) o una resonancia nuclear magnética (RNM) realizadas por otros motivos.

El estudio por imágenes de elección para el diagnóstico es la TAC de alta resolución con medio de contraste oral y endovenoso, ya que permite evaluar el estadio tumoral, el tratamiento adecuado y la supervivencia esperada para el paciente. Mediante este estudio se evalúa el tumor primario, su extensión extrarrenal y proporciona información sobre la afectación venosa, presencia de adenomegalias locorregionales, estado de las glándulas adrenales, del hígado y el

funcionamiento y morfología del riñón contralateral. La imagen por RNM es recomendada en casos de diseminación localizada ya que ofrece gran información morfológica y funcional para caracterizar y estadificar el tumor. Además, puede resultar útil en los casos donde el paciente tiene alergia al contraste yodado intravenoso o en casos de insuficiencia renal donde está contraindicada la TAC.



**Figura 1.5:** TAC de abdomen que muestra un tumor renal izquierdo. Paciente del Hospital “Evita Pueblo” de Berazategui.

Si bien, en la mayoría de los casos se llega a un diagnóstico a través del estudio por imágenes, en algunos pacientes con masas renales dudosas y de aspecto mal definido puede resultar necesaria la obtención de una biopsia para confirmar el diagnóstico.

En pacientes con estadios avanzados, se deben realizar estudios adicionales como la TAC de tórax y cerebro para evaluar posibles metástasis a distancia, o una centellografía ósea debido a la posibilidad de metástasis esqueléticas. Un estudio más complejo y de mayor sensibilidad diagnóstica es la tomografía por emisión de positrones (PET) que permite visibilizar los sitios más comunes de enfermedad

metastásica. En orden de frecuencia, estos sitios incluyen los pulmones, los huesos, los ganglios linfáticos, el hígado, las glándulas adrenales y el cerebro [14]. Mediante la identificación de cambios a nivel celular, la PET puede detectar manifestaciones tempranas de enfermedades antes que otros exámenes por imágenes [15].

## 1.6 Estadificación, invasividad y metástasis

El sistema de estadificación que se emplea con más frecuencia para el cáncer de riñón es el sistema tumor- nódulo- metástasis (TNM) que tiene en cuenta el tamaño y la extensión del tumor, la propagación a los ganglios linfáticos adyacentes (N: nódulo), y por último la propagación a sitios distantes (M: metástasis). Dicha clasificación ha sufrido múltiples actualizaciones, siendo una de las últimas las del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) en su séptima y octava edición [16], [17]. Además, la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) ha añadido recomendaciones adicionales y ha propuesto agregar nuevas neoplasias epiteliales a la Clasificación de Tumores Renales de la OMS (gradación OMS/ISUP) [1].

Los principales cambios, con respecto a la versión del año 2002, son la subdivisión del estadio T2 en T2a (tumores entre 7 cm y 10 cm de tamaño) y T2b (tumores >10 cm), ambos confinados al riñón. La afectación de la vena renal se reclasifica como T3a. En la 8<sup>va</sup> edición se añade la afectación pelvicaliceal y elimina el requisito de identificación macroscópica de la descripción de la afectación de la vena renal y reemplaza la frase “el músculo que contiene” con el término general “ramas segmentarias de la vena renal” [18]. Una vez que se han determinado las categorías T, N y M de un paciente, esta información se combina en un proceso llamado agrupación por etapas para asignar una etapa general.

**Tabla 1.2:** Sistema de estadificación TNM para determinar el estadio del carcinoma renal. AJCC Cancer Staging Manual, 8th edition [16].

<b>T- Tumor primario</b>			
TX No se puede evaluar el tumor primario			
T0 Ausencia de datos de tumor primario			
T1 Tumor $\leq 7$ cm en su dimensión máxima, limitado al riñón			
T1a Tumor $\leq 4$ cm en su dimensión máxima, limitado al riñón			
T1b Tumor $> 4$ cm pero $\leq 7$ cm en su dimensión máxima			
T2 Tumor $> 7$ cm en su dimensión máxima, limitado al riñón			
T2a Tumor $> 7$ cm pero $\leq 10$ cm en su dimensión máxima			
T2b Tumor $> 10$ cm limitado al riñón			
T3 El tumor se extiende a las venas principales o los tejidos perinéfricos, pero no a la glándula suprarrenal ipsilateral ni sobrepasa la fascia de Gerota.			
T3a El tumor se extiende a la vena renal o sus ramas segmentarias, o invade el sistema pelvicaliceal, o invade la grasa del seno perirrenal y / o renal, pero no sobrepasa la fascia de Gerota.			
T3b El tumor se extiende enormemente hacia la vena cava debajo del diafragma.			
T3c El tumor se extiende enormemente hacia la vena cava por encima del diafragma o invade la pared de la vena cava.			
T4 El tumor invade sobrepasando la fascia de Gerota (incluida la extensión contigua a la glándula suprarrenal ipsilateral)			
<b>N- Ganglios linfáticos regionales</b>			
NX No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales			
N0 Ausencia de metástasis ganglionares regionales			
N1 Metástasis en un solo ganglio linfático regional			
N2 Metástasis en más de un ganglio linfático regional			
<b>M- Metástasis a distancia</b>			
M0 Ausencia de metástasis a distancia			
M1 Metástasis a distancia			
<b>Agrupación en estadios TNM</b>			
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Estadio IV	T4	Cualquier N	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1

## 1.7 Grado nuclear de Fuhrman

Además de la estadificación TNM, que tiene en cuenta aspectos más anatómicos, existe un sistema de gradación histológica, denominado grado nuclear de Fuhrman, el cual está ampliamente extendido entre los patólogos de todo el mundo para graduar los CR. Los criterios básicos para la clasificación en los 4 grados de Fuhrman son el tamaño nuclear, su morfología y la evidencia del nucléolo a diferentes aumentos (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3:** Grado nuclear de Fuhrman

	Tamaño nuclear	Forma nuclear	Nuécleolos
Grado 1	10 $\mu\text{m}$	Redondos, uniformes	Ausentes
Grado 2	15 $\mu\text{m}$	Irregulares	Pequeños Visibles a 400X
Grado 3	20 $\mu\text{m}$	Irregulares	Prominentes Visibles a 100X
Grado 4	20 o + $\mu\text{m}$	Pleomórficos o multilobulados, con o sin células fusiformes (sarcomatoides)	Prominentes Visibles a 100X

A pesar de tener variaciones intra- e inter-observador, el grado de Fuhrman ha demostrado una buena correlación con el pronóstico del paciente [19], [20]. En los últimos años, se han realizado modificaciones a esta clasificación para hacerla más sencilla sin perder su valor pronóstico. Las nuevas clasificaciones son: la de “Ficarra” que agrupa los grados I y II en una sola categoría manteniendo independientes los grados III y IV, y la de “Zisman” que reagrupa en dos categorías, de bajo grado (I + II) y de alto grado (III + IV). La categorización en dos o tres grupos del grado

de Fuhrman mantiene la capacidad predictiva sobre la supervivencia libre de progresión y cáncer-específica [21].

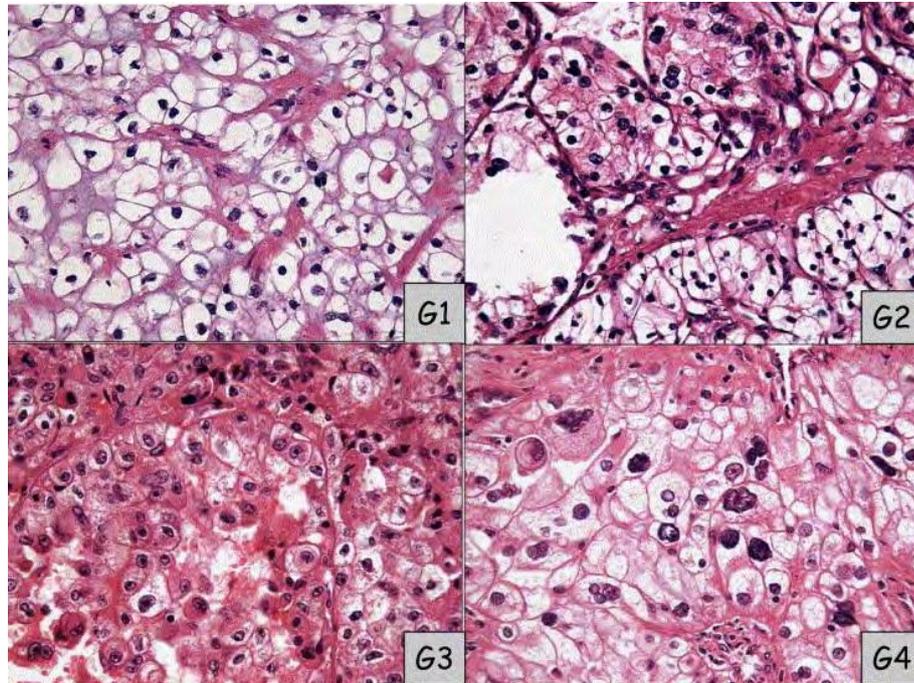


Figura 1.6: Imagen histológica de los grados de Fuhrman. Recuperada de [19].

## 1.8 Tratamientos para el CRCC

### 1.8.1 Quirúrgico

La nefrectomía en sus diferentes variantes, constituye hoy en día la base fundamental para el tratamiento del CRCC primario. El objetivo de esta intervención consiste en la escisión tumoral completa con un adecuado margen de seguridad oncológica y mínima manipulación del tejido escindido para evitar la diseminación tumoral.

Mediante el estudio previo del paciente y su correcta estadificación TNM, se decide el tipo de operación a realizar, si es abierta o por laparoscópica, y si es posible

realizar una nefrectomía conservadora (resección parcial de la zona renal afectada, conservando la mayor cantidad de nefronas sanas) o una nefrectomía radical (se extirpa todo el riñón, pelvis, uréter, inclusive hasta la cápsula de Gerota).

La Asociación Europea de Urología recomienda la nefrectomía parcial o conservadora para los tumores T1a-b localizados, dejando solo la nefrectomía radical para casos donde su ubicación dentro del parénquima renal no permita realizar una nefrectomía conservadora. Según los resultados oncológicos y funcionales, la nefrectomía parcial conservó mejor la función renal general que la radical, lo que redujo el riesgo de desarrollo de trastornos metabólicos o cardiovasculares [22]. Para los tumores T2, que aún están limitados sólo al riñón, se recomienda la nefrectomía radical abierta o laparoscópica. En el caso de los tumores T3, la cirugía radical es el tratamiento de elección pero además se debe evaluar la afección de las venas cercanas, y extirpar la porción afectada. El tratamiento para el cáncer de riñón en etapa 4 depende de la extensión del cáncer y el estado general de la salud de la persona. En los casos donde el tumor primario es extirpable, la nefrectomía radical abierta o laparoscópica es el tratamiento de elección.

La linfadenectomía se realizaba en pacientes con ganglios positivos detectados en la TAC pre-operatoria o con metástasis a distancia [13]. Sin embargo, un análisis reciente de una gran cohorte internacional indicó que la disección de los ganglios linfáticos no se asocia con mejores resultados oncológicos entre los pacientes de alto riesgo que se someten a nefrectomía radical por carcinoma de células renales M0, incluyendo también a pacientes con linfadenopatía radiográfica pre-operatoria (N1) [23].

Para los cánceres que no se pueden extirpar quirúrgicamente (debido a la extensión del tumor o la existencia de comorbilidades en el paciente), la opción

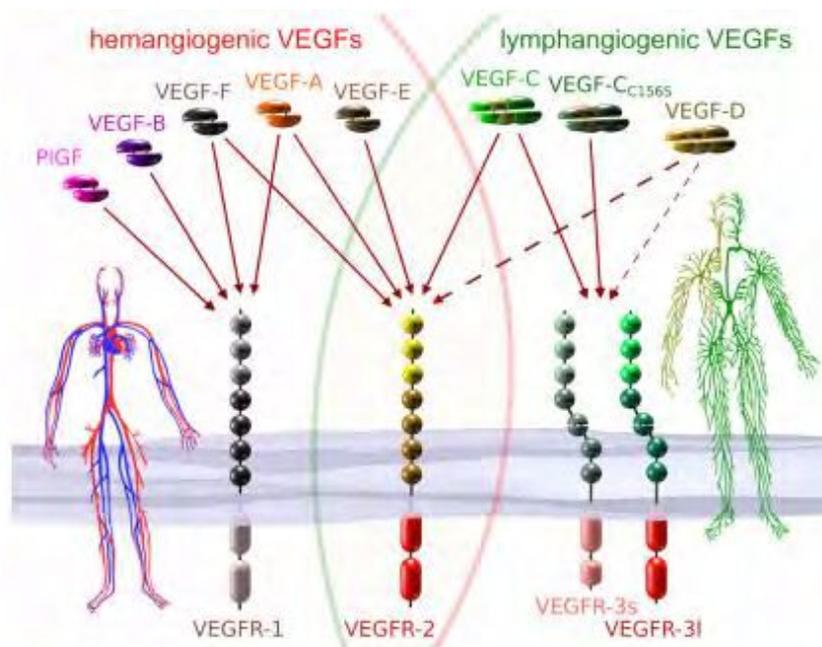
terapéutica es la terapia sistémica, decidiendo según cada caso la mejor opción para abordar la enfermedad. En algunos pacientes, los tratamientos paliativos como la embolización para el tumor primario o la radioterapia para las metástasis óseas o cerebrales podrían ser la mejor opción.

### 1.8.2 Terapia antiangiogénica

El cáncer renal no es sensible a las drogas citotóxicas habituales ni tampoco a la radioterapia, es por ello que en los últimos años se han estado utilizando nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de pacientes con CRCC en estadios avanzados y/o metastásicos, donde la cirugía no es suficiente.

Desde décadas pasadas, se sabe que los tumores crecen hasta el punto donde la difusión simple no puede nutrirlo, y para poder expandirse requieren de la formación de nuevos capilares sanguíneos [24]. El CRCC es un tumor muy vascularizado y por lo tanto es un modelo adecuado para el estudio de la angiogénesis. De hecho, mediante estudios angiográficos o de tomografías con contraste endo-venoso, se puede evaluar el patrón de neovascularización que es bien característico y diagnóstico de esta neoplasia. El gran desarrollo vascular observado se puede explicar por lo que ocurre a nivel molecular. Como mencionamos anteriormente, en la mayoría de los CRCC se observa el silenciamiento del gen *vhl*, lo cual conduce a la activación de la vía de respuesta a la hipoxia (HIF) e induce la transcripción de varios genes. Uno de los genes activados más importantes es el VEGF-A, una glicoproteína pro-angiogénica potente, perteneciente a la superfamilia del factor de crecimiento derivado de plaquetas, que induce de manera robusta la proliferación y migración de células endoteliales vasculares y las protege contra la apoptosis, un

acontecimiento esencial para la angiogénesis fisiológica y patológica (formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes) [25]. El VEGF-A ejerce su efecto biológico a través de la interacción con los receptores de tirosina quinasa transmembrana presentes en la superficie celular (VEGFR). El VEGFR-2 parece ser el principal receptor responsable de mediar los efectos pro-angiogénicos del VEGF-A [26].



**Figura 1.7:** Miembros de la superfamilia del VEGF y sus respectivos receptores, VEGFR. Recuperado de [35].

Debido a la relevancia de la angiogénesis en la progresión de la patología tumoral, su inhibición resulta clave para el tratamiento del CRCC. Las estrategias terapéuticas utilizadas hasta el momento incluyen la inhibición del ligando, VEGF-A, mediante anticuerpos monoclonales, o la inhibición del receptor, VEGFR, por inhibidores de tirosin-quinasa. Actualmente, la Administración de Drogas y

Alimentos de los E.E.U.U. (FDA) aprobó los siguientes cinco inhibidores de la vía del VEGF en el CRCC metastásico: bevacizumab, sunitinib, sorafenib, pazopanib y axitinib [27]. El más ampliamente utilizado es el bevacizumab, que es un anticuerpo monoclonal que se une al VEGF-A circulante, y su uso está indicado para el tratamiento de primera línea de casos avanzados y/o metastásicos [28], [29].

Desafortunadamente, la experiencia clínica no ha sido tan optimista, ya que un gran porcentaje de pacientes no se han beneficiado con la terapia antiangiogénica. Esto ha sido el resultado de una subestimación de la complejidad del proceso de neovascularización, incluidos los distintos tipos de células y vías involucradas, la respuesta adaptativa de los tumores establecidos una vez que se inicia la terapia, y la actividad limitada, poca especificidad, y gran toxicidad de los inhibidores disponibles hasta el momento [30]–[32].

Sin embargo, parece ser posible seleccionar pacientes que tengan más probabilidades de responder al tratamiento. Para ello se debe tener una comprensión más precisa de la angiogénesis tumoral específica de cada individuo, la cual puede ser estudiada de diversas formas, siendo la evaluación histológica la más utilizada. La misma consiste en la medición de la microdensidad vascular (MDV) a partir de la marcación inmunohistoquímica de las células endoteliales con el antígeno CD34 y la contabilización de los vasos sanguíneos presentes en las áreas de mayor MDV (áreas conocidas como “*hot spot*”) [33].

En los últimos años, se ha avanzado mucho en el estudio de los otros factores pertenecientes a la familia del VEGF. Entre ellos, el VEGF-C, principal inductor de la linfangiogénesis, el cual media la proliferación, migración, ensamblaje y mantenimiento de las células endoteliales linfáticas a través de su interacción con el receptor VEGFR-3 [34], [35]. Muchos tumores sólidos pueden sintetizar VEGF-C,

y su intensidad de expresión está relacionada con el grado de metástasis en los ganglios linfáticos en los tumores. Es por ello que su estudio gana una gran atención en la neovascularización tumoral, la linfangiogénesis y la metástasis tumoral [36]–[38].

### 1.8.3 Inmunoterapia

En la actualidad, la inmunoterapia contra el CRCC está mejorando los resultados de los tratamientos oncológicos para estadios avanzados y/o metastásicos.

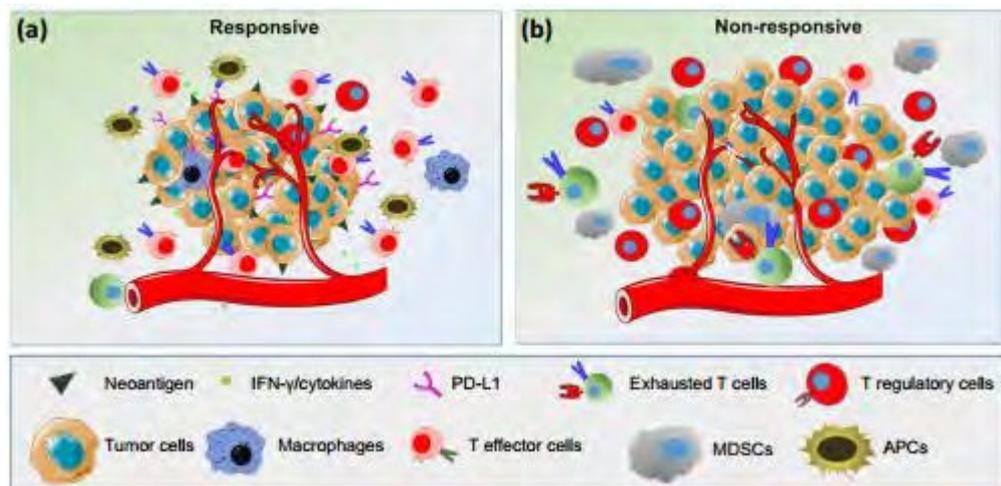
Una de las funciones del sistema inmunológico, a través de las respuestas innatas y adaptativas, es distinguir las células normales del organismo de aquellas células que han sufrido modificaciones, como es el caso de las células tumorales (CT). Para ello, las células inmunes efectoras como los linfocitos y las células asesinas naturales (NK, del inglés: *natural killer*) tienen la capacidad de detectar células anómalas y eliminarlas.

Durante el crecimiento inicial del tumor, el sistema inmunológico a menudo es capaz de lograr un equilibrio entre el crecimiento y la destrucción de las CT. En algún momento durante la evolución tumoral, las CT adquieren la capacidad de evadir el sistema inmune y proliferar [39]. La estrategia que utilizan las CT para generar una inmunosupresión local es expresar en su superficie moléculas reguladoras inmunitarias que disrumpen los puntos de control inmunológicos (PCI). Los PCI son conocidos como sinapsis inmunológicas formadas por células que expresan ligandos y otras que expresan su receptor complementario. La interacción ligando/receptor genera señales en las células efectoras para modular positiva (receptores estimulantes) o negativamente (receptores inhibidores) su respuesta contra las CT, previniendo o promoviendo la supervivencia de las mismas,



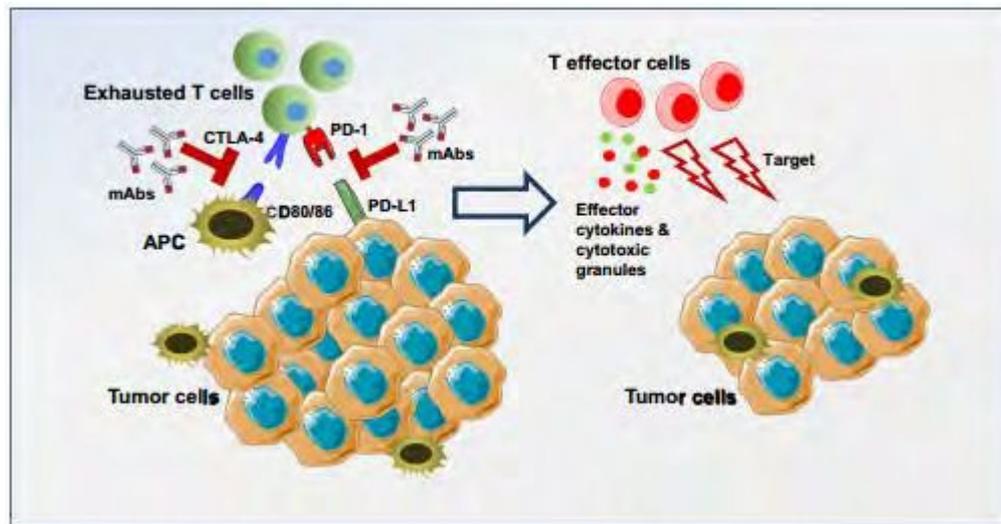
PD-1 a menudo se asocia con varios eventos adversos asociados a la activación exacerbada del sistema inmune, como toxicidad inmunitaria, resistencia al tratamiento y reacciones de tipo autoinmune, por lo que el beneficio clínico se limita a una fracción de pacientes [42]–[44]. Entonces, es fundamental la identificación de nuevos objetivos terapéuticos o terapias alternativas que mejoren la supervivencia del paciente y los resultados clínicos.

Se están haciendo grandes esfuerzos para encontrar nuevos PCI que funcionen como blancos terapéuticos, que sean más eficaces en el control del tumor y que no generen grandes efectos indeseados. Algunos de ellos son: LAG-3; TIM-3; TIGIT y VISTA que se expresan en la superficie de las células inmunes. Específicamente, en el CRCC se está estudiando la sinapsis HLA-G/ILTs. El HLA-G, antígeno leucocitario humano G, es una molécula que expresan las CT, y al interactuar con sus receptores ILT2 e ILT4 presentes en la superficie de células inmunes, desencadenan una inmunosupresión local.



**Figura 1.9:** La acción del sistema inmune depende del microambiente tumoral, pudiendo ser **a)** Responder: el sistema inmune controla el crecimiento del tumor. Los tumores tienen una alta carga de neoantígenos, altos niveles de linfocitos infiltrantes, especialmente células T efectoras y mayor secreción de IFN- $\gamma$  y otras citocinas; o **b)** No

respondedor: hay una inmunosupresión local, altos niveles de células Treg y células supresoras de estirpe mieloide (MDSC), niveles muy bajos de células NK y de linfocitos activados. El tumor logra sobrevivir y expandirse. Recuperado de [43].



**Figura 1.10:** Inmunoterapia: bloqueo de los PCI para la activación de células T. Los receptores, como PD-1 y CTLA-4, expresados en células T activadas al unirse a sus ligandos presentes en CT/APC conducen a su inhibición. Estas interacciones se pueden bloquear utilizando anticuerpos monoclonales, lo que lleva a la activación de las células T que se dirigen a las CT mediante la liberación de citocinas efectoras y gránulos citotóxicos. Recuperado de [43].

## 1.9 Pronóstico de los pacientes con CRCC

El pronóstico de la enfermedad depende en gran parte del estadio inicial del tumor al momento del diagnóstico, y se ve afectado por varios factores, como la etapa TNM, el grado nuclear, la invasión linfo-vascular, el componente sarcomatoide y la necrosis [45]. Los aspectos clínicos del paciente también influyen en el pronóstico [13]. Respecto a la supervivencia, un estudio realizado en España, comunica que es mayor al 72,5% a los 5 años pos-nefrectomía [46], mientras que en China otro estudio

publica una sobrevida cáncer específica mayor, próxima al 87% [47]. Estos porcentajes alentadores probablemente se deban a que, en los últimos años han aumentado los casos de diagnóstico incidental, sin que el paciente haya desarrollado síntomas, hallándose tumores pequeños y en los primeros estadios de la enfermedad asegurando un mejor pronóstico y mayor éxito en el tratamiento.

## 1.10 Antígeno leucocitario humano G (HLA-G)

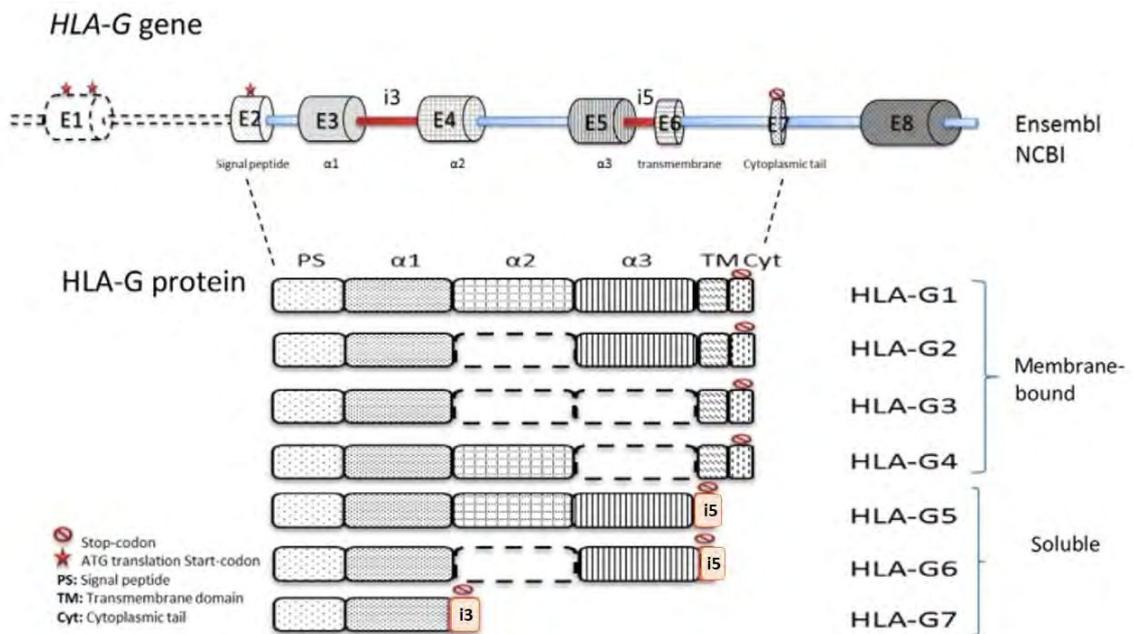
### 1.10.1 Aspectos generales del punto de control inmunológico HLA-G/ILT

El antígeno leucocitario humano G (HLA-G) es una proteína que en condiciones fisiológicas proporciona tolerancia inmunitaria al feto en mujeres embarazadas para evitar el rechazo [48]. Debido a su función de inhibición inmunitaria, también se estudia por su papel en el desarrollo de tumores, donde su expresión actúa como mecanismo de escape inmunológico. La interacción del HLA-G con sus principales receptores, ILT2 e ILT4, ocurre en una gama amplia de efectores inmunitarios debido a que estos se expresan en la superficie de células NK, T y B, así como en monocitos, células dendríticas (CD) y neutrófilos y, por lo tanto, pueden inhibir la respuesta inmune en cualquiera de sus fases. Esta sinapsis HLA-G/ILTs funciona como un punto de control inmunológico (PCI). Como se ha estado observando en los últimos años, el bloqueo de ciertos PCI, como las vías B7/CTLA4 y PD-1/PD-L1, ha estado dando resultados alentadores, aunque la tasa de resistencia al tratamiento suele ser alta y los efectos adversos aparecen con gran frecuencia. Es por ello que es de gran importancia encontrar nuevos blancos terapéuticos, como es el caso del antígeno HLA-G que tiene características muy prometedoras y su estudio será el que abordaremos a continuación.

### 1.10.2 Descripción del gen *hla-g*

El antígeno HLA-G es una molécula no clásica del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I (o clase Ib) que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 en la región 6p21.3.

Según la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), el gen *hla-g* posee 8 exones y la secuencia de codificación abarca 338 aminoácidos. El corte y empalme alternativo del transcrito primario del gen conduce a la producción de siete ARNm que dan origen a cuatro isoformas unidas a la membrana (HLA-G1, G2, G3, G4) y a tres isoformas solubles (HLA-G5, G6, G7), que se diferencian por el número de dominios globulares y la presencia o ausencia de secuencias intrónicas [49]. La molécula HLA-G1 y su homólogo soluble HLA-G5 tienen una estructura extracelular idéntica que es clásica de tipo HLA de clase I: una cadena pesada de tres dominios globulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ), unidos no covalentemente a beta-2-microglobulina ( $\beta 2m$ ). Las otras isoformas son más pequeñas ya que carecen de uno o dos dominios globulares y no se unen a  $\beta 2m$ . (Figura 1.11)



**Figura 1.11:** Esquema representativo del gen *hla-g* según la base de datos Ensembl. Se detalla la cantidad de exones, intrones, los sitios de inicio y fin de la traducción. Debajo encontramos esquematizadas a las 7 isoformas del HLA-G, las primeras 4 son de membrana y las 3 siguientes son solubles. Se detalla el nombre de los dominios que componen a cada isoforma. Recuperado de [49].

Recientemente, se describieron dos nuevas isoformas. Una de ellas pierde el exón 3, lo que da como resultado un transcripto que codifica para una proteína que carece del dominio  $\alpha 1$ . La otra variante encontrada se traduce a partir de un nuevo sitio de inicio de la traducción presente en el exón 1, que solo entra en marco de lectura si ocurre una deleción de 106 pb entre el exón 1 y el 2. Esto genera una nueva isoforma con 5 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal [50].

### 1.10.3 Expresión de la proteína HLA-G

El gen *hla-g* se expresa principalmente en la interface materno-fetal en las vellosidades trofoblásticas y en el amnios, donde juega un papel crítico en la protección del tejido fetal al rechazo inmunológico materno [48]. En los tejidos adultos sanos, su expresión se encuentra restringida a unos pocos sitios, como son el timo, la córnea, el epitelio bronquial y el páncreas [51]. Además, ciertos tipos de células suelen expresar esta proteína, como por ejemplo las células madre mesenquimales, algunos monocitos activados y los precursores eritroides y endoteliales [52].

En varias condiciones patológicas se ha observado una expresión anormal de la proteína, entre las que podemos mencionar infecciones virales, pérdidas recurrentes del embarazo, enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Principalmente, varios tipos de neoplasias expresan HLA-G como mecanismo de evasión del sistema inmune, debido a que generan un microambiente de inmunosupresión local. Es por ello que se lo considera como un factor de mal pronóstico en oncología [53].

### 1.10.4 Receptores de la proteína HLA-G

HLA-G media su función al unirse a receptores presentes en la superficie de las células inmunes. Los receptores conocidos son el miembro 1 de la subfamilia B del receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos (LILRB1) y el miembro 2 (LILRB2), también conocidos como ILT2 e ILT4, y el receptor de tipo inmunoglobulina asesino 2DL4 (KIR2DL4). El receptor ILT2 se une al dominio  $\alpha 3$  del HLA-G en asociación con el dominio  $\beta 2M$ . ILT2 es expresado por células linfoides (células B, T y NK) y

por células mieloides (monocitos, CD y células supresoras derivadas de mieloides o MDSC). El receptor ILT4 también reconoce el dominio  $\alpha 3$  pero cuando la proteína no está asociada a  $\beta 2M$ , y su expresión es específica de la estirpe mieloide (monocitos, neutrófilos, CD y MDSC) [54].

Además, el receptor KIR2DL4 es expresado por células NK y un subconjunto de células T. Éste receptor reconoce el dominio  $\alpha 1$  del HLA-G [55].

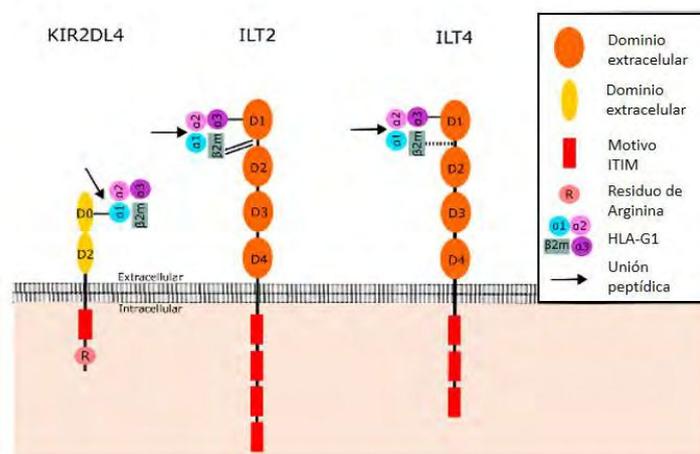


Figura 1.13: Estructura de los receptores del HLA-G. Imagen traducida de [56].

### 1.10.5 Funciones de la proteína HLA-G

La interacción HLA-G/ILT se ha asociado con la supresión de células inmunitarias, incluido el deterioro de su proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, citotoxicidad y quimiotaxis [57].

HLA-G tiene una amplia función inmunorreguladora que afecta tanto la inmunidad innata como la adaptativa, y ello lo logra a través de su interacción con los receptores inhibidores ILT2 e ILT4. Algunas funciones que podemos mencionar

son la inhibición de la función citolítica de las células NK, la función citolítica específica de antígeno de las células T citotóxicas CD8+, la respuesta aloproliferativa de las células T CD4+ y la maduración de las CD.

Por otra parte, las respuestas que se desencadenan de la unión del HLA-G con el receptor KIR2DL4 son controversiales, ya que se ha demostrado que induce la inhibición de las funciones inmunes de las células NK [58] pero también puede activarlas [59].

Además, se ha descrito un efecto indirecto por el cual el HLA-G logra una inmunosupresión, y es a través de la generación de células T reguladoras. Si bien no se conoce con detalle el mecanismo de acción, se ha encontrado una asociación con la presencia de ciertos factores solubles, como IL-10, y una baja expresión de CD4 o de CD8 en las células T que se transforman en T reguladoras [60]. Algunos experimentos han demostrado que la isoforma soluble HLA-G5 induce este perfil regulador sobre las células T [61].

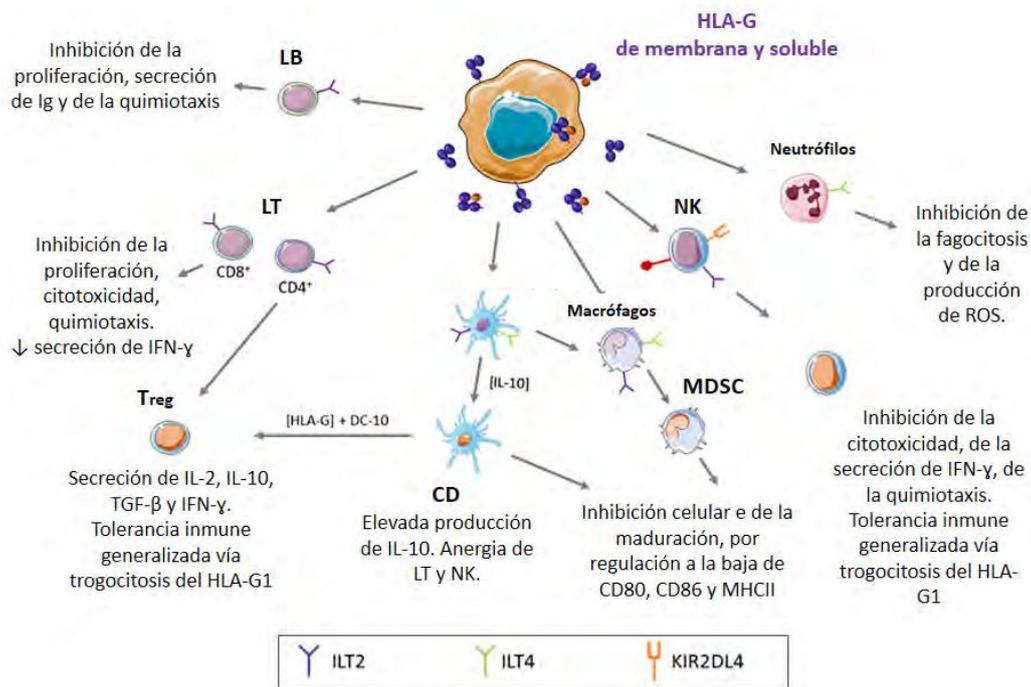


Figura 1.14: Funciones del HLA-G al interactuar con sus receptores sobre las células del sistema inmune. Imagen traducida y modificada de [62].

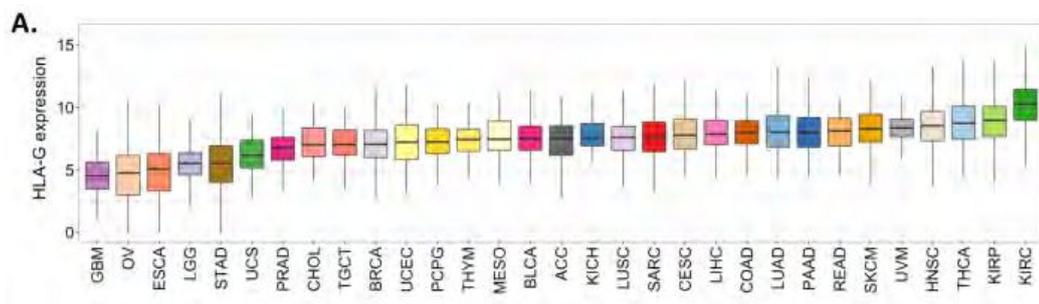
### 1.10.6 HLA-G en oncología

En circunstancias normales, los PCI permiten que el sistema inmune responda contra la infección y la malignidad, y luego controla la magnitud de esta respuesta para proteger a los tejidos propios sanos de cualquier daño que pueda derivarse de una acción inmune exacerbada. En las zonas donde está comenzando a desarrollarse una neoplasia, el sistema inmune intentará destruir a las células malignas, pero a su vez deberá enfrentarse a señales que intentarán regular negativamente sus funciones antitumorales [40]. En este contexto, la expresión de la molécula tolerogénica HLA-G representa un mecanismo que puede favorecer la supervivencia tumoral a través de la interacción con sus receptores inhibidores, ILT2 e ILT4,

desencadenando una señalización negativa que contrarresta la activación inmunitaria. El resultado final es el escape del tumor a las acciones del sistema inmunológico del huésped.

Se ha demostrado que el HLA-G se expresa en muchos tipos de tumores sólidos primarios y en las metástasis, tanto en las CT así como también en las células que infiltran el tumor [63], [64]. Dentro de los tumores sólidos, podemos mencionar cáncer de pulmón, de mama, de ovario, gástrico, colorrectal, entre otros [65]. En particular, se ha reportado una alta expresión del HLA-G en muestras de CRCC [66]–[68].

En el trabajo publicado recientemente por Krijgsman y col., se analizaron datos de secuenciación masiva de ARNm (RNAseq) de tejidos tumorales primarios que se encuentran disponibles en la base de datos pública *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, <https://www.genome.gov/Funded-Programs-Projects/Cancer-Genome-Atlas>). Allí evaluaron la abundancia de transcritos de HLA-G, que refleja la expresión génica de todas las isoformas presentes en los diferentes tipos de tumores [69]. En el diagrama podemos observar que el CRCC es el que presenta los valores más altos de expresión (en la figura 1.15, aparece con las siglas KIRC).



**Figura 1.15:** Expresión de ARNm de HLA-G en la cohorte del TCGA. Diagrama de caja de valores de expresión génica promedio del HLA-G, datos normalizados transformados logarítmicamente, en 31 tipos de tumores sólidos. Recuperada de [69]

La relevancia clínica de la proteína HLA-G en el cáncer está respaldada por las siguientes observaciones: (i) La expresión de HLA-G está asociada con la transformación maligna y nunca se observa en los tejidos circundantes sanos; (ii) El HLA-G se expresa en tumores sólidos de alto grado histológico y estadios clínicos avanzados; y (iii) se ha propuesto el uso de HLA-G como marcador pronóstico ya que su expresión en biopsias y/o niveles altos de isoformas solubles en plasma de pacientes se ha correlacionado significativamente con un pronóstico precario. Todos estos datos destacan el papel del HLA-G en la vigilancia inmunológica de los tumores sólidos y la progresión de la enfermedad [68].

Desde hace ya algunos años, se ha establecido el concepto de inmuno-edición del cáncer como un importante proceso de protección del huésped ante la presencia de células malignas. Este proceso incluye tres fases esenciales: eliminación, equilibrio y escape [70]. El HLA-G puede interferir con cada una de estas fases: (i) puede regular negativamente la fase de eliminación inhibiendo la proliferación de células T y B, la actividad citotóxica de células NK, la actividad fagocítica de neutrófilos y la función de CD, a través de la señalización de ILT2 e ILT4. En esta fase, la presencia de la proteína permitiría a una proporción de CT evadir la respuesta inmune del huésped. (ii) Las citocinas proinflamatorias, como el IFN- $\gamma$ , que se secretan en grandes cantidades, pueden regular positivamente la expresión de HLA-G. HLA-G también podría afectar la fase de equilibrio controlando la expresión de moléculas de HLA clase II en las CD. (iii) En la fase de evasión, las CT han perdido moléculas importantes para el reconocimiento inmunológico y tienden a expresar solo HLA-G en la superficie celular, haciéndolas menos susceptibles a las células inmunes efectoras. Los tumores de rápido crecimiento crean un microambiente hipóxico que

promueve la angiogénesis, la invasión y la metástasis, pero también induce la expresión de HLA-G en las CT. Además, la citoquina inmunosupresora IL-10 que se produce en grandes cantidades durante esta fase también estimula la expresión de HLA-G. Por último, se ha demostrado que HLA-G induce células T reguladoras que refuerzan el entorno tolerogénico. Todos estos mecanismos pueden alterar profundamente las respuestas inmunes antitumorales llevando a la expansión y diseminación tumoral a través del bloqueo de la inmunidad tanto innata como adaptativa e induciendo tolerancia al tumor [57].

Comprender los mecanismos utilizados por las células para escapar de la acción de los efectores antitumorales es un gran desafío para optimizar las estrategias de inmunoterapia actuales.

La evidencia existente con respecto a la importancia del HLA-G en la patología tumoral llevaría a estudiar su rol en el CRCC, su interacción con otros mecanismos que colaboran fuertemente en el desarrollo de la enfermedad, como es la angiogénesis, y cuál es la relación entre la expresión de este PCI y la capacidad para escapar de la acción de los efectos antitumorales. Estos conocimientos podrían sentar las bases para optimizar las estrategias de inmunoterapia actuales, e inclusive proponer nuevos blancos terapéuticos.

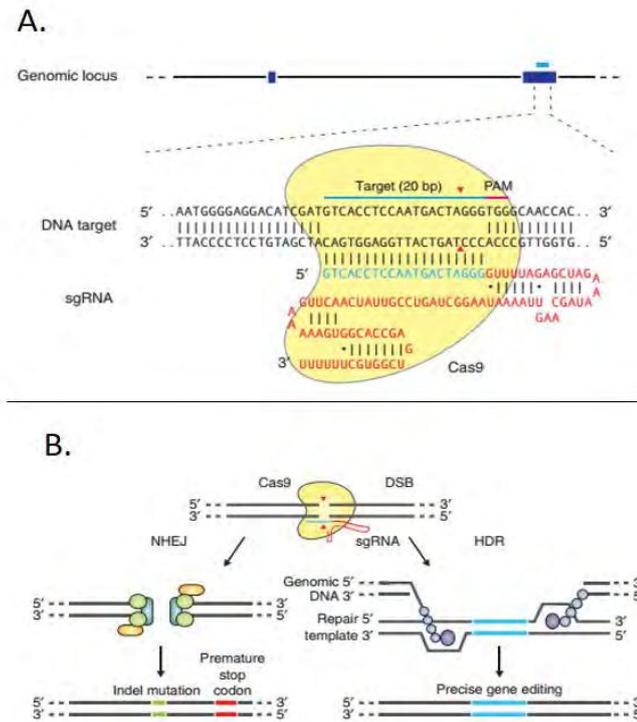
## 1.11 Nuevos enfoques para el tratamiento oncológico

### 1.11.1 Edición génica

Existe una cantidad creciente de datos preclínicos prometedores que muestran que la edición del genoma mediante la tecnología de CRISPR/Cas9 (del inglés: *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR associated nuclease*

9) constituye una poderosa herramienta de edición de genes para atacar específicamente las células cancerosas y suprimir el crecimiento tumoral [71]–[73]. CRISPR/Cas9 ha revolucionado la ingeniería genética de los últimos años ya que es un sistema biológico con el cual es posible modificar o eliminar zonas del ADN de manera muy sencilla, precisa y eficiente, y además, es una técnica muy económica. En lo que respecta a tratamientos oncológicos, está emergiendo como una estrategia alternativa sólida para la inmunoterapia celular actual que minimizará los posibles efectos secundarios causados por las terapias de bloqueo con anticuerpos.

La técnica de edición génica CRISPR/Cas9 se basa en introducir en las células una endonucleasa de origen bacteriano, denominada Cas9, la cual produce cortes de la doble cadena del ADN, de manera dirigida. Para esto, es necesario diseñar un ARN guía (ARNg) que dirija a la endonucleasa hacia el sitio específico que se quiere modificar en el genoma, el cual debe estar próximo a una secuencia corta reconocida por la Cas9, denominada secuencia PAM (del inglés: *protospacer adjacent motif*). Una vez reconocido el sitio por complementariedad de secuencia con el ARNg, la Cas9 genera un corte doble cadena en el ADN y el mismo es reparado posteriormente por la maquinaria propia de las células introduciendo inserciones/deleciones (InDels) en la zona reparada [74]. Las mutaciones adquiridas pueden generar corrimientos en el marco de lectura o codones de terminación de la traducción prematuros, que conllevan a la expresión de proteínas truncadas o no funcionales, o directamente al silenciamiento completo de la traducción.



**Figura 1.16:** A. Esquema de la endonucleasa Cas9 guiada por el ARNg. B. Ruptura de la doble cadena del ADN genómico (DSB) por acción de la Cas9 que puede ser reparado por dos mecanismos: por unión de extremos no homólogos (NHEJ) o por reparación dirigida por homología (HDR). Recuperada de [74].

### 1.11.2 Estrategia de vehiculización de drogas mediada por células madre mesenquimales (CMM).

Las CMM son células multipotentes con un potencial de diferenciación hacia linajes de tejidos mesenquimáticos. Se pueden aislar de muchos tejidos diferentes y, aunque poseen algunas diferencias según su origen, la mayoría de ellas comparten sus características principales, incluida la diferenciación multipotente y la capacidad inmunomoduladora [75]. Las fuentes más comunes para la obtención de CMM adultas son a partir de la médula ósea, del tejido adiposo y del cordón umbilical

[76]–[78]. Las primeras dos requieren técnicas invasivas y dolorosas para los pacientes. En cambio, el cordón umbilical ofrece una fuente ilimitada de CMM a partir del tejido gelatinoso de Wharton [79] y se descarta en el momento del parto, evitando cualquier práctica que cause dolor o algunas consecuencias traumáticas. Las CMM del cordón umbilical (CMM-CU) ofrecen las mismas características relevantes para la aplicabilidad clínica que las obtenidas de médula ósea, pero resulta más sencillo controlar su potencialidad de diferenciación por ser células madre adultas, incluso no son tumorigénicas en pasajes bajos [80], por lo que permitirían terapéuticas más seguras y beneficiosas comparado con el uso de células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas. Además, no tienen objeciones éticas como las CM embrionarias. Se ha informado que estas células pierden sus propiedades rápidamente, experimentando senescencia celular, por lo que no deben mantenerse largos tiempos en cultivo.

Es bien sabido que las CMM pueden modular la respuesta inmunitaria a través de varias vías, generando un ambiente inmunoprivilegiado. Específicamente, las CMM-CU expresan altos niveles de la molécula HLA-G [81]. Esta propiedad las convierte en células muy seguras para ser transplantadas alogénicamente, ya que no serían rechazadas por el huésped [82]. Además, actualmente, se evalúa la aplicación de las mismas en ensayos clínicos para muchas enfermedades inmunorrelacionadas.

Por otra parte, las CMM expresan receptores quimiotácticos, lo que les permite migrar a sitios de lesión tisular donde hay un gradiente de quimiocinas. Esta última propiedad ha demostrado ser útil en la utilización de las CMM como vehículos celulares para administrar agentes terapéuticos dirigidos a regiones precisas. Las células en cuestión albergarían un pro-fármaco o expresarían ectópicamente un gen terapéutico para ser administrado en un sitio determinado. Este enfoque se ha

utilizado en una serie de indicaciones diferentes que requieren una administración terapéutica precisa, específicamente en cáncer, trastornos cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas [83]–[85].

## 2 Hipótesis

El CRCC expresa el punto de control inmunológico HLA-G/ILTs como mecanismo de evasión del sistema inmune del huesped, por lo que el bloqueo de su expresión sería una importante estrategia para frenar el crecimiento tumoral. Además, el CRCC también expresa factores angiogénicos, como el VEGF-A, que le permiten el desarrollo de una extensa red vascular para asegurar el aporte de oxígeno y nutrientes al lecho tumoral. La elevada expresión del VEGF-A se correlaciona con el elevado índice de microdensidad vascular (MDV) que presenta esta neoplasia.

En conjunto, los altos niveles de HLA-G y de VEGF-A se correlacionan con mayor malignidad y peor pronóstico del CRCC.

## 3 Objetivo

Analizar la expresión del HLA-G, su relación con la inmunidad tumoral y nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento del carcinoma renal de células claras (CRCC).

### 3.1 Primera parte

Analizar la expresión del punto de control inmunológico HLA-G/ILT4 y su posible relación con la expresión del principal inductor de la angiogénesis, el VEGF-A, en muestras de pacientes diagnosticados con CRCC.

1. Evaluar, mediante inmunohistoquímica, la expresión del HLA-G, de su receptor ILT4, del VEGF-A y de CD34 en muestras tumorales de CRCC.

2. Correlacionar los datos encontrados con la evolución clínica del paciente.
3. Realizar cultivos primarios a partir de las células tumorales (CT) obtenidas de las muestras de CRCC.
4. Analizar la heterogeneidad intratumoral con respecto a la expresión de diferentes isoformas del HLA-G en distintas zonas de un mismo CRCC y correlacionarla con la presencia de su receptor ILT.

### 3.2 Segunda parte

Analizar posibles efectos generados por la aplicación de células madre mesenquimales derivadas de cordones umbilicales humanos (CMM-CU) en el microambiente tumoral de CRCC. Estudiar la relación entre las CMM-CU y las CT obtenidas de cultivos primarios de muestras de pacientes con CRCC.

1. Desarrollar y caracterizar a las CMM-CU.
2. Evaluar la presencia de HLA-G en las CMM-CU.
3. Evaluar la inmunomodulación de las CMM-CU en la repuesta inmune *in vitro* de linfocitos activados.
4. Realizar co-cultivos de las CT con las CMM-CU para evaluar los efectos sobre la proliferación celular.

### 3.3 Tercera parte

Silenciar la expresión del antígeno HLA-G en líneas celulares tumorales mediante el sistema CRISPR/Cas9 de edición génica.

1. Diseñar y clonar los ARN guías, dirigidos al gen del *hla-g*, en el sistema CRISPR/Cas9.
2. Transfectar el sistema CRISPR/Cas9 en las líneas celulares RCC7/HLA-G1 y JEG-3.

3. Determinar la expresión de HLA-G en ambas líneas celulares luego de la edición, a nivel proteico y transcriptómico.
4. Secuenciar las regiones del gen editadas en ambas líneas celulares.
5. Realizar ensayos de funcionalidad del HLA-G, utilizando células NK.

## **4 Materiales y método**

### **4.1 Pacientes y tumores**

Las muestras de tumores fueron obtenidas del Servicio de Urología del Hospital Zonal General de Agudos Descentralizado “Evita Pueblo” de Berazategui (Buenos Aires, Argentina) del cual derivaron 20 muestras de pacientes cuya intervención quirúrgica se llevó a cabo entre los años 2015-2017 y del Departamento de Urología del Hospital Saint Louis (Paris, Francia), del cual se obtuvieron 10 muestras entre los años 2017-2018.

Los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente mediante nefrectomía radical o conservadora según el caso, con técnica laparoscópica, para la resección del CRCC como principal terapia. Luego de la cirugía, en cada uno de los casos estudiados, se tomó una muestra para el análisis patológico y su posterior clasificación según la OMS y el resto del material tumoral se derivó a nuestro Laboratorio de Investigación. Todos los pacientes involucrados en este estudio han sido debidamente informados y han dado su consentimiento de participación. El estudio fue aprobado por el Comité Institucional del Hospital Evita Pueblo, por la junta de revisión del Hospital Saint-Louis de Paris y por el COBIMED (Comité de Bioética y Ética de la Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP).

### **4.2 Cultivo celular primario a partir de las muestras de pacientes**

Los Servicios de Urología de ambos hospitales colectaron muestras de la porción tumoral (T) y de la zona inmediatamente por fuera de la cápsula del tumor, del parénquima renal aparentemente normal (NT). En los casos en que fue posible, se

tomaron diferencialmente dos zonas tumorales, una zona central tumoral (Zona A-T) y una zona periférica tumoral (Zona B-T).

Las muestras fueron transportadas al laboratorio dentro de las 2 horas posteriores a la cirugía, contenidas en frascos estériles con DMEM suplementado con antibióticos (penicilina/estreptomicina), a 4°C. Es importante el transporte en frío ya que sirve para evitar posibles contaminaciones bacterianas y para mantener una baja actividad de las enzimas hidrolíticas presentes en el tejido y preservar su estado. Una vez en el laboratorio se comenzó con el procesamiento de las muestras. Éstas fueron colocadas en placas de Petri estériles y lavadas con PBS. Luego, con la ayuda de un bisturí y de pinzas se eliminaron las zonas del tejido que estuvieran necróticas, fibróticas, con abundante tejido adiposo o con coágulos de sangre. Finalmente, el tejido seleccionado se cortó en pequeños fragmentos de 5 mm de longitud aproximadamente, se lavaron nuevamente con PBS y se colocaron en placas de cultivo adherentes de 100 mm<sup>2</sup> (Corning), debidamente rotuladas con el número de muestra, zona y fecha, conteniendo 5 ml de un medio de cultivo definido.

Se analizaron diferentes combinaciones de medios de cultivo y suplementos con el fin de encontrar la condición óptima para el crecimiento y expansión celular. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

- DMEM + 10% v/v de suero fetal bovino (SFB) suplementado con 2 mM de aminoácidos no esenciales (AANE), 2 mM de L-glutamina, 2 mM de pen/estrep.
- DMEM + 20% v/v SFB + 1ng/mL factor de crecimiento epidérmico (EGF) suplementado con 2 mM de AANE, 2 mM de L-glutamina, 2 mM de pen/estrep.
- RPMI 1640 + 20% v/v SFB + suplemento B27 con insulina (Invitrogen), suplementado con 2 mM de AANE, 2 mM de L-glutamina, 2 mM de pen/estrep y 2 mM de piruvato de sodio. El B27 es un suplemento que contiene transferrina,

selenito de sodio, corticosterona, EGF, etanolamina, triyodotironina, seroalbúmina bovina, piruvato de sodio, entre otros factores.

### 4.3 Obtención y aislamiento de las CMM-CU

Los cordones umbilicales humanos anonimizados fueron obtenidos de cesáreas programadas a término de embarazos sanos, del Servicio de Ginecología del Hospital Español (La Plata, Bs. As., Argentina). Estos se transportaron al laboratorio en frascos estériles con DMEM suplementado con antibióticos (pen/estrep), a 4°C. Una vez allí, fueron cortados en segmentos de 2 o 3 cm de longitud, colocados en placas de Petri estériles y lavados con PBS. Luego, con la ayuda de un bisturí y de pinzas se les realizó un corte longitudinal para exponer la gelatina de Wharton, se removieron los vasos sanguíneos y se cortaron fragmentos pequeños de 5mm de largo. Estos fragmentos se lavaron con abundante PBS y se colocaron en una placa de cultivo adherente con la gelatina de Wharton en contacto con la superficie de la placa. Se añadió el medio de cultivo  $\alpha$ -MEM + 10% v/v de lisado de plaquetas (LP) suplementado con 2mM de L-glutamina y 2mM de pen/estrep.

### 4.4 Líneas celulares estables

En el presente trabajo hemos utilizado la línea celular derivada de un coriocarcinoma, llamada JEG-3, la cual fue cedida por el Instituto de Química y Fisicoquímica Biológica de la Facultad de Bioquímica y Farmacia (Bs. As., Argentina, UBA-CONICET), y una línea celular proveniente de un paciente con CRCC, llamada RCC7, la cual fue cedida gentilmente por Anne Caignard [86]. Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM con 10 % v/v SFB, suplementado con 2mM de AANE y con 2mM de L-glutamina.

La línea RCC7 fue transducida con un lentivirus que contiene el ADN copia (ADNc) de la isoforma HLA-G1, para generar una línea celular estable que expresa altos niveles de esta isoforma (RCC7 / HLA-G1)[87]. La secuencia de ADNc de HLA-G1 clonada en el lentivirus se recuperó de la base de datos ENSEMBL (ENST00000428701.5).

#### **4.5 Cultivo, expansión y criopreservación de las líneas celulares utilizadas**

Los cultivos celulares mencionados anteriormente se mantuvieron en incubadora a 37°C, en atmósfera húmeda conteniendo 5 % CO<sub>2</sub>. Los medios de cultivo se cambiaron periódicamente. Los pasajes sucesivos se realizaron cuando las células alcanzaban un 80-90 % de confluencia. Para realizar los pasajes y amplificación de las células, éstas fueron lavadas con PBS y disgregadas enzimáticamente con Tripsina/EDTA durante 3-5 minutos a 37°C; una vez que las células fueron desprendidas completamente de la superficie, se inactivó la enzima por adición de DMEM + 10 % v/v SFB (dilución 1/5).

Para la criopreservación las células fueron contabilizadas y resuspendidas a una concentración de 1x10<sup>6</sup> células/ml de DMEM + 30 % v/v SFB + 10 % v/v dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich). El medio de criopreservación fue agregado a las células de forma lenta y mezclando suavemente. La suspensión celular fue fraccionada a razón de 1ml por criotubo (Corning). Éstos fueron guardados rápidamente en un contenedor para congelamiento con isopropanol por 24 horas a -80°C, permitiendo un descenso de la temperatura a razón de 1°C/minuto. Finalmente, los criotubos se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido.

Para su descongelado, los viales fueron removidos del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente calentados a 37°C. Inmediatamente las células se centrifugaron diluyendo el medio de criopreservación con DMEM + 10 % v/v SFB (dilución 1/5) y posteriormente fueron cultivadas en el medio correspondiente según el tipo celular.

#### 4.6 Procesamiento de las muestras para el estudio microscópico

Una porción de las muestras obtenidas de los pacientes con CRCC fue fijada en tampón de formalina al 10% por 24 horas, deshidratada utilizando disoluciones de alcoholes en graduación creciente de concentración hasta llegar al 100% para remover el agua, luego se realizó el aclaramiento de la muestra en xileno (solvente orgánico) y por último se incluyeron las muestras en parafina. Con un micrómetro se obtuvieron secciones de 5 µm de espesor y se montaron sobre vidrios silanizados, se dejaron secar toda la noche, luego se realizó el desparafinado en xileno, la rehidratación con alcoholes en gradiente decreciente de concentración y se lavó con el tampón salino Tris (TBS) a pH 7.4.

- **Tinción histológica de rutina con H-E:** las secciones de tejido desparafinadas y rehidratadas fueron coloreadas con la técnica de hematoxilina de Harris y eosina en solución acuosa. Primero se colocaron los cortes en una solución de hematoxilina de Harris (dilución 1:4) por 3 a 5 minutos y pasado ese tiempo se sumergieron en agua corriente para producir el virado del colorante. Luego, los cortes fueron colocados en la solución de eosina al 1% durante 1 minuto. Por último, se procedió a la deshidratación, aclarado y montaje con bálsamo de Canadá y un cubre-objeto.
- **Tinción mediante técnica inmunohistoquímica (IHQ):** los cortes desparafinados y rehidratados fueron incubados con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 minutos para bloquear la peroxidasa endógena. La recuperación de antígeno se logró lavando los portaobjetos

en TBS e irradiándolos en tampón de citrato, pH 6.0 a 750 W durante dos ciclos de 5 minutos en un horno microondas. Luego, los portaobjetos fueron lavados con TBS e incubados con los siguientes anticuerpos primarios (por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda):

- 4H84, anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 que reconoce el dominio alfa de todas las isoformas del HLA-G (dilución 1:500, Santa Cruz Biotech., USA)
- Anti-ILT4, anticuerpo policlonal de cabra (dilución 1:50, R&D systems, USA)
- Anti-VEGF-A, anticuerpo monoclonal de ratón IgG1, clon C-1 (dilución 1:50, Santa Cruz Biotech., USA)
- Anti-CD34, anticuerpo monoclonal de ratón IgG1, clon BI-3C5 (dilución 1:1000, Santa Cruz Biotech., USA)

El sistema Envision (DAKO Corporation, Hamburgo, Alemania) fue utilizado para la detección junto con 3'3-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO) como cromógeno. Las secciones fueron ligeramente teñidas con hematoxilina de Meyer como coloración de contraste y montadas. En todos los casos, se realizaron controles positivos y negativos para garantizar resultados apropiados para cada procedimiento. La observación de los preparados se realizó mediante una cámara Olympus, la imagen se digitalizó utilizando el Software Micrometrics SE Premium. La intensidad de marcación fue dividida en 4 grupos: negativa (-), leve (+), moderada (++) o intensa (+++).

#### **4.7 Determinación del índice de microdensidad vascular (MDV)**

En el presente trabajo utilizamos la marcación del CD34 como indicador de la MDV en las muestras de pacientes con CRCC, ya que éste es un antígeno endotelial con gran sensibilidad hacia el endotelio vascular. En cada corte se seleccionaron 3

campos microscópicos, con un aumento de 200X, que tuviesen una elevada marcación (lo que se conoce como áreas “*hot spot*”). Una vez seleccionadas estas áreas, se cambia a un mayor aumento, de 400X, con el fin de contabilizar los microvasos sanguíneos de forma individual. Se consideraron microvasos a todas aquellas células o grupos de células teñidas, sin capa muscular alrededor, que pudieran independizarse de otros vasos o estructuras adyacentes, aunque no tuvieran una luz vascular identificable ni células sanguíneas dentro [88]. Los tumores en los cuales la vascularización formaba una red densa, cada rama distinta se interpretó como un vaso independiente. Los vasos que superaban las 50 micras no fueron considerados vasos de neoangiogénesis. El resultado se informa como el promedio obtenido de la cantidad de microvasos/campo (400X).

#### 4.8 Citometría de flujo

Para la determinación de los niveles de expresión de proteínas de membrana, se ha utilizado la técnica de citometría de flujo (CF) según el siguiente protocolo. En primer lugar, las células fueron levantadas de las placas de cultivo mediante acción enzimática con Tripsina/EDTA, y luego resuspendidas en PBS + 0,1% de albúmina a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/mL. Se colocaron 50  $\mu$ L de la suspensión celular en un tubo Eppendorf de 1,5mL y se añadió 1 $\mu$ L del anticuerpo de interés (dilución 1:50), el cual está conjugado con un fluoróforo específico, y se agitó por unos segundos para homogeneizar la mezcla. En todos los casos se realizó el control de autofluorescencia (células sin teñir) y el control de isotipo (células con el anticuerpo de isotipo para cada canal utilizado, para el pegado inespecífico). Luego de una incubación de 30 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad, se realizó un lavado con 500  $\mu$ L de PBS+ 0,1% albúmina, se centrifugó a 3200xg durante

5min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células teñidas en 200  $\mu$ L de PBS + 0,1% albúmina. La citometría fue llevada a cabo en un citómetro BD Accuri y los datos analizados con el Software FlowJo.

**Tabla 4.1:** Se enumeran los anticuerpos primarios conjugados utilizados

Antígeno	Fluoróforo	Marca y n° de catálogo
MEM-G9	FITC	Invitrogen, MA1-19591
CD34	FITC	BD Biosciences, 555821
CD45	PE	BD Biosciences, 555483
CD14	FITC	BD Biosciences, 555397
CD11b	PE	BD Biosciences, 555388
CD79a	PE	BD Biosciences, 555935
CD19	PE	BD Biosciences, 555412
HLA-DR	FITC	BD Biosciences, 555560
CD44	APC	Molecular probes, A14749
CD73	PE	BD Biosciences, 55027
CD105	PerCPCy5.5	BD Biosciences, 560819
CD90	FITC	BD Biosciences, 555595
CD98	FITC	Molecular Probes, A15739
CD29	PE	BD Biosciences, 561795
CD56	BB515	BD Biosciences, 564488
CD3	PE	Invitrogen, 12-0036-42
CD107a	PE	Invitrogen, 12-1079-42

## 4.9 Western Blotting

Las células RCC7/HLA-G1 y las JEG-3, que fueron modificadas mediante la técnica de CRISPR/Cas9, fueron lisadas para la obtención de proteínas y analizadas por western blotting (WB) usando el anticuerpo 4H84 bajo condiciones reductoras. Brevemente, las células fueron disueltas en 20  $\mu$ l de PBS y 4  $\mu$ l de Blue Loading 6X ( $\beta$ -

mercaptoetanol, SDS y DTT) e incubadas 5 minutos a 100°C para producir el lisado de las mismas. Luego, las alícuotas de proteínas totales obtenidas de las células modificadas fueron separadas en un gel SDS-PAGE (Bio-Rad). Se transfirieron los geles a las membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). A continuación, se incubaron las membranas por unos minutos con leche en polvo al 5% disuelta en TRIS-HCl 50mM pH 7,4 para bloquear el pegado inespecífico. Luego, se incubaron las membranas durante 16 horas con el anticuerpo 4H84 (n° de cat. 11-499-C100, Exbio) a una dilución 1:1000, transcurrido ese periodo se realizó un lavado con TRIS-HCl durante 30 minutos. Se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG de oveja conjugado con peroxidasa (n° de cat. A9044, Sigma) a una dilución 1:10,000 durante 1 hora, y se lavó nuevamente. Finalmente, las membranas fueron teñidas con *Enhanced Chemiluminescence Reagent* (n° de cat. RPN2232, Amersham). Como control de carga proteico, las membranas también fueron teñidas usando el anticuerpo anti-  $\alpha$ -tubulina, clon B-7 (n° de cat. SC-5286, Santa Cruz Biotech).

#### 4.10 Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico (ADNg), se contabilizaron  $2 \times 10^5$  células, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de buffer de lisis (10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatina, 0.5% NP-40, 0.5 % Tween-20) para lisar las membranas celulares y liberar el ADN al medio. Se agregaron 0.5  $\mu$ l de Proteinasa K (10  $\mu$ g/ml, Thermo Fisher) y se incubaron a 60°C durante 1 hora en agitación. Luego, se purificó el ADNg mediante precipitación en frío con 600  $\mu$ l de isopropanol 100 % (Merck) durante 30 minutos a -20°C. Se centrifugó la muestra a 13.000xg durante 30 minutos a 4°C, se lavó el precipitado de ADNg con etanol al 70% y se lo resuspendió en 30  $\mu$ l de agua deionizada libre de DNAsas. Para favorecer

la solubilización del ADNg, se incubaron las muestras a 65°C durante 1 hora. La concentración del ADNg aislado (ng de ADN/ $\mu$ l de solución) se determinó utilizando un espectrofotómetro automático NanoDrop 1000, y luego se almacenó la muestra a -20°C hasta el momento de uso.

#### 4.11 Extracción de ARN total

La extracción del ARN se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol Reagent (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, se retiró el medio de cultivo a las células, se lavaron con PBS y se colectaron en un volumen óptimo de Trizol según el número de células del cual se partió. Luego se realizó la extracción orgánica con cloroformo (Merck), se precipitó el ARN con isopropanol 100%, se lavó con etanol 75% y se resuspendió en agua deionizada libre de ribonucleasas. Se colocó la solución de ARN en un termobloque a 60°C durante 10 minutos para favorecer la resuspensión. La concentración del ARN aislado (ng de ARN/ $\mu$ l de solución) se determinó utilizando un espectrofotómetro automático NanoDrop 1000. Se verificó también que la relación OD260/OD280 estuviese entre 1,7 y 2 para asegurar una elevada pureza del ARN total obtenido. Este ARN fue conservado a -80°C hasta el momento de uso.

#### 4.12 Retrotranscripción del ARN

Para la síntesis del ADNc a partir del ARN se utilizó la M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) según el siguiente protocolo. En una primera etapa se preparó la siguiente mezcla por cada tubo: entre 500ng-1 $\mu$ g de ARN y una mezcla de cebadores (*random primers*) a una concentración final de 0,25 $\mu$ M. El volumen de la mezcla se completó a 10  $\mu$ L con agua deionizada. La mezcla de reacción se incubó

durante 5 minutos a 65°C y a continuación en hielo al menos 1 minuto. Luego se adicionó a cada tubo de reacción 5µl de 5X M-MLV Reaction Buffer, deoxi-nucleósidos trifosfato (dNTPs, Thermo Fisher) a una concentración final de 0,4 mM cada uno (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 200 U de M-MLV Reverse Transcriptase y se completó a un volumen final de 20 µl con agua. Se mezcló con micropipeta y se incubó primero 1 hora a 37°C para la reacción de retrotranscripción y luego 15 minutos a 70°C para la inactivación de la reacción. Finalmente el ADNc a usar como molde en la reacciones de amplificación se diluyó 5 veces en agua deionizada y se almacenó a -20°C.

#### 4.13 PCR a tiempo final, cualitativa

Los pares de oligonucleótidos específicos (*primers*) utilizados en este trabajo fueron diseñados en el portal BLAST de NCBI con la aplicación primer-BLAST. Para evitar la amplificación espuria de posible ADN genómico contaminante en las muestras, los *primers* fueron diseñados de manera tal que cada miembro del par sentido (*forward*) y anti-sentido (*reverse*) hibride en un exón diferente del gen en estudio. Los *primers* fueron sintetizados por el servicio de la empresa Genbiotech o Macrogen. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican en la tabla 4.2.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo final se realizó en un volumen final de 20 µl y se colocaron los siguientes reactivos por tubo de PCR: 2,0 µl de 10X DREAMTAQ Green Buffer, 0,4 µl de dNTPs 10mM, 1 µl del *primer forward* 10 µM, 1 µl del *primer reverse* 10 µM, 0,2µl de la enzima Dream Taq Hot Start DNA Polymerase 5U/µl (n° de catálogo MAN0015973, Thermo Fisher) y 2 µl del ADNc o genómico según el caso, y completando el volumen a 20 µl con agua deionizada libre de DNasas. El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 5 minutos a 95°C.
2. Desnaturalización del ADN molde: 30 segundos a 95°C.
3. Apareamiento: 30 segundos a la temperatura de apareado correspondiente para cada cebador.
4. Extensión: 40 a 120 segundos a 72°C, según el largo del producto a amplificar.

Los pasos 2 a 4 se repitieron por 35 a 40 ciclos.

5. Extensión Final: 5 minutos a 72°C.

Para visualizar el producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa (a una concentración entre 1 y 2% de agarosa según el tamaño del producto) con bromuro de etidio y se visualizó con lámpara UV.

#### 4.14 PCR cuantitativa (qPCR)

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se detallan en la tabla 4.2. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10µl. Se colocaron los siguientes reactivos por tubo de PCR: 5 µl de FastStart Universal SYBR-Green Master (ROX) (n° de cat. 04913914 001, Roche); 1.5µl del *primer forward* 5µM; 1.5µl del *primer reverse* 5µM y 2µl de ADNc. Se utilizó el termociclador Step One Plus (Applied Biosystems). Cada muestra a analizar fue determinada por duplicado. En todos los casos el programa utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C.
2. Apareamiento y extensión: 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C. Se realizaron 40 ciclos.

La lectura de la fluorescencia fue realizada al finalizar el paso de extensión de cada ciclo. Para cada uno de los ADNc analizados se realizaron curvas de temperatura

de apareamiento para verificar la presencia de un único producto de amplificación. Esto fue confirmado al sembrar los productos de la reacción en geles de agarosa (2%) teñidos con bromuro de etidio, evidenciando una única banda.

El análisis de los resultados se realizó utilizando el programa de uso libre LinReg [89], a partir del cual se obtuvieron las eficiencias de la reacción de PCR para cada par de *primers* y luego se calcularon los niveles teóricos iniciales de ADNc (N0) para cada condición.

Se evaluó un gen *housekeeping*, el RPL7, el cual fue utilizado para normalizar los niveles de expresión de los genes estudiados.

**Tabla 4.2:** Secuencia de los *primers* (en dirección 5'-3') utilizados en las reacciones de RT-PCR, RT-qPCR y amplificación del ADNg.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
ILT4	GCATCTTGGATTACACGGATACG	GTGGGTTTTGGGTAGGCTC
VEGF-A	CTTGCCTTGCTGCTCTACC	CACACAGGATGGCTTGAAG
VEGF-C	ATGTGTGTCCGTCTACAGATGT	GGAAGTGTGATTGGCAAACTGA
RPL7	AATGGCGAGGATGGCAAG	TGACGAAGGCGAAGAAGC
GAPDH	ACAGCCTCAAGATCATCAG	GAGTCCTTCCACGATACC
<i>Primers para el gen hla-g</i>		
Nombre	Sentido	Secuencia (5'-3')
Ex1 F	Forward	CCTGGACTCACACGGAAACT
257 F	Forward	GGAAGAGGAGACACGGAACA
257 R	Reverse	TGTTCCGTGTCTCCTCTTCC
526 R	Reverse	CCTTTGTTTCAGCCACATTGG
963 R	Reverse	GCAGCTCCAGTGACTIONACAGC
CRR1 F	Forward	TTTCCGATCACGAGACTAGC
CRD1 F	Forward	TGAGGAAAAGGAGCAGAGGA
CRD1 R	Reverse	AGAGACCAGTTTGCTTTTTTGT
CRD2 F	Forward	GGAGCTTGTTGCCAGAGAGT
CRD2 R	Reverse	CACTGGAGGGT GTGAGAACC

#### 4.15 Purificación del producto de PCR del gel de agarosa

En los casos donde fue necesario secuenciar el producto de la PCR porque poseía una o más bandas, además de la deseada, se debió correr el producto de la reacción en un gel de agarosa para separarlas según su peso molecular y luego se cortó el fragmento del gel con la banda del tamaño correspondiente y se purificó utilizando el kit “*PureLink*” *Quick Gel Extraction Kit* (n° de cat. K2100-12, Invitrogen) siguiendo las especificación del fabricante. Brevemente, se pesó el fragmento de agarosa con el ADN para luego agregar, en una relación 3:1, el volumen del buffer L3 que permite solubilizar la agarosa (mg de agarosa: ml de buffer). La mezcla se calentó a 50°C durante 20 minutos o hasta que el gel se disolvió completamente. A continuación se agregó un volumen de isopropanol 100% equivalente al peso inicial de agarosa para mejorar el rendimiento de la purificación. Se cargó la muestra en una columna que posee una membrana de sílica y se centrifugó 1 minuto a 12.000xg. Se descartó el eluido, se lavó con 500 µl del buffer W1 (solución de lavado) y se volvió a centrifugar 1 minuto a 12.000xg. Luego se descartó una vez más el eluido y se centrifugó 2-3 minutos a la máxima velocidad para eliminar todo el volumen remanente. Por último, se eluyó el ADN con 30-40µl de agua deionizada previamente calentada a 50°C, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó 1 minuto a 12.000xg. Para maximizar la elución, se repitió este último paso una vez más.

#### 4.16 Purificación del producto de PCR de la mezcla de reacción

En los casos donde fue necesario secuenciar el producto de PCR que solamente poseía una banda, se procedió directamente a la purificación utilizando el kit *Wizard*

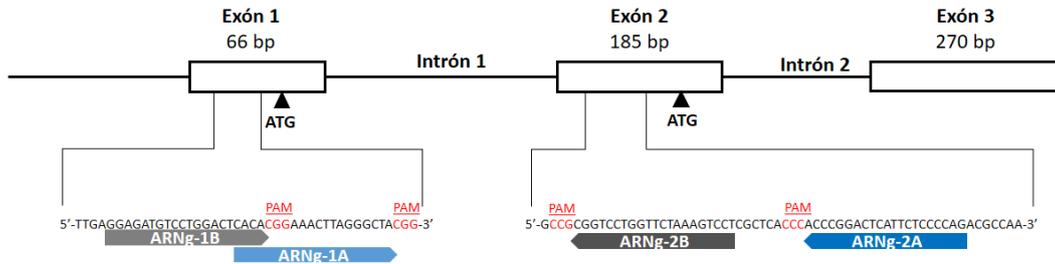
*Genomic DNA Purification Kit* (n° de cat. A1120, Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, se mezcló el producto de PCR con el buffer B2 (buffer de unión) en una relación 1:4 y se colocó la muestra dentro de una columna con una membrana de sílica para su purificación. Se centrifugó por 1 minuto a 10.000xg a temperatura ambiente. Luego se agregó a la columna 650 µl del buffer W1 que posee etanol (solución de lavado) y se centrifugó nuevamente por 1 minuto a 10.000xg. Se descartó el eluido y se realizó una centrifugación a máxima velocidad para eliminar el volumen remanente y secar la columna. Por último, para eluir el ADN se añadieron 10 µl del buffer de elución (E1, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5), se incubó 1 minuto a temperatura ambiente, se colocó la columna en un nuevo tubo de elución y se centrifugó por 1 minuto a 14.000xg. El volumen obtenido luego de la elución contiene el ADN purificado.

#### 4.17 Diseño y clonado de los ARN guías para CRISPR/Cas9

En este trabajo diseñamos cuatro ARNg que se unen específicamente al gen *hla-g*, utilizando la herramienta bioinformática Benchling Life Sciences R&D Cloud Software (<https://benchling.com/>). La secuencia del ARNg debe preceder inmediatamente a una secuencia PAM (del inglés: *protospacer adjacent motif*), que es específica para cada endonucleasa, y necesaria para realizar el corte en la doble hebra de ADN. Para nuestro caso, utilizamos la endonucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, la cual requiere una secuencia PAM 5'-NGG, donde N puede ser cualquiera de las 4 bases.

Dos ARNgs llamados 1A y 1B fueron diseñados en el exón 1, río arriba de un sitio de inicio de la traducción descrito recientemente [50]. Otros dos ARNgs llamados 2A y 2B fueron diseñados aguas arriba del sitio de inicio de la traducción más

estudiado y reconocido, presente en el exón 2. En la figura 4.1 se representan los sitios diana de cada ARNg y en la tabla 4.3 se detallan las secuencias.



**Figura 4.1:** Esquema del extremo 5' del gen *hla-g* con sus primeros exones e intrones. Se señalan los dos sitios de inicio de la traducción, ATG, en el exón 1 y en el 2. Los 4 ARNg diseñados (1A, 1B, 2A y 2B) están graficados con flechas que indican el sentido de apareamiento. En color rojo se remarcan las secuencias PAM correspondientes.

**Tabla 4.3:** Secuencia de los ARNg diseñados para el gen *hla-g*, en dirección 5'-3'. En la columna de la izquierda se muestran las secuencias PAM.

ARNg-1A	Top: CACACGGAAACTTAGGGCTA Bottom: TAGCCCTAAGTTTCCGTGTGC	PAM 5'-CGG
ARNg-1B	Top: GGAGATGTCCTGGACTCACA Bottom: TGTGAGTCCAGGACATCTCC	PAM 5'-CGG
ARNg-2A	Top: TGGGGAGAATGAGTCCGGGT Bottom: ACCCGGACTCATTCTCCCCAC	PAM 5'-GGG
ARNg-2B	Top: GGACTTTAGAACCAGGACCG Bottom: CGGTCTGTTCTAAAGTCC	PAM 5'-CGG

Los oligonucleótidos top y bottom fueron resuspendidos en agua deionizada en una concentración final de 100µM, hibridizados *in vitro* y clonados en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0 (nº de cat. 62988, Addgene) tal como se explica en el trabajo de [74]. Para el clonado se realizó la reacción de digestión y ligación

simultánea con la enzima de restricción Bbs1 y la enzima ligasa T7 (ambas de Thermo Fisher), respectivamente.

#### 4.18 Preparación de plásmidos - Transformación de bacterias competentes

Las bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5 $\alpha$ , fueron transformadas con 100ng de cada plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0 clonado con cada ARNg, mediante shock térmico a 42°C durante 90 segundos. A continuación se incubó en medio LB líquido (para 1L de medio: 10g de peptona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl), sin antibiótico, a 37°C durante 30-45 minutos en agitación permanente. Transcurrido ese tiempo, las bacterias se plaquearon en placas de Petri con agar-LB (LB + 15 g/L de agar) y con ampicilina 100  $\mu$ g/ml, se dejaron en estufa a 37°C durante 16 horas. Posteriormente se picaron algunas colonias y se realizaron mini cultivos en 3 ml de LB líquido con ampicilina a 37°C durante 16 horas, en agitación permanente. Además, se tomó muestra de cada colonia seleccionada para chequear la presencia del plásmido con el inserto del ARNg de interés mediante una *colony*-PCR, utilizando los cebadores U6F y el correspondiente ARNg anti-sentido. Se preservaron alícuotas de las bacterias transformadas con el plásmido en glicerol 30%, de aquellas colonias en donde se pudo amplificar con los cebadores antes mencionados durante la *colony*-PCR.

En cada ensayo de transformación, se realizaron los siguientes tres controles: bacterias sin transformar, para evaluar la sensibilidad al antibiótico; bacterias con el plásmido sin clonar, para evaluar la viabilidad de las células, y bacterias con el plásmido sin ligar, como control del plásmido religado sin inserto.

#### 4.19 Preparación de plásmidos a gran escala (Maxi-prep)

A partir de 1 ml de los mini cultivos obtenidos se procedió a la amplificación de los mismos en 300 ml de LB-Ampicilina a 37°C durante 16 horas, en agitación permanente. Se centrifugaron las bacterias 20 minutos a 3200xg y se descartó el sobrenadante. La preparación del plásmido se realizó utilizando el kit *Wizard Plus Maxi-prep DNA purification* (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, el *pellet* de bacterias se resuspendió en *Cell Resuspension Solution* (50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A), hasta que se obtuvo una suspensión homogénea. A esto se le agregó *Cell Lysis Solution* (0.2M NaOH, 1% SDS) para lisar las bacterias y se dejó reposar durante 10 a 20 minutos hasta obtener una solución clara y viscosa. Luego se agregó la solución de neutralización (1.32M acetato de potasio, pH 4.8), se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000xg durante 15 minutos. A continuación, el sobrenadante fue transferido a un tubo cónico filtrándolo con una gasa para retener la mayor cantidad de restos celulares. Se agregó 0,5 volúmenes de isopropanol al 100%, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000xg durante 15 minutos. El *pellet* obtenido se resuspendió en 1ml de buffer TE (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA) y se realizó un tratamiento con 20 ng/ml de RNasa para eliminar el ARN que se precipita junto con el ADN plasmídico de interés.

A continuación, se realizó la purificación del plásmido mediante una columna con resina. Para esto, la solución con el ADN fue mezclada con 10 ml de resina y luego transferida a una maxicolumna. Esta mezcla fue empaquetada en el fondo de la columna mediante vacío. Luego, se lavó la columna con *Wash Solution* (80mM acetato de potasio, 8.3mM Tris-HCl, pH 7.5, 40 µM EDTA y 55% Etanol) y luego con etanol 80%. Una vez eluidas ambas soluciones de lavado por centrifugación a

1300xg por 5 minutos, se dejó secar la columna y se eluyó el ADN plasmídico con 1ml de agua deionizada libre de DNAsas (pre-calentada a 65-70°C) mediante centrifugación a 1300xg por 5 minutos. La concentración de ADN obtenida se determinó utilizando un espectrofotómetro automático NanoDrop 1000 y el ADN plasmídico fue conservado a -20°C.

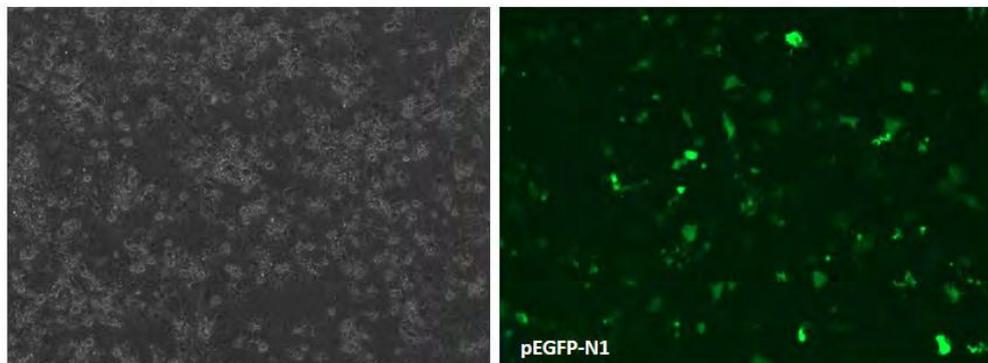
## 4.20 Transfección de las líneas celulares con el sistema

### CRISPR/Cas9

Los plásmidos pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0 clonados con los ARNg para CRISPR/Cas9 fueron transfectados en las células JEG-3 y RCC7/HLA-G1 para generar el *knockout* del HLA-G. Para esto, se plaquearon  $3 \times 10^5$  células sobre un pocillo de las placas de 12 pocillos y se las cultivó en medio DMEM + 10% SFB. Pasadas las 24 horas, al obtener aproximadamente un 70% de confluencia en cada pocillo, las células fueron transfectadas con 4µg de cada uno de los plásmidos clonados con los ARNg y *X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent* (n° de catálogo: 06 365 787 001, Roche) en una proporción 1:3 (µg de plásmido: µl de Transfection Reagent), siguiendo las indicaciones del fabricante. A las 24 horas post-transfección se seleccionaron las células transfectadas con un pulso de 48 horas de puromicina (1,75µg/ml). En paralelo, transfectamos un plásmido con GFP (pEGFP-N1, n° de cat. 6085-1, Addgene) para controlar la eficiencia de transfección, la cual determinamos por microscopía a las 24 horas (Figura 4.2). Luego de la selección con antibiótico, cultivamos las células durante 3 días hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Una vez alcanzada la confluencia, levantamos las células con Tripsina-EDTA y las dividimos en 4 para amplificar el número de células. Por último, luego de 3-4

días más, obtuvimos la cantidad suficiente para separar las siguientes fracciones celulares:

- a.  $1 \times 10^5$  células para aislamiento de ADNg (en 100  $\mu$ l de buffer de lisis)
- b.  $1 \times 10^5$  células para medir HLA-G en la superficie celular por CF.
- c.  $1 \times 10^5$  células para aislar las proteínas y medir HLA-G por WB
- d.  $5 \times 10^5$  células para aislamiento de ARNm (en 500  $\mu$ l de TRIzol)
- e.  $1 \times 10^6$  células para la criopreservación.



**Figura 4.2:** Análisis mediante microscopía de fluorescencia de las células JEG-3, 24 horas post-transfección con el plásmido pEGFP-N1, como control de la eficiencia de la transfección (200X).

#### 4.21 Aislamiento clonal de las RCC7/HLA-G1 editadas mediante CRISPR/Cas9

Luego de la selección con puromicina, las células RCC7/HLA-G1 editadas que fueron resistentes se clasificaron con el BD FACSAria III (BD Biosciences-US) para la obtención de líneas celulares clonales. Se obtuvieron alrededor de 100 clones, de los cuales seleccionamos algunos para realizar el análisis clon a clon por PCR a tiempo

final, por WB y por CF hasta encontrar aquel clon *knockout*. Seguidamente, se confirmó por secuenciación la identidad del producto de PCR obtenido.

## 4.22 Secuenciación

Para analizar lo ocurrido a nivel genómico luego de la edición génica de las células RCC7/HLA-G1 y las JEG-3 mediante la técnica de CRISPR/Cas9, hemos aislado el ADNg para secuenciar las zonas diana del gen *hla-g* a las que dirigimos los ARNg. Brevemente, hemos amplificado por PCR a tiempo final las muestras de ADNg mediante el uso de pares de cebadores específicos que flanquean la región de interés, ya sea alrededor del exón 1, del 2 o de ambos. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 1%. Si la PCR daba como resultado una sola banda del peso molecular correspondiente se procedía a la purificación del mismo usando el kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* como se explicó anteriormente (sección 4.16). En cambio, si se obtenía más de una banda, se procedía a la extracción de la misma usando el kit “*PureLink*”*Quick Gel Extraction Kit* como se explicó anteriormente (sección 4.15). Una vez obtenido y purificado el fragmento de interés se llevó a cabo la secuenciación por el método de Sanger en Macrogen (Corea). Los resultados fueron analizados con el programa en línea *Synthego Full Stack Genome Engineering* (<https://www.synthego.com/>) usando la herramienta *Synthego’s Inference of CRISPR edits* (ICE) la cual permite comparar las secuencias obtenidas del grupo de células editadas contra las no editadas.

Para secuenciar las células editadas de la línea RCC7/HLA-G1 utilizamos los cebadores CRR1 F que hibrida con la región del plásmido del lentivirus justo antes de la secuencia insertada del ADNc del HLA-G y el 257 R que hibrida en el exón 3.

Para secuenciar las células JEG-3 editadas en el exón 1 utilizamos los siguientes cebadores: CRD1 F que es complementario con el intrón 0, y el CRD1 R que hibrida en el intrón 1.

Para las JEG-3 editadas en el exón 2 utilizamos los siguientes cebadores: Ex1 F que es complementario a la región aguas arriba del ATG presente en el exón 1, y el 257 R.

Por último, cuando editamos a las JEG-3 utilizando la mezcla de los 4 ARNGs debimos secuenciar por un lado la región del exón 1, utilizando los mismos pares de cebadores, CRD1 F/CRD1 R, y para la región del exón 2 tuvimos que diseñar nuevos cebadores, el CRD2 F/CRD2 R, ya que el cebador Ex1 F ya no era funcional porque esa región también estaba modificada y su secuencia complementaria ya no estaba disponible.

#### 4.23 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Se tomaron muestras de sangre venosa periférica extraída con heparina de donantes sanos anonimizados para el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, abreviatura de sus siglas en inglés). La sangre fue diluida a la mitad con PBS y el aislamiento de las PBMC se llevó a cabo mediante centrifugación por gradiente de densidad usando el reactivo Ficoll-Paque PLUS medium (n° de cat. 17-1440-03, Fischer Scientific) en una proporción 1,5:1 (ml sangre diluida: ml Ficoll). Brevemente, en un tubo cónico de 50 ml colocamos 13 ml de Ficoll formando un colchón en el fondo del tubo, y luego añadimos muy lentamente por encima 20 ml de sangre diluida, luego se centrifugó a 800xg durante 30 minutos a temperatura ambiente, graduando la aceleración de la centrífuga para que sea suave y quitándole el freno. Las PBMC se ven como una nube blanca, llamada capa leucocitaria (*buffy*

*coat*) en la interface entre el Ficoll (transparente) y la capa superior de plasma rico en plaquetas (amarillento). Cuidadosamente con una pipeta Pasteur se extrae la capa leucocitaria y se la coloca en un nuevo tubo cónico de 50 ml, se realizan 2 lavados con abundante PBS centrifugando a 400xg durante 5 minutos. Las PBMC obtenidas fueron contabilizadas y resuspendidas como se explica a continuación: 1- para la purificación de células NK se resuspendieron en PBS (sección 4.24); y 2- para el ensayo de inmunomodulación de linfocitos activados se resuspendieron en RPMI1640 + 10% SFB (sección 4.26).

#### 4.24 Purificación de células NK a partir de las PBMC

A partir de las PBMC aisladas y resuspendidas en PBS se procedió a la purificación de la fracción de células NK por separación magnética. El primer paso fue marcar a las PBMC con el anticuerpo anti-CD56 conjugado con biotina (n° de cat. 13-0567-82, Invitrogen), marcador de superficie específico de la estirpe linfocítica NK, a una dilución 1:50, incubándose en frío por 15 minutos. Luego se añadieron 50 µl de microperlas magnéticas asociadas a un anticuerpo anti-biotina (n° de cat. 120-000-900, Miltenyi) y se incubaron por 15 minutos adicionales, en frío. Una vez marcadas las NK con el anti-CD56 y unidas a las microperlas magnéticas, se colocaron dentro de una columna MS (Miltenyi) y mediante el uso de un campo magnético, mini-MACS Separator, se logró reclutar las células de interés. Luego de realizar 3 lavados con una solución de lavado (PBS + 0.1% albúmina + 2mM EDTA), la columna se quitó del campo magnético, se colocó dentro de un tubo cónico de 15 ml nuevo y se eluyeron las NK pasando 500 µl de solución de lavado con la ayuda de un émbolo para ejercer más fuerza y lograr una buena eficiencia de elución. Las NK obtenidas fueron cultivadas en RPMI1640 + 10% SFB.

La eficacia de purificación se analizó por CF marcando las células con los siguientes marcadores de superficie: anti-CD45/PE, anti-CD56/BB515 y anti-CD3/PE.

#### 4.25 Ensayo de degranulación de las células NK

Una de las funciones del HLA-G es inhibir la degranulación de las células NK. Para determinar esto, podemos medir la presencia de la proteína de membrana asociada al lisosoma-1 (LAMP-1 o CD107a), la cual es una proteína transmembrana altamente glicosilada presente en los lisosomas de las células NK. Como consecuencia del proceso de degranulación, la membrana externa de los gránulos se fusiona con la membrana plasmática de las células NK, lo que conduce a la exposición en superficie de las moléculas de CD107a.

Este ensayo sirve para analizar si las células JEG-3 no editadas, que expresan HLA-G, producen una inhibición de la degranulación de las NK; mientras que las células JEG-3 editadas con los 4 ARNgs, que no expresan HLA-G, recuperan la tasa de degranulación de las NK. La presencia de la molécula CD107a se estudió sobre las células NK que fueron co-cultivadas ya sea con las células JEG-3 sin editar (HLA-G +) o con las JEG-3 editadas, MIX-ARNgs (HLA-G -). A continuación detallamos el protocolo realizado:

En primer lugar, las NK (células efectoras) fueron cultivadas en RPMI 1640 + 10% SFB e incubadas con 2  $\mu$ L rIL-2 (100 U/ $\mu$ L) por 16 horas para estimular el crecimiento celular. Además, las células JEG-3 wt (HLA-G+) y las células MIX-ARNgs (HLA-G -) (células diana) fueron disociadas de la placa de cultivo con Tripsina-EDTA, luego contabilizadas y resuspendidas a una concentración tal que nos permitiera añadir 100.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. El medio de cultivo utilizado también fue RPMI 1640 + 10% SFB.

Al siguiente día, las células NK fueron incubadas solas o co-cultivadas con las células diana durante 4 horas en las placas de 96 pocillos. El medio de cultivo utilizado fue suplementado con una solución llamada Monensina 1000X (n° de cat. 00-4505-51, eBioscience) que funciona como inhibidora del transporte de proteínas, especialmente útil para la medición del CD107a, ya que frena el movimiento de proteínas entre el aparato de Golgi y retículo endoplásmico y retarda la internalización del mismo una vez expuesto hacia el exterior en la membrana plasmática del linfocito. Para realizar los controles experimentales correspondientes, las NK solas fueron divididas en 3 grupos:

- Control de isotipo: para determinar la fluorescencia inespecífica.
- Control negativo (degranulación basal): las NK se incubaron solamente con el anticuerpo anti-CD107a/PE.
- Control positivo (células estimuladas): las NK fueron estimuladas con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) + ionomicina 500X (*Cell stimulation cocktail*, n° de cat. 00-4970-03, eBioscience), lo cual es necesario para activar el proceso de degranulación, y también se incubaron con el anticuerpo anti-CD107a/PE.

Las células fueron co-cultivadas en una proporción 1:1, células efectoras: células diana, en RPMI + 10%SFB donde se añadió también el cocktail de estimulación y el anticuerpo anti-CD107a.

Todas las condiciones se incubaron durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo, las células NK se lavaron con PBS+ 0,1% albúmina, se tiñeron con el anticuerpo anti-CD56/BB515 y se procesaron para el análisis por CF.

#### 4.26 Ensayo de inmunomodulación *ex vivo* de linfocitos activados

Para estudiar la capacidad inmunomoduladora de las CMM-CU se realizó un co-cultivo de las mismas con las PBMC y se evaluó la capacidad de proliferación de los mismos. Para ello, las PBMC fueron teñidas con el colorante vital carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) que pierde fluorescencia por mitades en cada división celular. Para conseguir una tinción homogénea se colocaron las PBMC resuspendidas en 1ml de PBS + 5% SFB en un tubo cónico de 15 ml seco, luego se coloca el tubo horizontalmente y sobre la pared se añade una gota de PBS + 1,1 ul CFSE 5mM, se tapa cuidadosamente y se invierte el tubo rápidamente varias veces para que el colorante se distribuya parejo con las PMBC. Se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se añadieron 10ml de PBS+5% SFB y se centrifugó por 5 minutos a 1000xg. El *pellet* de células se resuspendió en RPMI+ 10% SFB.

En primer lugar, antes de poner en contacto a las PBMC con las CMM-CU, las PBMC fueron incubadas en el medio RPMI+ 10% SFB suplementado con 5ug/ml concanavalina A durante 16 horas, para estimular su proliferación. Luego de esta incubación, se observó al microscopio óptico que las PBMC habían proliferado ya que se encontraron cúmulos de células dispuestas en rosetas de 4 a 5 células. Las PBMC fueron colectadas, lavadas con PBS, las rosetas fueron disgregadas para poder contabilizar las células, y luego se resuspendieron nuevamente en RPMI + 10% SFB para realizar el co-cultivo con las CMM-CU. El co-cultivo se llevó a cabo en placas de cultivo de 6 pocillos, donde se colocaron las PBMC y las CMM-CU en una relación 1:1. El medio de cultivo fue suplementado con 10ng/ml de anti-CD3 y 300IU/ml de IL-2, que estimulan la proliferación de las PBMC.

Se realizaron los siguientes controles: 1- Control de PBMC sin teñir y sin estimular. 2- Control de PBMC teñidas con CFSE sin estimular. 3- Control de PBMC teñidas con CFSE, estimuladas, sin el co-cultivo con CMM-CU.

Luego de 96 horas de co-cultivo, se colectó el medio de cultivo de todas las condiciones, donde se encuentran las PBMC en suspensión, se lavó con PBS varias veces cada pocillo tratando de recuperar la mayor cantidad de células sin arrastrar a las CMM-CU que crecen adheridas a la placa. Con ayuda de una pipeta se disgregaron las células, para tenerlas unicelulares y determinar la cantidad de CFSE presente en las PBMC mediante CF.

#### 4.27 Ensayo de proliferación celular

Para evaluar si existe una interacción entre las CMM-CU y las CT crecidas a partir de las muestras de pacientes con CRCC, se realizó un ensayo de proliferación celular. Para ello, primero se cultivaron las CMM-CU en placas adherentes de 100 mm<sup>2</sup> en el medio correspondiente para su crecimiento,  $\alpha$ -MEM + 10% LP. Cuando las células alcanzaron un 50% de confluencia, se removió el medio de la placa, se añadieron 10ml de RPMI1640 y se incubaron por 24 horas a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se colectó el medio (medio condicionado con CMM-CU al 50% de confluencia), el cual posee todos los factores de crecimiento que las células liberaron. Del mismo modo se procedió para coleccionar el medio de las CMM-CU al 90% de confluencia. Ambos medios condicionados pueden almacenarse a -20°C hasta el momento de su uso.

En segundo lugar, las CT fueron sembradas en las placas de 96 pocillos, a una concentración de 10.000 células/pocillo, y se les añadieron 200  $\mu$ l de los diferentes medios de cultivo: condición 1: RPMI 1640 solo, condición 2: RPMI 1640 + 10%

SFB, condición 3: medio condicionado al 50% de confluencia, condición 4: medio condicionado al 90% de confluencia. Todas las condiciones fueron realizadas por triplicado y se incubaron por 48 horas a 37°C.

Luego del periodo de incubación, se utilizó el reactivo *CyQUANT cell proliferation assay* (n° de cat. C7026, Thermo Fisher) para determinar la proliferación celular, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se removió el medio de todos los pocillos, se añadieron 50 µl de la solución de tinción (buffer HBSS + CyQUANT NF dye reagent) y se incubó la placa a 37°C durante 30 minutos. Además, se debió realizar una curva de calibración con concentraciones crecientes de células, desde 0 células/pocillo hasta 20.000 células/pocillo, también por triplicado, incubarlas con la solución de tinción y determinar la fluorescencia emitida para cada concentración conocida de células. La medición de la fluorescencia se realizó con el lector de microplacas Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific ( $\lambda$  excitación: 485nm,  $\lambda$  detección: 530nm).

#### 4.28 Análisis estadístico

Las características clínico-patológicas son variables independientes, tales como son el género, la edad, el tamaño tumoral y el grado tumoral, que se analizaron de manera descriptiva, con medidas de tendencia central y de dispersión.

Para el análisis de variables cualitativas y la posible relación entre ellas, se utilizaron tablas de contingencia, como por ejemplo para evaluar la relación entre el grado OMS/ISUP y el tamaño tumoral, o entre el grado de infiltración local y el desarrollo de metástasis y el tiempo de sobrevida de los pacientes.

Para el análisis de variables ordinales se utilizó el Test de Wilcoxon, para estudiar la relación entre el grado OMS/ISUP y los niveles de expresión de VEGF-A, HLA-G e ILT4, medidos por IHQ.

Los resultados experimentales, cuantitativos, son presentados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Los residuos se ajustaron a la distribución normal y la homogeneidad de la varianza. En los experimentos donde se comparan dos valores entre sí, se utilizó la prueba T de Student para muestras no apareadas. En los casos donde se debieron comparar más de dos variables entre sí, se realizaron estudios de ANOVA en bloques aleatorizados seguido de pruebas de comparación múltiples de Tukey. Por último, se utilizó la prueba T de Student para muestras apareadas para analizar el ensayo de degranulación de los linfocitos NK.

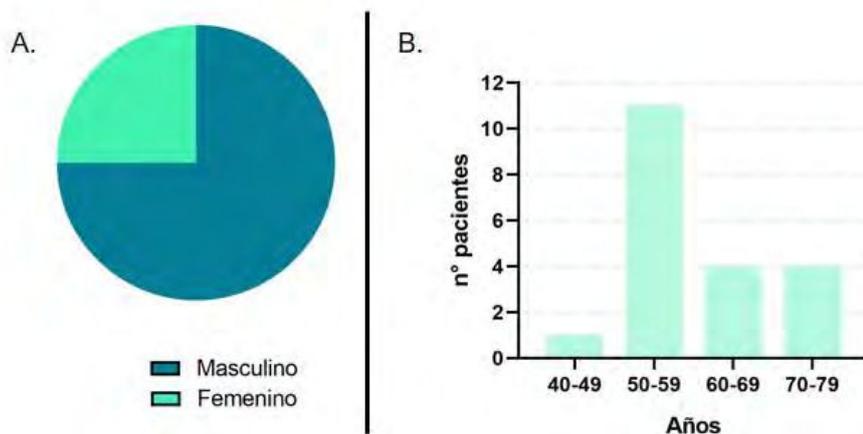
Se consideró diferencias entre grupos como estadísticamente significativas cuando el valor p fue menor o igual a 0,05. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Graphpad Prism (v6.01).

## 5 Resultados. Primera Parte

Análisis de la expresión del punto de control inmunológico HLA-G/ILT4 y su posible relación con la expresión del principal inductor de la angiogénesis, el VEGF-A, en muestras de pacientes diagnosticados con CRCC.

### 5.1 Características clínico-patológicas de pacientes con CRCC

Se recibieron 20 muestras de pacientes con diagnóstico de CRCC del Hospital “Evita Pueblo” de Berazategui, Argentina, los cuales han sido sometidos a cirugía laparoscópica como tratamiento primario del cáncer. Las muestras derivaron de 15 pacientes masculinos y 5 femeninos, con una edad de entre 50 y 59 años (Figura 5.1).



**Figura 5.1:** Distribución de los tumores según el sexo, femenino y masculino (A) y según la edad de aparición (B).

Según el sistema de estadificación OMS/ISUP, las muestras recibidas se clasificaron en los cuatro grados descriptos, siendo el grado 1 el tipo menos agresivo y el grado 4 el tipo más agresivo. La distribución encontrada fue: 1 muestra de grado 1; 12

muestras de grado 2; 6 muestras de grado 3 y 1 muestra de grado 4. El análisis de las historias clínicas reveló que 5 pacientes no sobrevivieron más de 5 años luego de la cirugía, dentro de los cuales 3 desarrollaron metástasis (Tabla 5.1). Las causas de muerte de estos pacientes fueron las siguientes: descompensación cardíaca (#1 y 17), metástasis pulmonar y cerebral (#20) y progresión del tumor (#3 y 15). Se observó una fuerte correlación entre la infiltración de la vena renal y el desarrollo de metástasis. Además, se puede observar una menor supervivencia en aquellos pacientes que al momento de la cirugía presentaron infiltración tanto de la vena renal como de los tejidos perirrenales, ya sea por progresión del tumor o por metástasis (Figura 5.2). También se muestra que varios pacientes presentaron infiltración de la cápsula renal, pero su supervivencia fue mayor a 5 años y no hubo casos de metástasis.



**Figura 5.2:** Relación entre la infiltración local de los tumores, los años de supervivencia luego de la cirugía renal (> o < 5 años) y el desarrollo de metástasis.

**Tabla 5.1:** Características clínico-patológicas de los pacientes con CRCC del Hospital Evita Pueblo, Berazategui, Argentina. Se muestra el grado OMS/ISUP, edad, sexo, aparición de metástasis, supervivencia global luego de la cirugía, índice de microdensidad vascular (MDV), expresión del VEGF-A, HLA-G e ILT4, infiltración local y tamaño tumoral (pT). Los niveles de expresión de los marcadores revelados por IHQ se muestran con (+) tinción leve, (++) tinción moderada y (+++) tinción fuerte.

Paciente	OMS/ISUP	Sexo	Edad	Metástasis	Supervivencia	VEGF-A	MDV	HLA-G	ILT4	Infiltración local	pT
1	1	F	71	No	<5	+	36	++	+++	No	T1
2	2	M	50	No	>5	+	29	++	+++	Cápsula	T2
3	2	M	63	Sí	<3	+	14	++	+++	Vena renal	T3
4	2	M	55	No	>5	++	24	+++	++	Cápsula	T1
5	2	M	50	No	>5	+	38	+++	++	No	T1
6	2	F	61	No	>5	++	54	+++	+++	Cápsula	T1
7	2	M	62	No	>5	+++	16	++	+++	Cápsula	T1
8	2	F	59	No	>5	++	33	+++	+++	Cápsula	T2
9	2	M	55	No	>5	+	35	+++	+++	Cápsula	T1
10	2	M	59	No	>5	++	34	++	+++	No	T1
11	2	M	55	No	>5	+	33	++	+	Cápsula	T1
12	2	M	43	No	>5	+	42	++	+	No	T1
13	2	M	52	No	<5	++	31	+++	+++	Tej. perirrenales	T3
14	3	F	75	No	>5	+++	20	+++	+++	Vena renal	T3
15	3	M	72	Sí	>5	++	16	++	+++	Vena renal	T3
16	3	F	54	No	>5	+	19	++	+++	Tej. perirrenales	T3
17	3	M	57	No	<3	++	27	++	+++	Tej. perirrenales	T3
18	3	M	72	No	>5	++	26	++	+++	No	T1
19	3	M	52	No	>5	+	28	++	+	No	T1
20	4	M	60	Sí	<1	++	26	+	+++	Vena renal	T3

El índice pT indica el grado de tamaño tumoral, siendo pT=1 los que poseen tamaño tumoral pequeño y pT=3 corresponde a un tamaño tumoral grande. Mediante un análisis de correlación se determinó que cuando el grado OMS/ISUP es alto, usualmente el pT también lo es ( $p < 0,05$ ). Tenemos un solo paciente con OMS/ISUP grado 1 que a su vez tiene un pT=1. Para OMS/ISUP grado 2, un 67% de los pacientes son pT=1, un 17% son pT=2 y el 17% restante son pT=3. Para

OMS/ISUP grado 3, el 67% de los pacientes son pT=3 y el 33% son pT=1. El único paciente con OMS/ISUP grado 4 tiene un pT=3 (Tabla 5.2 y Figura 5.3)

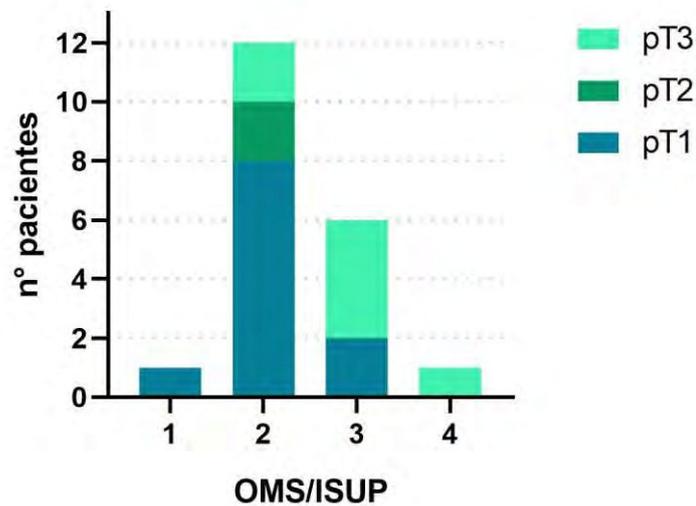


Figura 5.3: Distribución del tamaño tumoral (pT) con respecto al grado OMS/ISUP.

Tabla 5.2: Análisis de correspondencias entre el grado OMS/ISUP y el pT. La tabla muestra las frecuencias relativas de las muestras de pacientes.

OMS/ISUP	pT 1	pT 2	pT 3	Total
1	1,00	0	0	1,00
2	0,67	0,17	0,17	1,00
3	0,33	0	0,67	1,00
4	0	0	1,00	1,00
Total	0,55	0,10	0,35	1,00

## 5.2 Estudio mediante IHQ de marcadores de angiogénesis, VEGF-A y CD34, y del punto de control inmunológico HLA-G/ILT4

En los últimos años, en base a la posible relación entre la angiogénesis y la inmunoterapia, se han propuesto nuevas estrategias terapéuticas donde se combinan

terapias para mejorar el éxito del tratamiento contra el cáncer. Es por ello que nos surge un gran interés en evaluar la potencial co-expresión del principal inductor angiogénico, el VEGF-A, y del PCI HLA-G/ILT4.

Las muestras tumorales recibidas fueron procesadas para la marcación IHQ con los siguientes anticuerpos: anti- HLA-G 4H84, el cual reconoce el dominio  $\alpha 1$ ; anti-ILT4, su principal receptor, y anti-VEGF-A clon C-1. La tinción fue registrada según la intensidad de marcación en negativa (-), leve (+), moderada (++) o alta (+++) (Tabla 5.1). A continuación se analizan cada uno de los marcadores y su posible interrelación.

En todas las muestras tumorales se ha observado marcación IHQ para el HLA-G, tanto citoplasmática como de membrana (Figura 5.4). Si bien la expresión fue variable entre los pacientes y no se encontraron diferencias significativas, hubo una expresión más alta en las muestras de bajo grado OMS/ISUP (1 y 2) ya que un 54% presentaron una expresión moderada y un 46% una alta expresión, mientras que en las muestras de alto grado (3 y 4) el 72% presentó una expresión moderada, el 14% una alta expresión y el 14% restante una expresión leve (Tabla 5.3, Figura 5.6). Además, se observó expresión del receptor ILT4 en algunos macrófagos estromales, en células plasmáticas y en linfocitos infiltrantes, en todas las muestras tumorales, presentando una tinción elevada en la mayoría de los casos, sin ningún correlato con el grado tumoral. En la figura 5.4 se muestra que las regiones de tejido renal normal no presentan marcación con los anticuerpos anti-HLA-G ni anti-ILT4. En la figura 5.5 se muestran dos imágenes representativas de la tinción IHQ del ILT4.

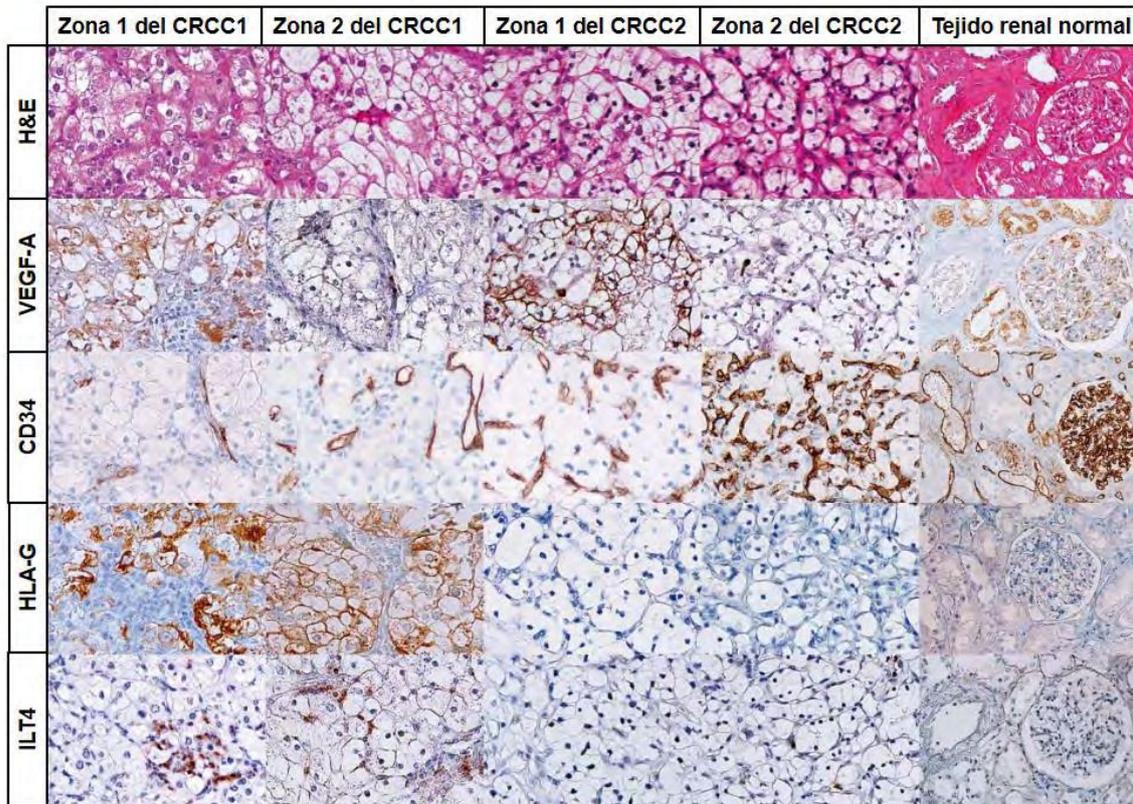


Figura 5.4: Marcación IHQ de VEGF-A, CD34, HLA-G e ILT4 en dos zonas diferentes de dos muestras representativas de CRCC. Además se muestra la coloración de rutina H-E. En la columna de la derecha se observa el tejido renal normal.

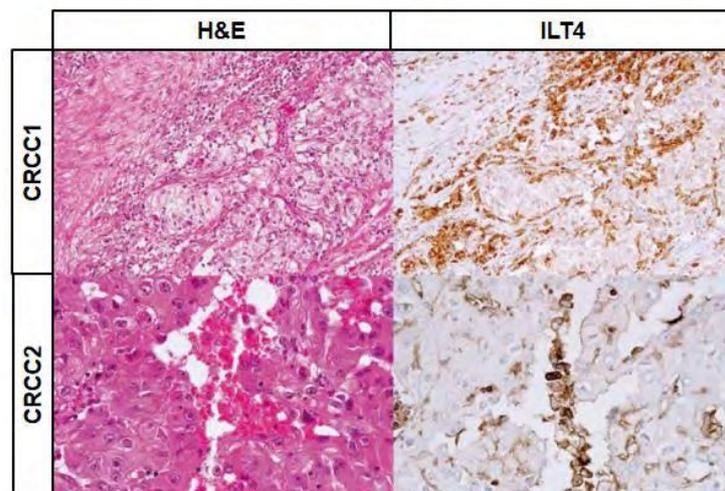
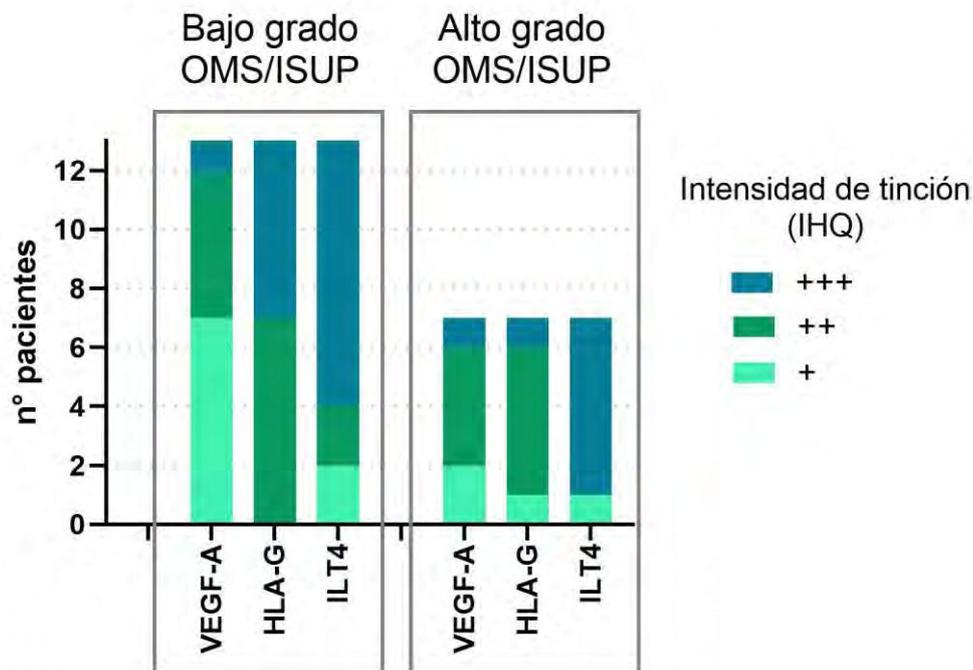


Figura 5.5: Tinción IHQ representativa del ILT4 en tejidos tumorales de dos pacientes con CRCC. Se muestra también la tinción con H-E.

Con respecto al análisis del VEGF-A, también se encontró marcación positiva en todas las muestras tumorales pero el perfil de expresión parece ser contrario al del HLA-G. Si bien los resultados no mostraron diferencias significativas, el 54% de las muestras de bajo grado OMS/ISUP (1 y 2) presentaron una tinción leve, el 38% una tinción moderada y solo el 8% una tinción alta. En cambio, en las muestras de alto grado OMS/ISUP (3 y 4), el 29% presentó una tinción leve (+), el 57% fue moderado (++) y el 14% presentó un tinción alta (+++) (Tabla 5.3 y Figura 5.6). De hecho, en la figura 5.4 se observa que algunas regiones tumorales que exhibieron una fuerte inmunomarcación con el anticuerpo anti-VEGF-A, fueron negativas para HLA-G. Similarmente, en algunas regiones tumorales que fueron marcadas con el anticuerpo anti-HLA-G, no se observó ninguna marcación con el anti-VEGF-A.

**Tabla 5.3:** Las muestras de pacientes se dividieron según el grado OMS/ISUP en bajo grado (1 y 2) y alto grado (3 y 4). Se analiza la cantidad de pacientes que poseen tinciones leves, moderadas o altas de los marcadores VEGF-A, HLA-G e ILT4. El índice de MDV se muestra como el valor promedio  $\pm$  SEM.

	Nivel de expresión	Bajo grado OMS/ISUP (1 y 2)	Alto grado OMS/ISUP (3 y 4)
<b>VEGF-A</b>	+	54% (7/13)	29% (2/7)
	++	38% (5/13)	57% (4/7)
	+++	8% (1/13)	14% (1/7)
<b>HLA-G</b>	+	-	14% (1/7)
	++	54% (7/13)	72% (5/7)
	+++	46% (6/13)	14% (1/7)
<b>ILT4</b>	+	15,5% (2/13)	14% (1/7)
	++	15,5% (2/13)	-
	+++	69% (9/13)	86% (6/7)
<b>MDV</b>		32,23 $\pm$ 10,4	23,14 $\pm$ 4,7



**Figura 5.6:** Distribución de la marcación de VEGF-A, HLA-G e ILT4 según la intensidad de tinción por IHQ (+ leve, ++ moderada y +++ alta) en los pacientes con bajo grado (1 y 2) y con alto grado OMS/ISUP (3 y 4).

En resumen, hemos encontrado una extensa y heterogénea marcación de los cuatro biomarcadores analizados en todas las muestras de CRCC recibidas. Las muestras tumorales de bajo grado OMS/ISUP poseen niveles de expresión del HLA-G entre moderado a elevado, mientras que los niveles de expresión del VEGF-A están entre leve a moderado. Lo contrario se observa en las muestras tumorales de alto grado OMS/ISUP, en donde los niveles de HLA-G resultaron más bajos, mientras que los del VEGF-A fueron más elevados. El ILT4 se encontró altamente expresado en todas las muestras de CRCC.

### 5.3 Análisis de la MDV y su relación con el VEGF-A

El índice de MDV sirve para evaluar la neoangiogénesis tumoral. Para ello, las muestras de los pacientes fueron marcadas con el anticuerpo anti-CD34 que tiñe las células endoteliales. De cada muestra se eligieron 3 zonas de alta marcación (“*hot spot*”) y se contabilizaron la cantidad de vasos sanguíneos pequeños, en formación, para calcular el índice de MDV.

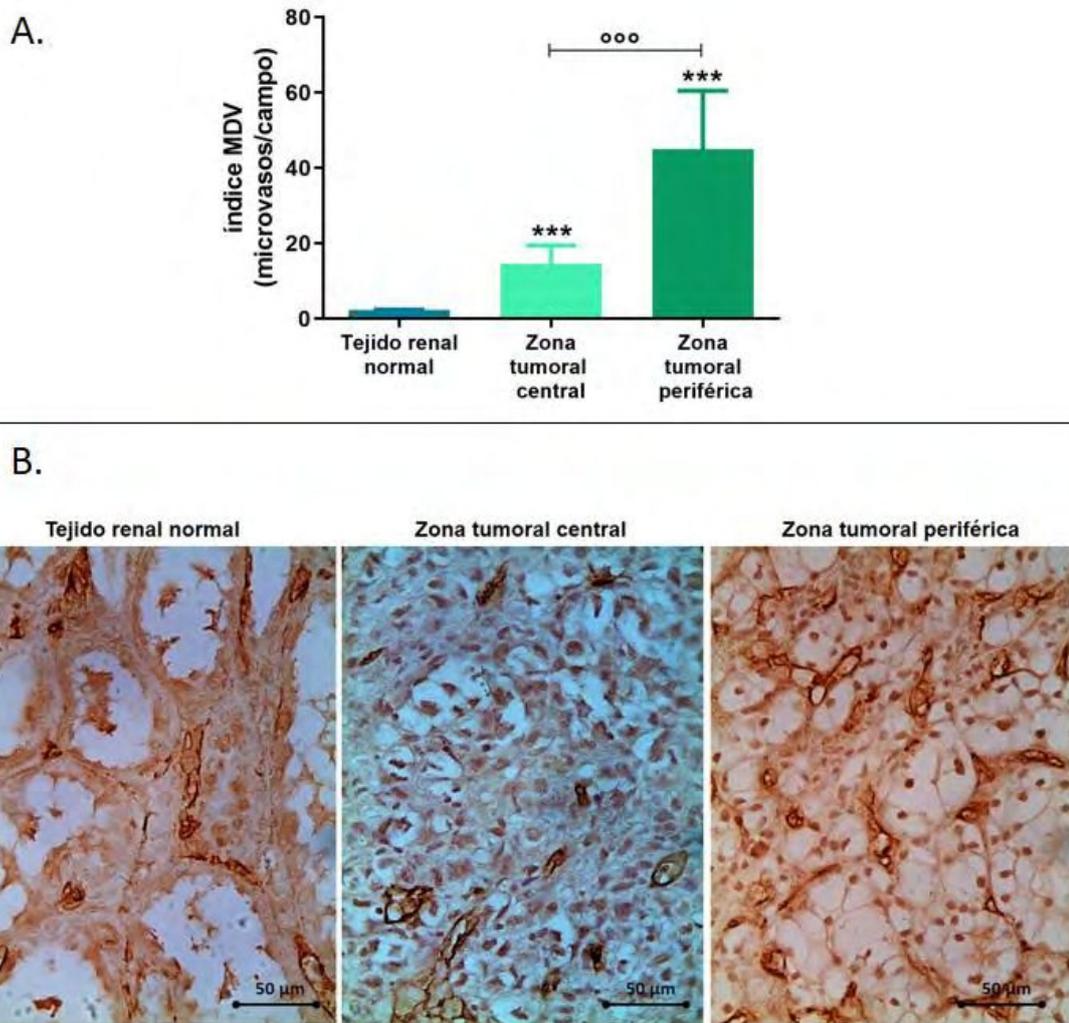
Según los resultados, las muestras tumorales se dividieron en dos grupos: grupo 1, con más de 20 microvasos/campo y grupo 2, con menos de 20 microvasos/campo. El índice de MDV promedio obtenido de todas las muestras fue de 29,05 microvasos/campo. Al dividir las muestras en tumores de bajo grado OMS/ISUP (1 y 2) y de alto grado (3 y 4), en la tabla 5.3 se muestra que el índice de MDV promedio es  $32,23 \pm 10,4$  y  $23,14 \pm 4,7$  respectivamente. La diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa, presentando un índice más elevado las muestras de bajo grado ( $p < 0,05$ ). La mayoría de los pacientes (16/20) pertenecen al primer grupo, es decir con un  $MDV > 20$ , lo que confirma que las muestras de CRCC tienen una neoangiogénesis tumoral importante, sobre todo en los primeros estadios de la enfermedad.

Si se analiza en conjunto el índice de MDV y la expresión del VEGF-A para cada muestra individualmente, se observa que en la mayoría de los pacientes con  $MDV > 20$ , los niveles de VEGF-A son bajos (+ o ++), y aquellos con  $MDV < 20$  presentan altos niveles de VEGF-A (+++). Esta correlación negativa entre ambos parámetros no se mantiene en los casos de pacientes que han desarrollado metástasis, donde tanto el MDV como los niveles de VEGF-A son bajos (Tabla 5.4).

**Tabla 5.4:** Relación entre el índice MDV y la expresión del VEGF-A.

MDV	VEGF-A	Nº de pacientes	Metástasis
>20	+	8	No
>20	++	7	No
<20	+++	2	No
<20	+ o ++	3	Sí

Otro dato relevante a estudiar es la heterogeneidad de la neoangiogénesis dentro de un mismo tumor, lo cual podría llevar a respuestas variables frente a los tratamientos anti-angiogénicos en el paciente. Para poder realizar un estudio más detallado se analizaron 5 nuevas muestras de pacientes con CRCC en las cuales se obtuvieron biopsias de 3 zonas diferentes: zona de tejido renal normal adyacente al tumor, zona central tumoral y zona periférica tumoral. El índice de MDV fue significativamente mayor en las zonas tumorales, tanto central como periférica, en comparación con el tejido renal adyacente normal (Figura 5.7). Además, se observaron diferencias entre las zonas tumorales, siendo el índice de MDV más alto en la zona periférica tumoral que en la región central ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.7:** A- Índice de MDV promedio  $\pm$  SEM en la zona de tejido renal normal adyacente al tumor y en las regiones tumorales. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) se muestran con \*\*\* (entre la zona normal y las tumorales), y con °°° (entre las zonas tumorales periférica y central). B- Imágenes de muestras de CRCC teñidas mediante IHQ con anti-CD34, representativas de cada zona.

Según lo mencionado, observamos que la mayoría de las muestras tumorales presentaron un importante desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. Hallamos una correlación negativa entre la expresión del VEGF-A y el índice de MDV. Además, encontramos gran heterogeneidad del índice de MDV en las diferentes zonas tumorales analizadas dentro de un mismo paciente.

#### **5.4 Obtención de cultivos celulares primarios a partir de CT crecidas de las muestras de pacientes con CRCC**

Las muestras obtenidas de pacientes con CRCC han sido procesadas en el laboratorio para la obtención de cultivos celulares primarios. Para ello se utilizaron diferentes combinaciones de medios de cultivo y factores de crecimiento con el fin de encontrar la condición óptima para el crecimiento de las CT. Las muestras de biopsias recibidas se procesaron por separado según la zona tumoral central y periférica y la zona de tejido renal normal adyacente al tumor. Se lavaron con PBS y se cortaron en pequeños fragmentos que se colocaron sobre una placa de cultivo adherente, en las cuales se fueron probando distintas combinaciones de medios de cultivo.

Los protocolos probados fueron:

- En primera instancia se añadió el medio de cultivo DMEM suplementado con 10% SFB y luego de un mes no se observó crecimiento celular alrededor de los fragmentos de tumor.
- En una segunda instancia se suplementó el medio de cultivo antes mencionado con el factor de crecimiento epidérmico, EGF, y se duplicó la cantidad de SFB, con el fin de estimular el crecimiento celular. Luego de un mes tampoco se observó ningún tipo de crecimiento alrededor de los fragmentos de tejido.

Es bien sabido que la composición de los medios aplicados puede influir en la proliferación y viabilidad celular. El DMEM es un medio constituido por altas concentraciones de sales, aminoácidos no esenciales y glucosa, por lo cual se decidió cambiarlo por otro medio basal.

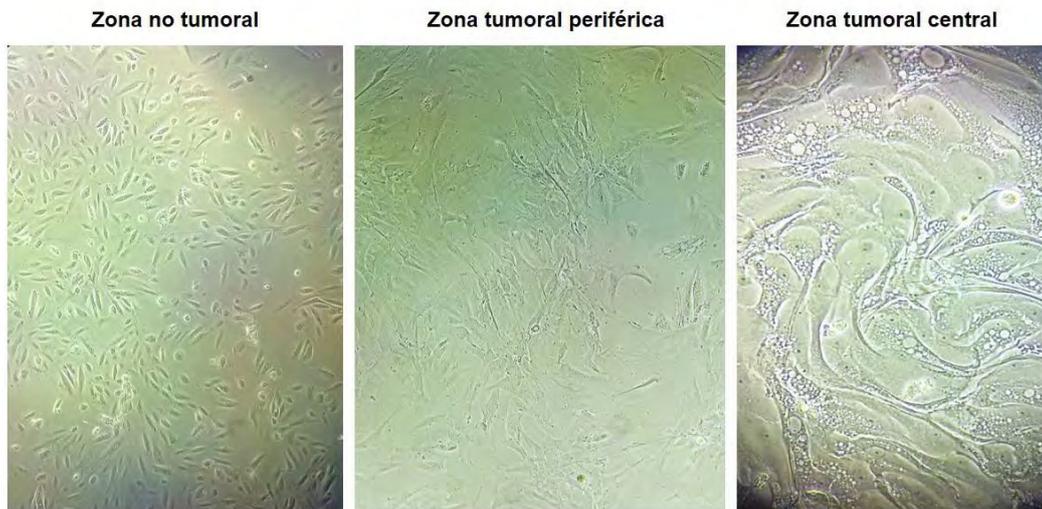
- Se utilizó el medio RPMI 1640, el cual es menos rico en nutrientes pero con alta concentración de fosfato, y se lo suplementó con un 20% SFB y con el reactivo

B27, que es un suplemento que aporta muchos factores de crecimiento así como también hormonas que estimulan la proliferación celular. Con estas modificaciones en el medio de cultivo utilizado se ha conseguido expandir las células a partir de los fragmentos de las biopsias.

Los primeros fragmentos de tejido en los que aparecieron células alrededor, llamativamente, fueron aquellos que provenían de la zona de tejido renal normal adyacentes al tumor. Las células tardaron aproximadamente  $14 \pm 5$  días en crecer lo suficiente para realizar el primer pasaje celular. Al microscopio óptico, se observaron células pequeñas de forma ahusada, con un núcleo redondeado central (Figura 5.8).

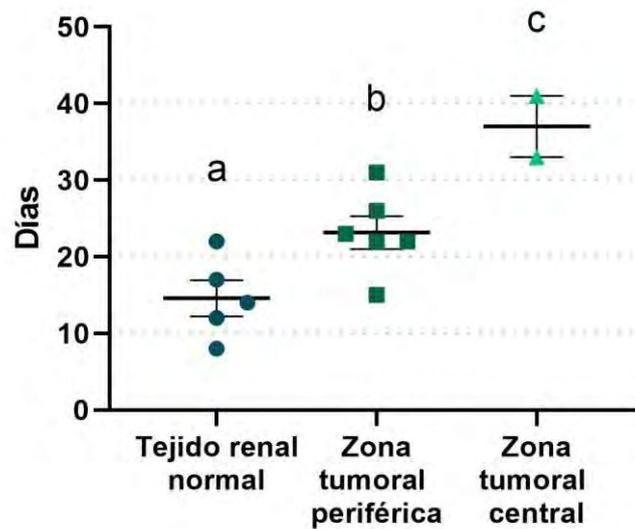
Las siguientes células en aparecer fueron las que provenían de la zona periférica tumoral, con un promedio de  $23 \pm 5$  días para alcanzar el momento del primer pasaje celular. Éstas CT presentaron una morfología muy diferente a las anteriores. Se observaron células más grandes, alargadas, con un núcleo de mayor tamaño y de forma irregular (Figura 5.8).

Por último, las células provenientes de la región central tumoral tardaron aproximadamente  $37 \pm 5$  días en crecer hasta alcanzar su primer pasaje celular. La morfología observada fue muy distinta a los dos tipos de células descritas anteriormente. Se observaron células de mayor tamaño, sin una forma definida, con abundantes vesículas citoplasmáticas y un núcleo de gran tamaño con uno o más nucléolos prominentes (Figura 5.8).



**Figura 5.8:** Células crecidas en las placas de cultivo observadas al microscopio óptico con un aumento de 200X. Se observan las células crecidas de las zonas de tejido renal normal y de las zonas tumorales periférica y central.

Al comparar los tiempos de crecimiento de las células en las 3 zonas mencionadas, se observaron diferencias significativas entre los 3 grupos ( $p < 0,05$ ), siendo las células de las muestras de tejido renal normal las más rápidas en crecer ( $14 \pm 5$  días) y las de la zona tumoral central, las más lentas ( $37 \pm 5$  días) (Figura 5.9).



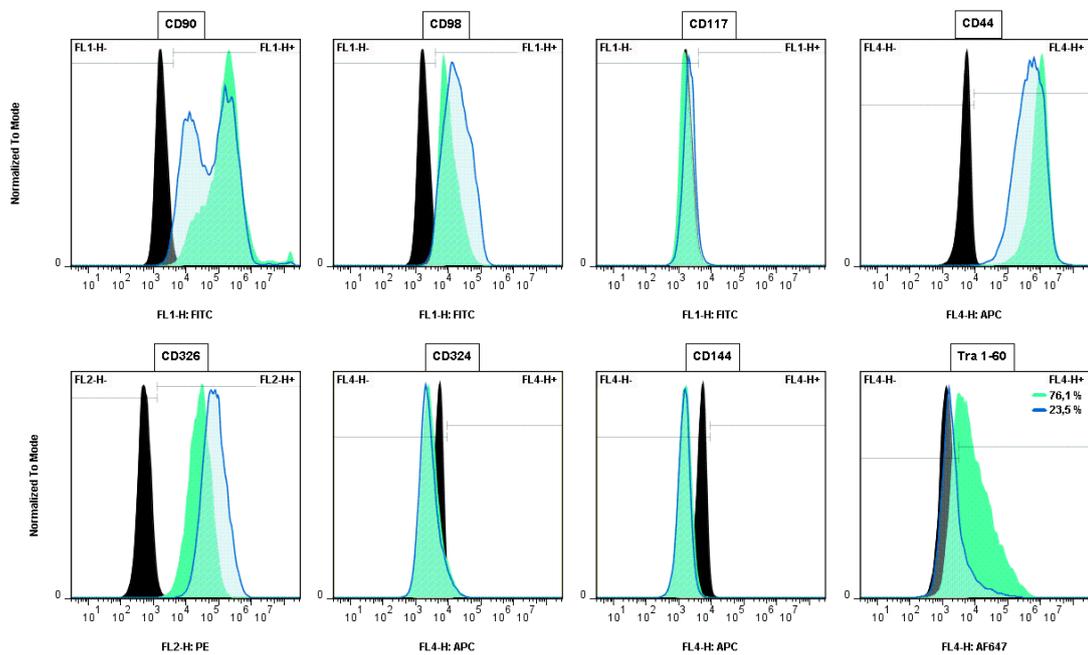
**Figura 5.9:** Días promedio de crecimiento de las células hasta alcanzar el momento del primer pasaje celular en las zonas de tejido renal normal, tumoral periférica y tumoral central. Las letras a, b y c muestran que hay diferencias significativas entre las 3 zonas ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4.1 Análisis de marcadores de superficie en las CT crecidas a partir de cultivos primarios de CRCC y en las células de tejido renal normal, mediante CF

Para caracterizar a las células crecidas a partir de las biopsias obtenidas de pacientes con CRCC, se analizaron ciertos marcadores de superficie celular. Elegimos estudiar aquellos que están involucrados en procesos biológicos característicos de las CT, como son la interacción célula-célula, la adhesión celular, la migración, la proliferación, la diferenciación y la angiogénesis. Algunos de los marcadores seleccionados para su medición fueron los cúmulos de diferenciación (CD, de sus siglas en inglés *cluster of differentiation*) 90, 98, 117 y 44. Además, se estudió la expresión de cadherinas específicas de células epiteliales (CD324 y CD326) y del endotelio vascular (CD144), con el fin de determinar el linaje de las células obtenidas

en el cultivo. Por último, se midió la expresión del marcador Tra 1-60, el cual indica un estado celular indiferenciado.

Los marcadores se midieron mediante CF en las CT crecidas a partir de la zona periférica tumoral y se los comparó con los observados en las células crecidas a partir del tejido renal normal. Los resultados obtenidos mostraron positividad para CD90, 98 y 44, y negatividad para el CD117 para ambos tipos celulares, tumorales y no tumorales. También, la cadherina EP-CAM o CD326 resultó positiva para ambas poblaciones celulares, mientras que la cadherina epitelial CD324 no se expresó en ninguna de las dos poblaciones. Por otra parte, la VE-cadherina o CD144 resultó negativa en ambas poblaciones celulares. Con respecto al marcador Tra 1-60, el 76,1% de las CT dieron positivas, en cambio en las células no tumorales sólo el 23,5% dieron positivas.



**Figura 5.10:** Análisis mediante CF de las células crecidas a partir de la zona tumoral periférica y del tejido renal normal. Se midieron los marcadores de superficie CD90-FITC, CD98-FITC, CD117-FITC, CD44-APC, CD326-PE, CD324-APC, CD144-APC y Tra 1-60-

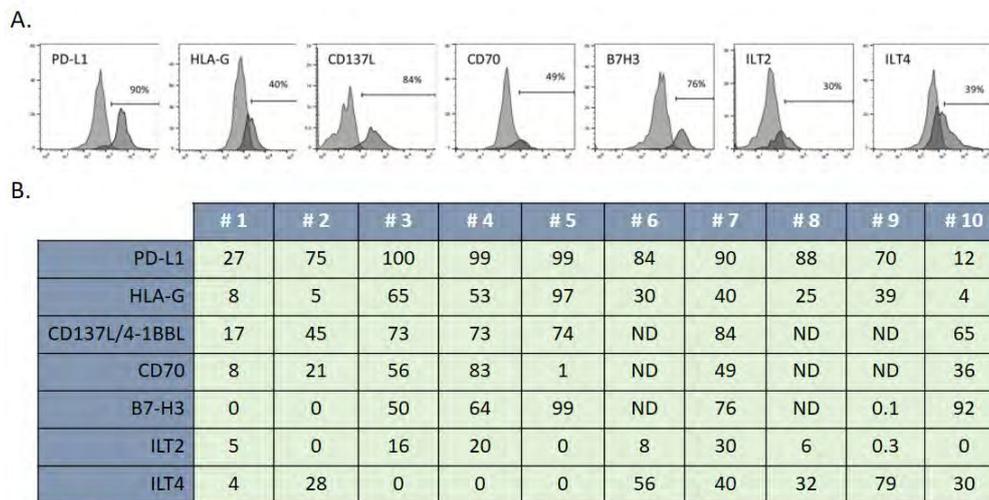
AF647. En negro se muestran los controles de isotipo, en celeste las células renales normales y en verde las CT de la zona tumoral periférica.

#### 5.4.2 Análisis de puntos de control inmunológicos (PCI) sobre la superficie de las CT crecidas a partir de cultivos primarios de CRCC, mediante CF.

El principal interés de este trabajo está en estudiar el PCI HLA-G/ILT2 o HLA-G/ILT4, pero es bien sabido que los tumores se valen de muchas estrategias con el fin de evadir el sistema inmune para proliferar y expandirse. En particular, está reportado que el CRCC sobreexpresa varios PCI simultáneamente, dentro de los cuales podemos mencionar 4-1BBL: 4-1BB (CD137L: CD137), PD-L1: PD-1, B7-H3 y CD70. En colaboración con el laboratorio de investigación SRHI del Hospital Saint Louis de Paris, estudiamos mediante CF la presencia de estos PCI sobre la superficie de las CT obtenidas de los cultivos primarios de 10 muestras adicionales de CRCC. En la figura 5.11a se muestra un ejemplo representativo, que expresa la mayor parte de los PCI.

Las proteínas PD-L1, HLA-G y CD137L se expresaron en todos los tumores estudiados. Se encontró CD70 en 6, de un total de 7, y B7-H3 en 5, de un total de 8, tumores estudiados (Figura 5.11b). Hubo una alta variabilidad entre muestras con respecto a la proporción de CT que expresan un punto de control determinado. Por ejemplo, la proporción de CT que expresan PD-L1 varió del 27% en el paciente #1 al 100% en el paciente #3. De manera similar, este rango fue de 17 a 74% para CD137L. En el caso de la molécula HLA-G, la cantidad de CT positivas en la mayoría de los casos fue baja, hallándose solo 3 pacientes con más del 50% de CT positivas. (Figura 5.11b). Además, se observó expresión significativa de ILT2 en las

CT de tres pacientes (16%, 20% y 30%). De manera similar, también se observó expresión significativa de ILT4 en CT de seis pacientes (del 28 al 79%).

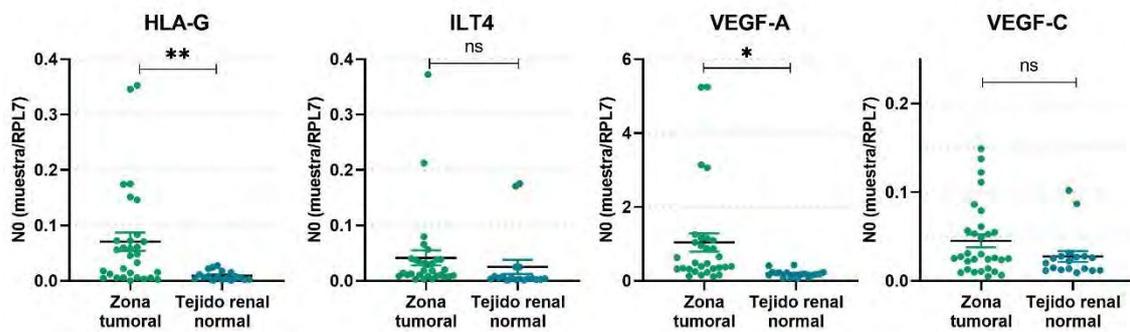


**Figura 5.11:** A- CF de una muestra de CRCC representativa, que expresa la mayoría de los IC estudiados: PD-L1, HLA-G, CD137L, CD70, B7H3, ILT2 e ILT4. B- En la tabla se observan los porcentajes de CT positivas para cada PCI en cada uno de los pacientes (#1 al #10). ND: no detectable.

#### 5.4.3 Estudio de la expresión de VEGF-A, VEGF-C, HLA-G e ILT4 mediante RT-qPCR en las CT crecidas a partir de cultivos primarios de CRCC y en las células de tejido renal normal.

Para una mejor comprensión de la relación existente entre los marcadores angiogénicos, VEGF-A y VEGF-C, y el punto de control inmunológico HLA-G/ILT4, se decidió evaluar la expresión a nivel del ARNm en las CT obtenidas de los cultivos primarios de las muestras de pacientes con CRCC. Estas células fueron procesadas para la extracción del ARNm, la retrotranscripción para obtener el ADNc y la consiguiente RT-qPCR para evaluar la expresión de estos marcadores.

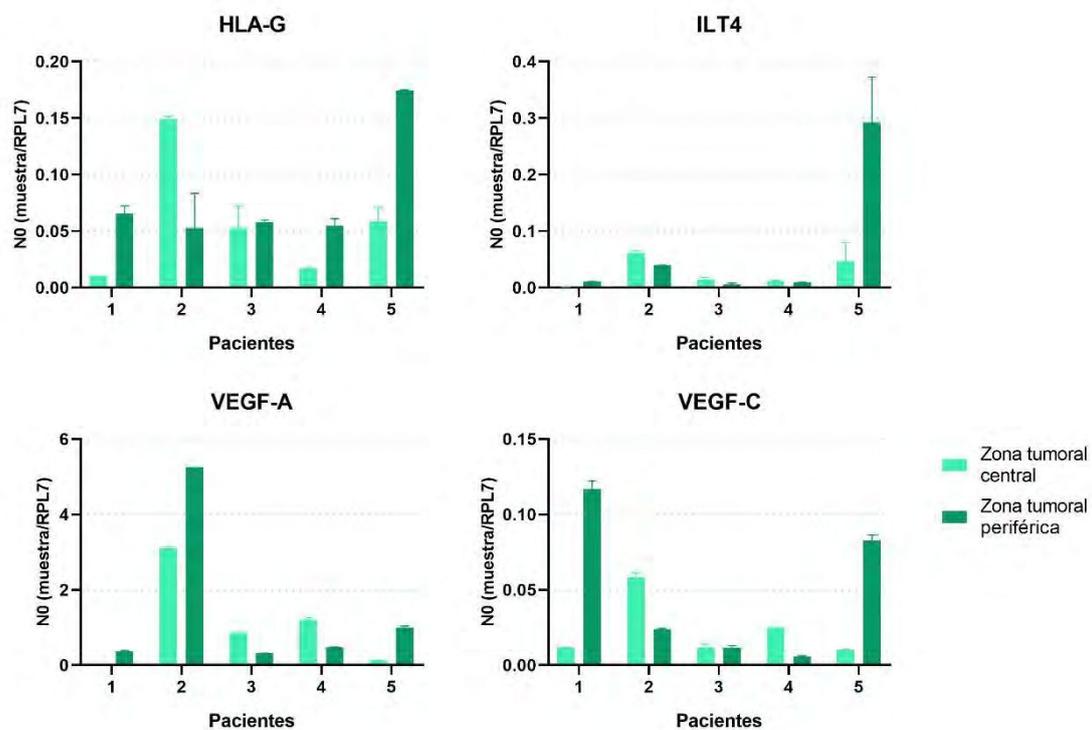
Se observó una gran heterogeneidad entre los pacientes con respecto a la expresión de los 4 genes analizados. Algunas muestras tumorales presentaron bajos niveles de expresión, otras dieron una expresión moderada y otras muestras dieron una alta expresión. En las zonas de tejido renal normal los valores medios de expresión de los 4 marcadores fueron muy cercanos a cero. La media de expresión del HLA-G y del VEGF-A en las zonas tumorales de los pacientes fue significativamente mayor a la obtenida en las zonas de tejido renal normal ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$  respectivamente).



**Figura 5.12:** Niveles de expresión del ARNm de HLA-G, ILT4, VEGF-A y VEGF-C en las CT crecidas a partir de muestras de pacientes (verde) y en las células crecidas a partir de tejido renal normal (celeste). Se grafica el número medio de partículas de ARNm iniciales normalizadas con la expresión constitutiva de RPL7  $\pm$  SEM. Los \* indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y ns indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones.

En aquellas muestras donde se obtuvieron dos fragmentos del tumor, zona central y periférica tumoral, se pudo evaluar la heterogeneidad de expresión de estos marcadores en un mismo paciente. Si bien el número de muestras fue bajo, se puede realizar una descripción de los resultados. Se observa una disparidad en la expresión de los 4 marcadores, no solo entre los pacientes sino también dentro de un mismo paciente. Por ejemplo, en la figura 5.13 se observa que las muestras 1 y 4 solo

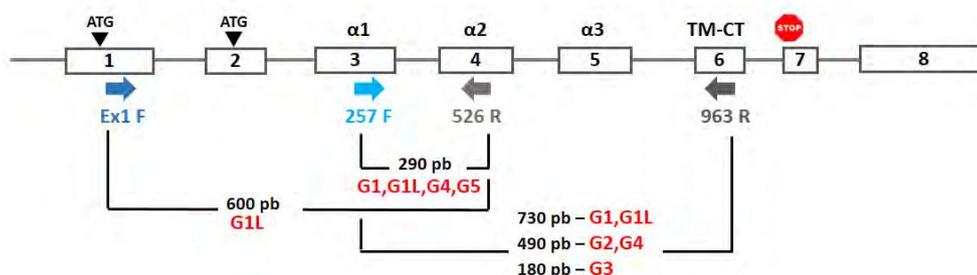
expresan HLA-G en la zona periférica, en cambio las muestras 2, 3 y 5 lo expresan en ambas zonas y los niveles de expresión de la proteína también son variables. De manera similar se puede describir lo que ocurre con el resto de los marcadores. El ILT4 tiene una expresión significativa en los pacientes 2 y 5. El VEGF-A se encuentra muy expresado en el paciente 2, y en el resto se observan valores bajos de expresión en la zona central (3 y 4) o en la zona periférica (1 y 5). Por último el VEGF-C está más expresado en la zona periférica de los pacientes 1 y 5.



**Figura 5.13:** Niveles de expresión del ARNm de HLA-G, ILT4, VEGF-A y VEGF-C en las CT crecidas a partir de la zona central tumoral (verde claro) y periférica tumoral (verde oscuro) de 5 muestras de pacientes con CRCC. Se grafica el número medio de partículas de ARNm iniciales normalizadas con la expresión constitutiva de RPL7  $\pm$  SEM.

#### 5.4.4 Análisis de las isoformas del HLA-G presentes en las zonas tumorales central y periférica mediante RT-PCR.

Como se describió en la introducción, el gen *hla-g* codifica para un ARNm que luego sufre un corte y empalme alternativo para generar 7 isoformas, 4 son proteínas de membrana (HLA-G1, G2, G3 y G4) y 3 son proteínas solubles (HLA-G5, G6 y G7). Todas ellas poseen el mismo sitio de inicio de la traducción en el AUG situado en el exón 2. Recientemente, se describió un nuevo sitio de inicio de la traducción en el exón 1 que solo entra en marco de lectura si hay una delección de 106 pb entre los exones 1 y 2, lo cual genera una nueva isoforma con un N-terminal más largo, con 5 aa adicionales, la llamada HLA-G1L (por su significado en inglés *long*: largo)[50]. Uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar la presencia de las distintas isoformas en las regiones tumorales obtenidas de pacientes con CRCC. Para ello se utilizaron combinaciones de oligonucleótidos que amplifican regiones específicas de cada una de las isoformas. En la figura 5.14 se muestran los sitios diana de los oligonucleótidos y las isoformas correspondientes. Además, debido a la gran homología de secuencia que posee el gen *hla-g* con el resto de los genes *hla*, quisimos evaluar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados.



**Figura 5.14:** Esquema del gen *hla-g* con sus exones. Se detallan los dominios para los que codifican cada uno de ellos ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , TM: transmembrana y CT: citoplasmático). Se señalan los dos sitios de inicio de la traducción, ATG, en el exón 1 y en el 2, y el sitio final

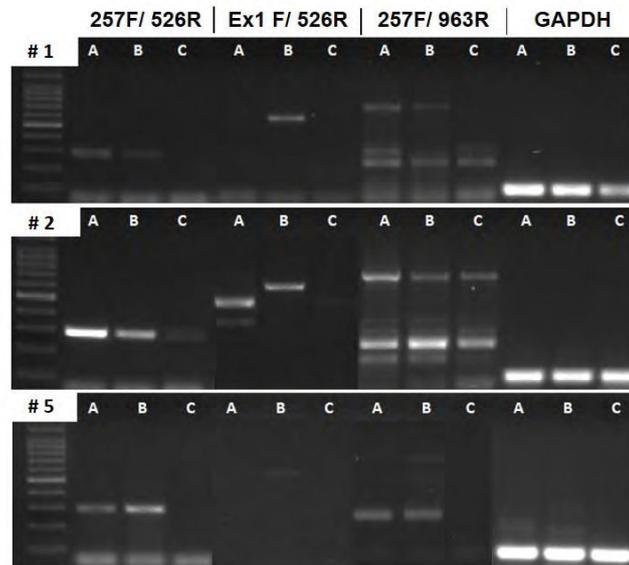
de la traducción, STOP, en el exón 7. Los oligonucleótidos están graficados con flechas que indican el sentido, F o R. Además, se muestran las combinaciones de oligonucleótidos utilizadas, con el tamaño correspondiente de banda (en pares de bases) y las isoformas que se detectan.

Se seleccionaron muestras representativas que fueron positivas para HLA-G (mediante RT-qPCR) para estudiar la presencia de las diferentes isoformas del HLA-G. La figura 5.15 muestra lo siguiente:

En la zona central tumoral (A) de los pacientes 1 y 2 se observó amplificación con los oligonucleótidos 257F/526R y con 257F/963R, lo cual se corresponde con la expresión de las isoformas HLA-G1, G3 y G5. En cambio, en la zona periférica tumoral (B) ambos pacientes mostraron la banda de peso molecular (PM) correcta con el par Ex1F/526R, pero con el par 257F/963R, el paciente 1 solo expresó la banda de 200 pb y el paciente 2 expresó la banda de 730 pb y la de 200 pb; lo que implica la expresión de las isoformas HLA-G1L, G3 y G5 en la zona B del paciente 1, y las isoformas HLA-G1, G1L, G3 y G5 en la zona B del paciente 2.

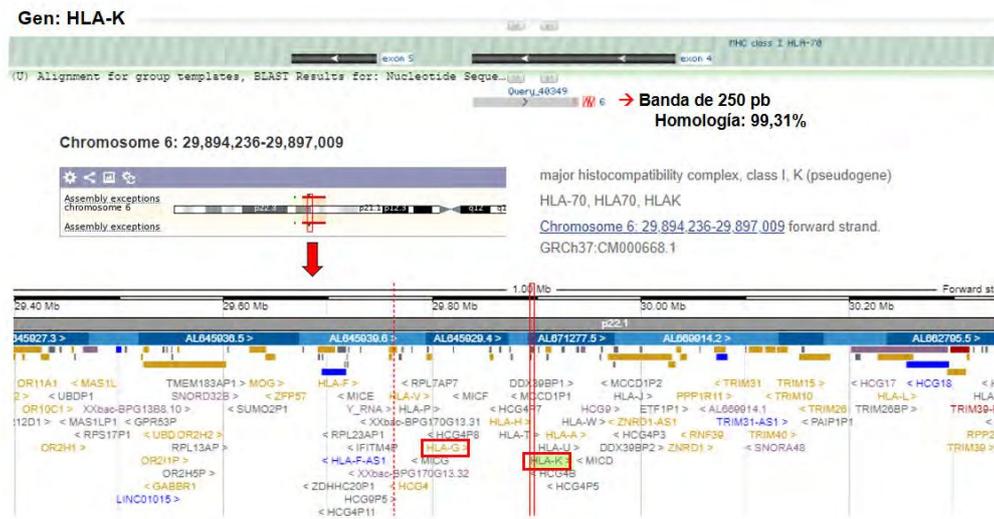
En el caso del paciente 5, en la zona A se obtuvo la banda correcta de 290 pb con el par 257F/526R, mientras que no hubo amplificación con el resto de los cebadores, por lo que solamente se estaría expresando la isoforma soluble HLA-G5. En cambio, en la zona B se obtuvo amplificación con los 3 pares de oligonucleótidos, pero con el par 257F/963R solamente se vió la banda de 730 pb, esto quiere decir que las isoformas presentes en esta zona tumoral fueron HLA-G1, G1L y G5.

En las zonas de tejido renal normal (C), no se ha obtenido ninguna banda específica para el HLA-G en ninguno de los pacientes, a excepción del paciente 2 en donde se ve una banda muy leve con los pares 257F/526R y con 257F/963R a 730 pb, que correspondería a HLA-G1.



**Figura 5.15:** Gel de agarosa que muestra las bandas obtenidas con los siguientes pares de cebadores: 257F/526R, Ex1 F/526R y 257F/963R, para los pacientes 1, 2 y 5. Se utilizan cebadores para el gen constitutivo GAPDH como control de carga. Zona A: central tumoral, zona B: periférica tumoral y zona C: tejido renal normal. Se utilizó el marcador de peso molecular (PM) de 100 pb.

En todas las muestras analizadas, ya sean tumorales o no, aparece una banda intermedia de aproximadamente 250 pb con el par 257F/963R, cuyo PM no se corresponde con ninguna isoforma conocida del HLA-G. Para evaluar su identidad, se aisló la banda del gel de agarosa, se purificó y secuenció por el método de Sanger. Los resultados arrojaron que la secuencia presenta una homología del 99,31% con el gen *hla-k*, llamado también MHC clase I HLA-70 (Figura 5.16). Este pseudogen se encuentra en el cromosoma 6, muy cercano al del HLA-G.



**Figura 5.16:** Análisis de la secuencia de la banda de 250 pb obtenida con los pares de cebadores 257F/963R. Presenta un 99,31% de homología con el gen *hla-k*. Se muestra su ubicación en el cromosoma 6 y su cercanía con el *hla-g*.

A modo de resumen, hemos observado una heterogeneidad en los perfiles de expresión de las diferentes isoformas del HLA-G en las CT obtenidas de los cultivos celulares a partir de las muestras de pacientes con CRCC. En las dos zonas tumorales analizadas, periférica y central, también hemos encontrado diferencias en las isoformas del HLA-G presentes.

## 6 Resultados. Segunda parte

Análisis de los posibles efectos generados por la aplicación de células madre mesenquimales de cordón umbilical humano (CMM-CU) en el microambiente tumoral de CRCC.

Estudio de la relación entre las CMM-CU y las CT obtenidas de cultivos primarios de muestras de pacientes con CRCC.

### 6.1 Caracterización de las CMM-CU a través del análisis de marcadores de superficie mediante CF

Para analizar la identidad de las CMM-CU, se midieron marcadores específicos de superficie de las células obtenidas de los cordones umbilicales a diferentes pasajes, 2, 3 y 5 (n=3). Estas células expresaron fuertemente los marcadores clásicos CD90, CD73 y CD105. También se tiñeron positivamente con otros marcadores conocidos, incluidos CD98, CD44 y la integrina CD29. Además, fueron negativas para varios marcadores de superficie celular, incluidos CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a y HLA-DR. (Figura 6.1)

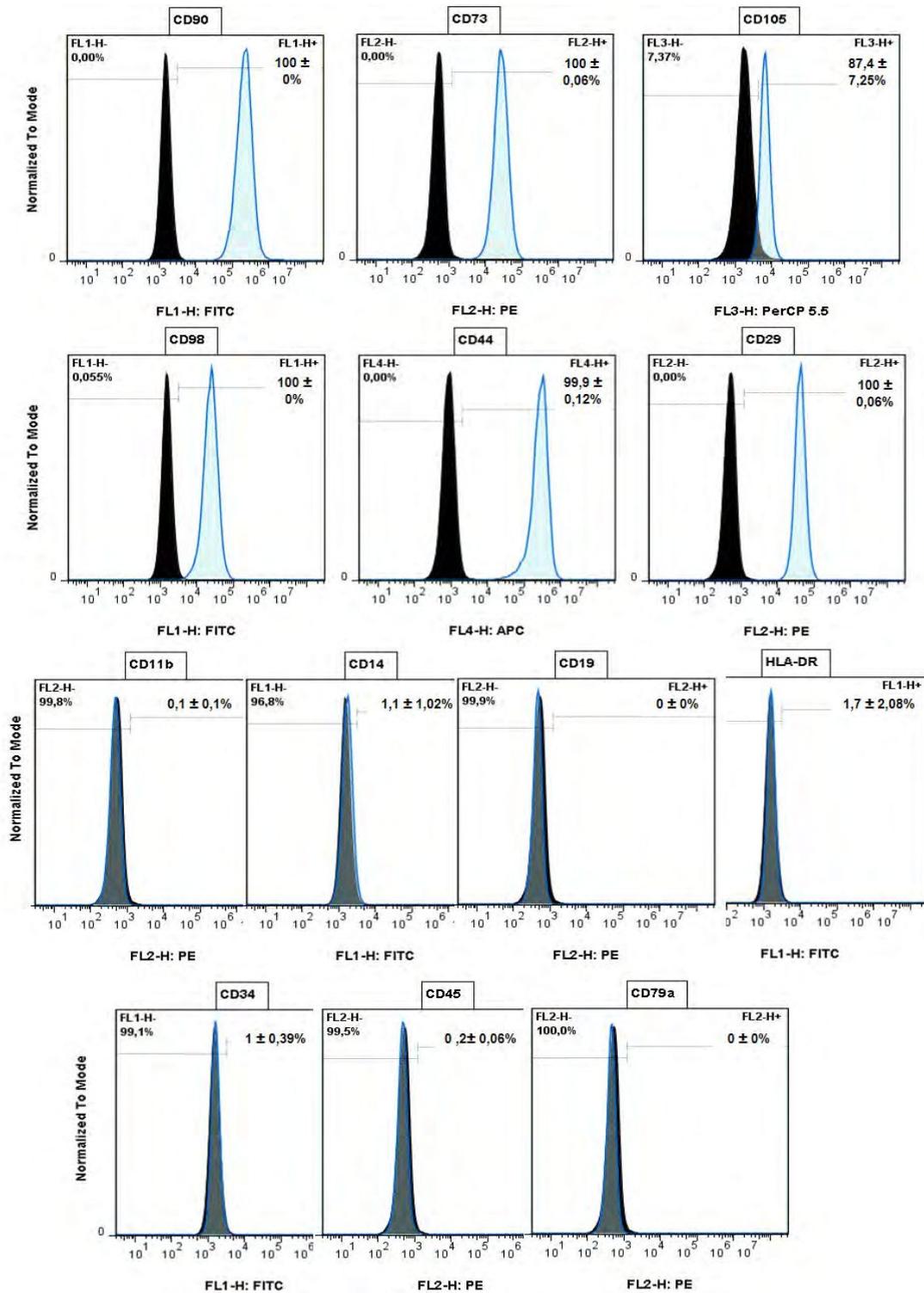
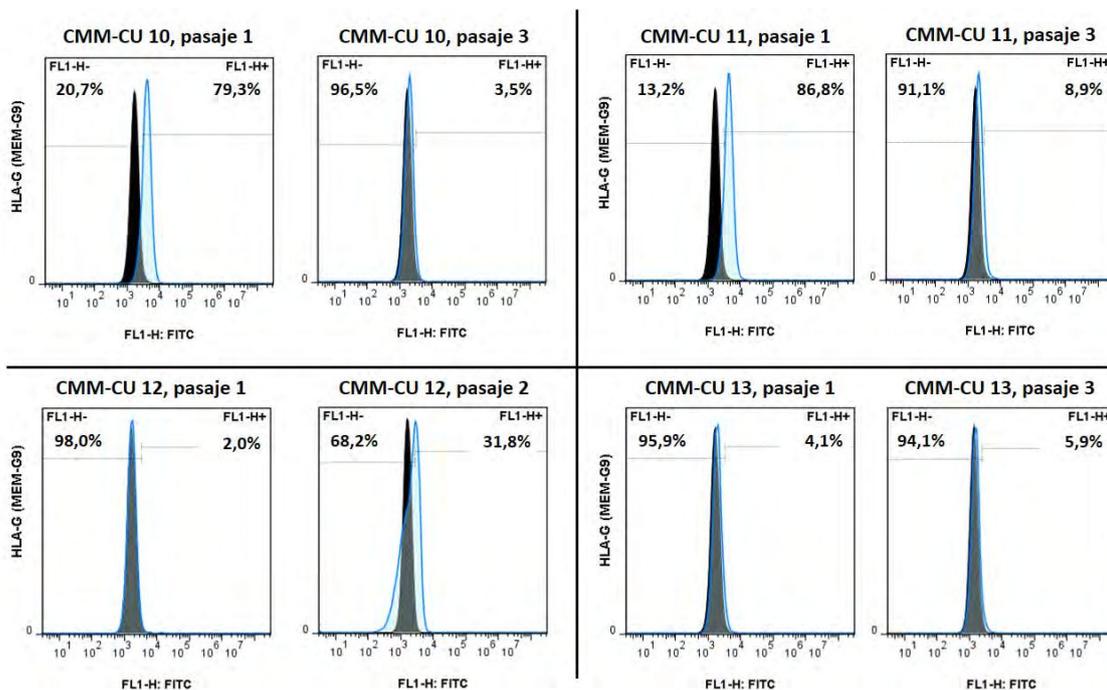


Figura 6.1: Análisis mediante CF de las CMM-CU. Se midieron los marcadores de superficie CD90, CD73, CD105, CD98, CD44, CD29, CD11a, CD14, CD19, HLA-DR, CD34, CD45 y CD79a. En negro se muestran los controles de isotipo y en celeste las CMM-CU de interés. Se detalla el promedio de CMM-CU positivas  $\pm$  SEM, de n=3.

## 6.2 Evaluación de la presencia de HLA-G en las CMM-CU

Se determinó la expresión de la proteína HLA-G en la superficie de las CMM-CU mediante CF con el anticuerpo MEM-G9/FITC. Como se sabe que ciertos marcadores pueden dejar de expresarse a lo largo de los pasajes celulares durante su crecimiento en cultivo, se utilizaron células en el pasaje 1 y 3. En la figura 6.2, se observa que las CMM provenientes de los cordones 10 y 11 fueron positivas para el HLA-G en el pasaje 1, pero perdieron la expresión en el pasaje 3. Mientras que las CMM de los cordones 12 y 13 no expresaron la proteína en ninguno de los pasajes. Por lo que se encontró que el 50% de las muestras de cordón umbilical fueron positivas para este marcador.

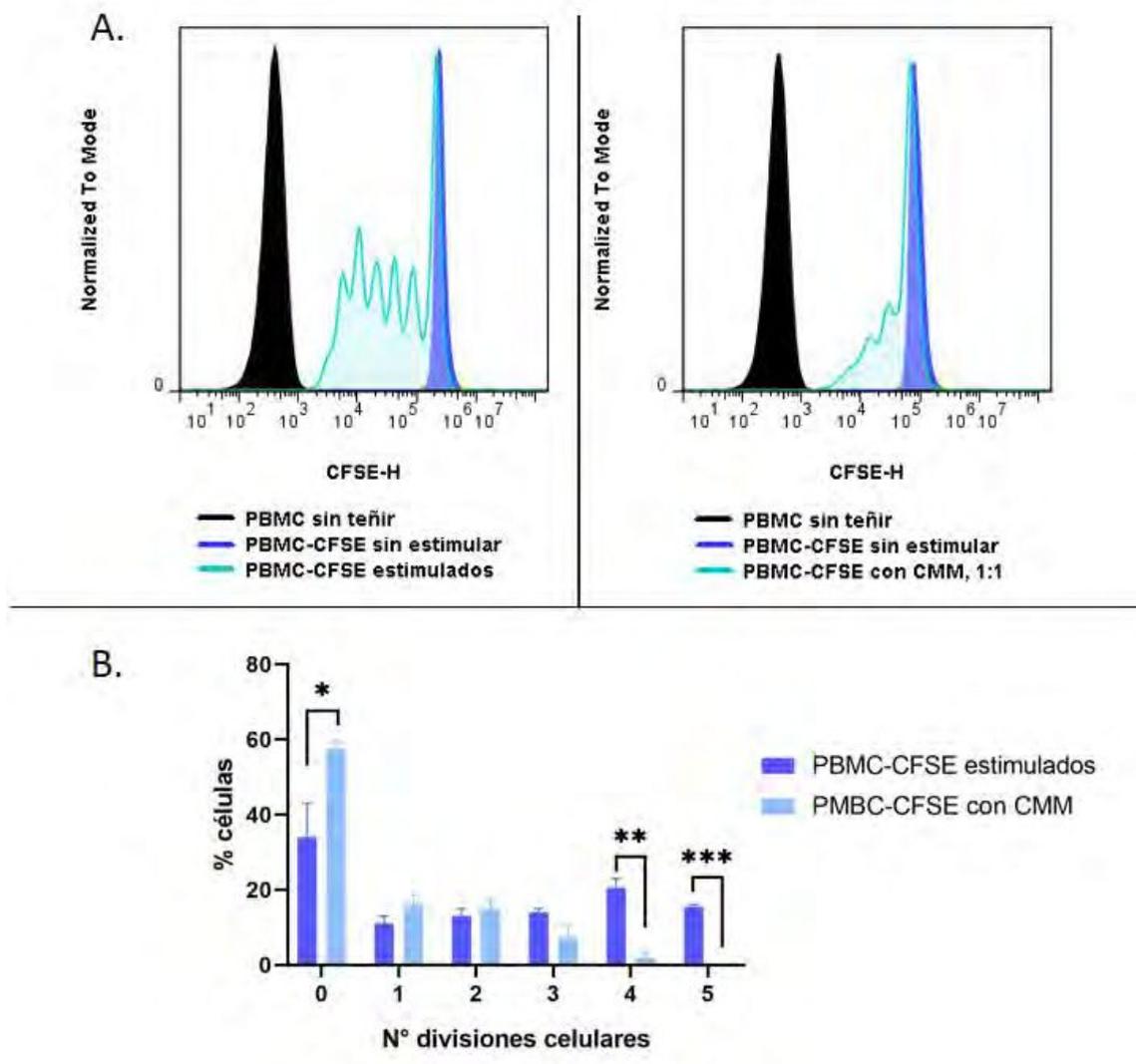


**Figura 6.2:** Análisis de la expresión del HLA-G mediante CF sobre las CMM obtenidas de 4 cordones umbilicales, en los pasajes celulares 1 y 3. En negro se muestran los controles de isotipo y en celeste las CMM-CU de interés.

### **6.3 Estudio del efecto inmunomodulador de las CMM-CU sobre linfocitos activados obtenidos de sangre periférica en un ensayo *ex vivo***

Las CMM-CU poseen una gran capacidad inmunomoduladora ya que interactúan con las células inmunes e inhiben su proliferación. Esto lo logran mediante la liberación de factores al medio de cultivo y por la presencia de ciertas moléculas de superficie, como por ejemplo el HLA-G, entre otras.

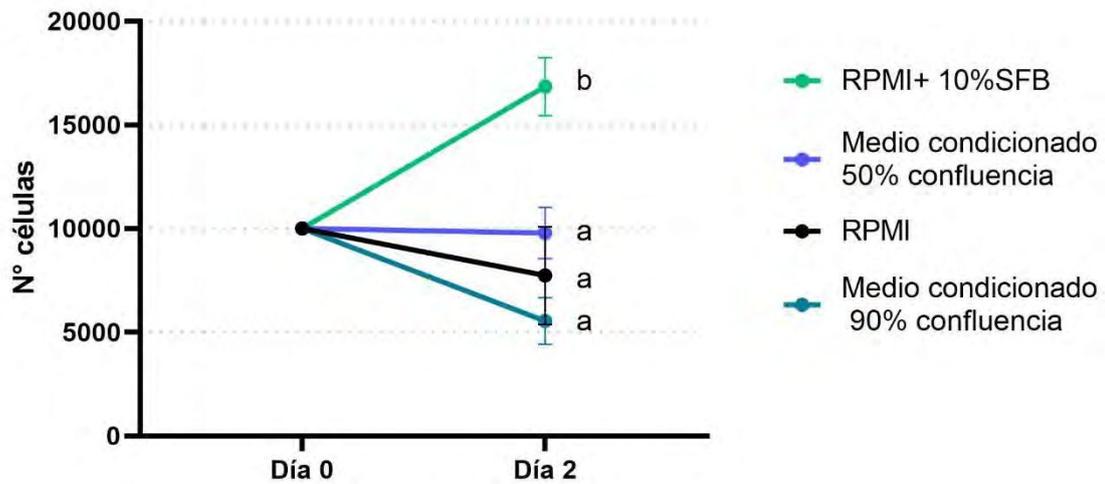
Para evaluar este efecto inmunomodulador, se cultivaron las CMM-CU junto con linfocitos activados obtenidos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, de sus siglas en inglés) previamente teñidos con el colorante CFSE que se divide a la mitad con cada división celular. Luego de 4 días de co-cultivo se procedió a la medición del CFSE mediante CF. Cuando las PBMC activadas se cultivaron solas, se observaron hasta 5 divisiones celulares y solo el 34% de las células permanecieron sin dividirse. Mientras que, cuando las PBMC activadas se expusieron a las CMM-CU, no solo disminuyó el número de divisiones celulares a 3, sino que además aumentó significativamente la cantidad de células que permanecieron sin dividirse a un 58% ( $p < 0,05$ ). Con estos resultados podemos observar que la presencia de las CMM-CU provocó una importante reducción en la proliferación de linfocitos.



**Figura 6.3:** Ensayo de inmunomodulación. **A-** Histogramas de un experimento representativo donde se muestra en negro a las PBMC sin teñir, en violeta a las PBMC teñidas con CFSE y en celeste a las PBMC teñidas y estimuladas solas (panel izquierdo) o en co-cultivo con las CMM-CU (panel derecho). Cada pico que se observa en el histograma celeste representa el número de divisiones celulares: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 divisiones (de derecha a izquierda). **B -** Se muestra el número de divisiones celulares obtenidas para cada condición: PBMC estimuladas en ausencia de CMM-CU (violeta) y PBMC estimuladas en co-cultivo con las CMM-CU (ceste). Se muestran diferencias significativas entre los porcentajes de células sin dividirse (\*  $p<0,05$ ) y a partir de la cuarta división celular (\*\*  $p<0,01$ ).

#### **6.4 Co-cultivo de las CMM-CU y las CT obtenidas de muestras de pacientes con CRCC. Ensayo de proliferación celular.**

Como se mencionó anteriormente, varias investigaciones han propuesto utilizar a las CMM-CU como vehículo de drogas antitumorales en tratamientos oncológicos, pero para ello se debe tener en cuenta que estas células liberan gran cantidad de factores de crecimiento a su entorno, lo cual podría influir en el crecimiento tumoral. Para evaluar si existe una interacción entre las CMM-CU y las CT crecidas a partir de las muestras de pacientes con CRCC, se realizó un ensayo de proliferación celular. Se incubaron por 48 horas las CT con medios condicionados por las CMM-CU, los cuales poseen los factores de crecimiento que éstas liberan. Cuando las CT crecieron en el medio RPMI suplementado con 10% de SFB, el cual posee una alta concentración de hormonas y factores, presentaron una mayor proliferación con respecto a las CT crecidas en RPMI solo, sin ningún factor de crecimiento añadido al medio ( $p < 0,05$ ). Cuando se incubaron las CT con el medio condicionado obtenido de CMM-CU crecidas a un 50% de confluencia celular se observó un estímulo en la tasa de proliferación celular, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas cuando las comparamos con las CT crecidas en RPMI solo ( $p = 0,08$ ). Por último, cuando incubamos a las CT con el medio condicionado obtenido de CMM-CU crecidas a un 90% de confluencia, la proliferación celular fue muy similar a la obtenida cuando se las incubó con RPMI solo ( $p = 0,50$ ).



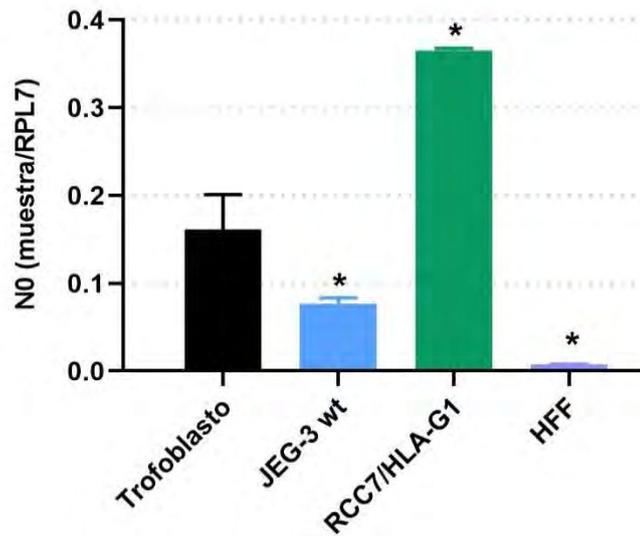
**Figura 6.4:** Ensayo de proliferación celular. Se muestran las CT crecidas en las diferentes condiciones: en RPMI solo, en RPMI +10% SFB, en el medio condicionado por las CMM-CU a un 50% y a un 90% de confluencia. Al día 0 se partió de un número inicial de 10.000 células, y al día 2 se muestra la cantidad de células obtenidas luego de haber sido incubadas en las distintas condiciones.

## 7 Resultados. Tercera parte

Silenciamiento del antígeno HLA-G mediante el sistema CRISPR/Cas9 de edición génica en líneas celulares tumorales establecidas.

### 7.1 Expresión del HLA-G en las líneas celulares JEG-3 y RCC7/HLA-G1

En primer lugar se chequeó la expresión del HLA-G en las líneas celulares a utilizar en los experimentos de edición génica. Mediante RT-qPCR se midieron los niveles de expresión de la proteína en las JEG-3 (línea celular derivada de un coriocarcinoma) y en las RCC7/HLA-G1 (línea celular de carcinoma de células renales que expresa HLA-G1) y se compararon con los niveles de expresión que poseen las células de trofoblasto (vellosidades coriónicas extraídas de placenta a término). Como control negativo se utilizaron fibroblastos humanos (HFF), que no expresan la proteína de interés. Como se observa en la figura 7.1, ambas líneas celulares tumorales expresaron valores superiores de HLA-G con respecto al control negativo. Si bien ambas poblaciones celulares fueron HLA-G +, podemos observar que las JEG-3 presentaron un valor de expresión 50% menor que las células de trofoblasto, mientras que las RCC7/HLA-G1 presentaron un valor de expresión mayor que las células de trofoblasto.

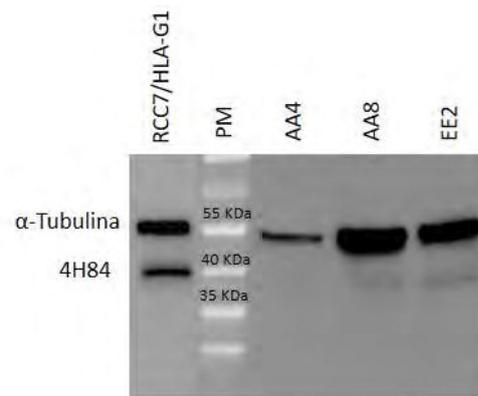


**Figura 7.1:** Niveles de expresión del ARNm de HLA-G en las células de trofoblasto, en las JEG-3 de tipo salvaje (JEG-3 wt), en las RCC7/HLA-G1 y en las HFF. Se grafica el número medio de partículas de ARNm iniciales normalizadas con la expresión constitutiva de RPL7  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas se muestran con \* ( $p < 0.05$ ).

## 7.2 Transfección del sistema CRISPR/Cas9 en la línea celular RCC7/HLA-G1

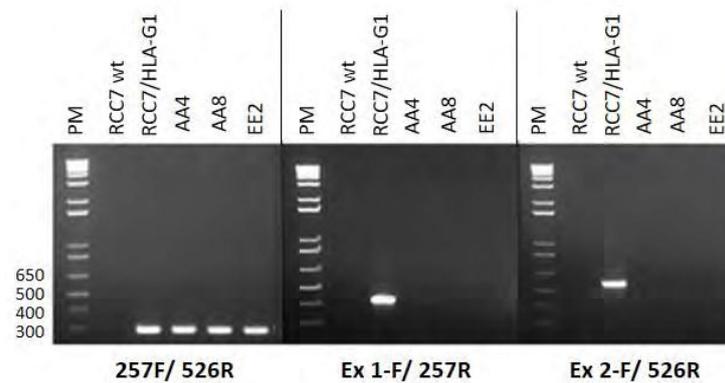
La línea celular RCC7, la cual posee integrado en su genoma un lentivirus con la secuencia de la isoforma HLA-G1, se transfectó con el vector pSpCas9 clonado con el ARNg-2A que se dirige a la región del exón 2 (Figura 4.1, en materiales y método). Se obtuvieron cien líneas celulares clonales después de la clasificación celular con el citómetro FACSaria III.

Mediante WB se determinó la expresión de la proteína HLA-G en varios clones seleccionados (AA4, AA8 y EE2) y se compararon con el RCC7/HLA-G1 sin editar. Se vió que la mayoría de los clones transfectados con el ARNg-2A no expresaron HLA-G, mientras que las RCC7/HLA-G1 mostraron una alta expresión de la proteína (Figura 6.2).

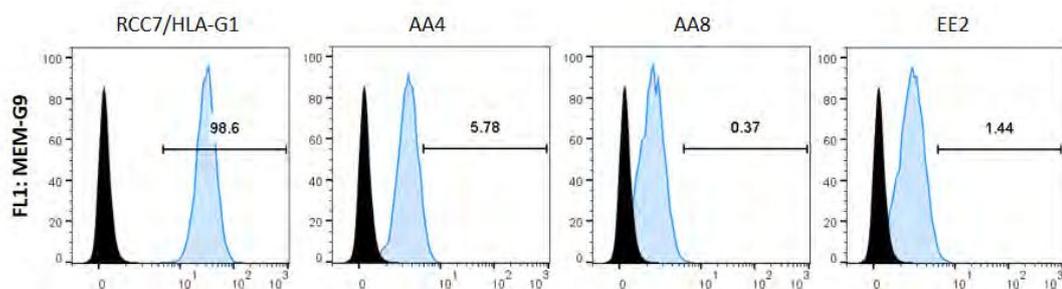


**Figura 6.2:** Nivel de expresión del HLA-G medido por WB (anticuerpo 4H84) en líneas celulares clonales editadas con el ARNg-2A (derecha). A la izquierda se muestra la línea RCC7/HLA-G1, como control de expresión del HLA-G. Se utiliza la  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

Luego se analizaron las modificaciones que se produjeron a nivel del ARNm mediante el uso de tres combinaciones de cebadores que se dirigen al exón 1, exón 2 y a los exones 3 y 4. La línea celular RCC7/HLA-G1 sin editar, mostró amplificación con los tres pares de cebadores, obteniendo las bandas del peso molecular esperado. En el caso de los clones editados, no se pudo obtener amplificación usando los cebadores complementarios a los exones 1 o 2, mientras que sí se obtuvo la banda esperada de 290 pb con los cebadores ubicados en los exones 3 y 4 (257F/526R), los cuales se encuentran aguas abajo de la secuencia diana del ARNg-2A (Figura 7.3). Luego, se determinó el nivel proteico de HLA-G sobre la superficie de los tres clones mediante CF, para una mejor cuantificación. Los resultados mostraron que el 94,2%, 99,6% y 98,5% de las células de cada clon respectivamente fueron negativas para el HLA-G (Figura 7.4).



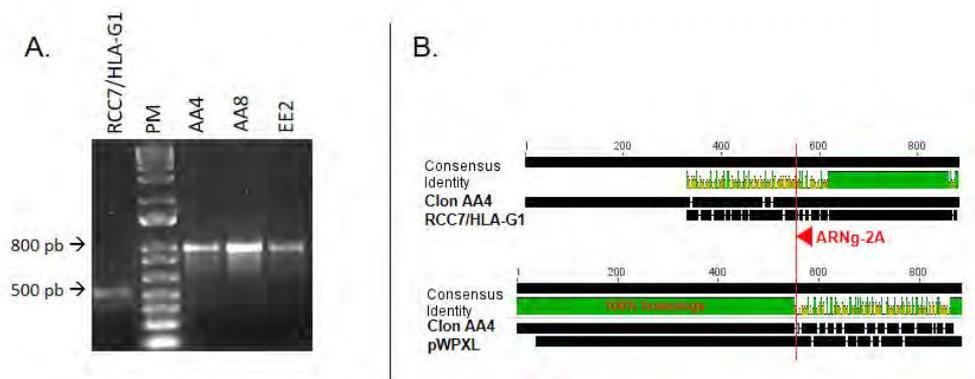
**Figura 7.3:** Nivel de expresión del ARNm del HLA-G, medido por RT-PCR. Se utilizó el marcador de PM de 1kb.



**Figura 7.4:** Medición de la proteína HLA-G mediante CF (anticuerpo MEM-G9/FITC). En negro se muestra el control de isotipo y en celeste las células en cuestión.

En última instancia, ya habiendo corroborado que las líneas celulares clonales no expresaban HLA-G, se procedió a identificar las modificaciones genómicas que ocurrieron luego de la transfección del sistema CRISPR/Cas9 con el ARNg-2A. Para ello, la región editada del ADNg fue amplificada por PCR usando los cebadores CRR1F/257R, obteniendo en todos los clones un amplicón de 800 pb, el cual es 300 pb más largo que el fragmento esperado de 500 pb (Figura 7.5A). Para determinar el origen de esta inserción de 300 pb que se produjo en cada uno de los clones, se secuenciaron los fragmentos. La alineación entre las RCC7/HLA-G1 sin editar y

las secuencias obtenidas de las líneas celulares clonales editadas reveló que la inserción de 300 pb correspondía a un fragmento de ADN derivado del vector lentiviral pWXPL, el cual se había utilizado para clonar el ADNc del HLA-G1 (Figura 7.5B).



**Figura 7.5:** A- Amplificación del ADNg mediante PCR. Se utilizó el marcador de PM de 1kb. B- Alineamiento de secuencia de las RCC7/HLA-G1 sin editar vs el clon AA4, y del clon AA4 vs el vector lentiviral pWXPL. La flecha roja indica el sitio diana del ARNg-2A, y la línea roja muestra el sitio de corte de la proteína Cas9. <http://www.geneious.com>.

En general, estos resultados demuestran que el ARNg-2A fue capaz de reconocer la secuencia de la proteína y lograr una muy baja expresión del HLA-G, aunque el mecanismo por el cual lo hace es utilizando parte de la secuencia del lentivirus como molde para reparar e introducir la inserción genómica.

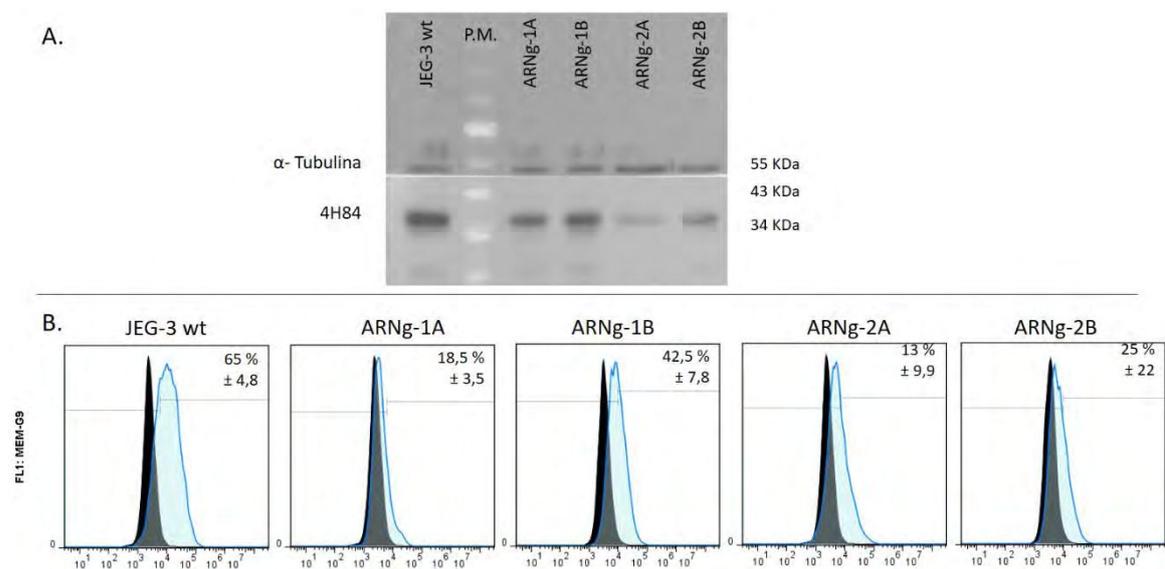
### 7.3 Transfección del sistema CRISPR/Cas9 en la línea celular JEG-3

Teniendo en cuenta la interferencia que generó el vector lentiviral, el cual estaba integrado en el genoma de las RCC7/HLA-G1, en la reparación del ADNg luego de haber sido cortado por la endonucleasa Cas9, se decidió realizar la técnica de edición

génica sobre la línea celular de coriocarcinoma, JEG-3, que naturalmente expresa todas las isoformas del HLA-G.

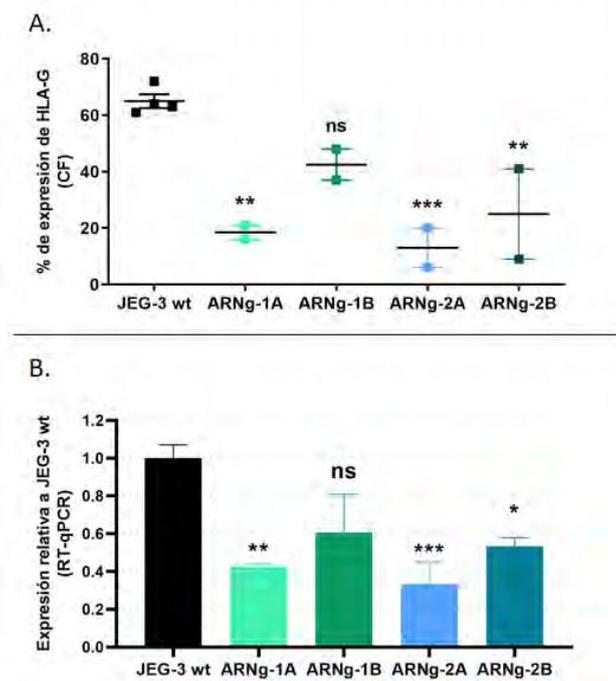
Además, para tener una mejor idea de la regulación del gen *hla-g* y asegurar el bloqueo de todas las isoformas, se diseñaron tres ARNg adicionales, denominados ARNg-1A, -1B y -2B. La Figura 4.1 (de materiales y método) muestra los cuatro ARNg diseñados, 1A y 1B que se dirigen aguas arriba del ATG situado en el exón 1 y los ARNg-2A y -2B que se dirigen aguas arriba del ATG situado en el exón 2. La línea celular JEG-3 se transfectó con el vector pSpCas9 clonado con cada uno de los ARNg y luego se analizó de la siguiente manera.

En primer lugar, se midió la expresión del HLA-G mediante WB y CF en las células JEG-3 editadas. Ambas técnicas revelaron que se logró disminuir la expresión del HLA-G en diferentes proporciones según el ARNg utilizado (1A, 1B, 2A o 2B) (Figura 7.6).



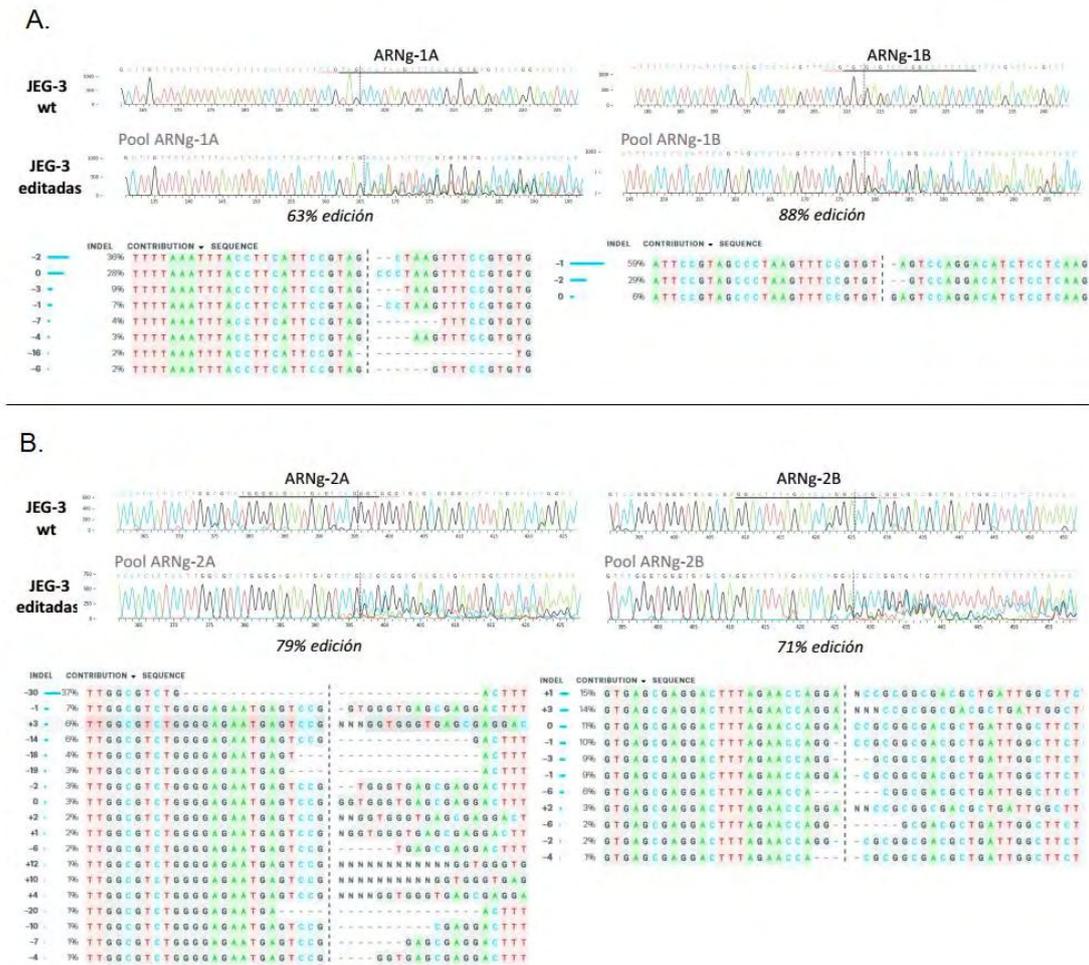
**Figura 7.6:** Medición de la proteína HLA-G: **A-** Mediante WB (anticuerpo 4H84). Se utiliza la  $\alpha$ -tubulina como control de carga. **B-** Mediante CF (anticuerpo MEM-G9/FITC). En negro se muestra el control de isotipo y en celeste las células en cuestión.

Al comparar los valores obtenidos en las células editadas con los valores de las JEG-3 de tipo salvaje (wt), la proporción de reducción del HLA-G observada mediante CF fue del 72%, 35%, 80% y 62% para 1A, 1B, 2A y 2B, respectivamente (Figura 7.7 A). Además, el análisis transcriptómico por RT-qPCR con cebadores ubicados hacia el extremo 3' del sitio de inicio ATG (257F/526R) confirmó estos resultados, ya que se encontró una reducción del ARNm de HLA-G del 60%, 40%, 65% y 55% para 1A, 1B, 2A y 2B, respectivamente (Figura 7.7 B; los datos de las células editadas se relativizaron con los datos obtenidos para las células sin editar, JEG-3 wt).



**Figura 7.7:** A- Nivel de expresión de la proteína HLA-G determinado por CF. B- Nivel del ARNm de HLA-G medido por RT-qPCR, los valores obtenidos para las JEG-3 editadas con los diferentes ARNg se relativizaron a la expresión de las JEG-3 sin editar (wt). Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) se muestran con \* y las no significativas con ns.

Finalmente, se analizaron las secuencias genómicas del HLA-G en las células JEG-3 editadas con cada ARNg para determinar qué modificaciones ocurrieron. Las PCR se realizaron utilizando el par de oligonucleótidos CRD1 F/R para amplificar la región del genoma del exón 1 y el par Ex1 F/257 R para amplificar la región del genoma del exón 2. Utilizando la herramienta ICE de Synthego, se determinó el porcentaje de edición comparando las JEG-3 editadas con la secuencia de las JEG-3 wt. Observamos que efectivamente se editó el genoma en todos los casos. Se produjeron diferentes InDels con cada ARNg, con una tasa acumulativa de modificación del genoma del 63%, 88%, 79% y 71% para cada ARNg-1A, -1B, -2A y -2B, respectivamente (Figura 7.8 A y B).

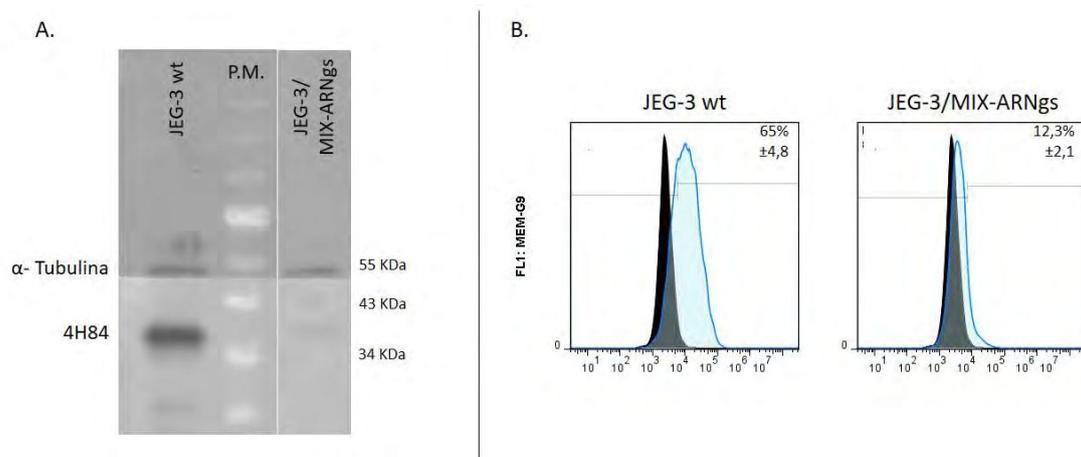


**Figura 7.8:** Análisis de la secuenciación. Se muestran los histogramas con los datos de secuencia de nucleótidos de las JEG-3 wt y de las JEG-3 editadas con cada ARNg- 1A o -1B (A), y -2A o -2B (B). Además se muestran posibles genotipos editados, predichos mediante un análisis de InDels (<https://www.ice.synthego.com/>) y el porcentaje total de edición para cada condición.

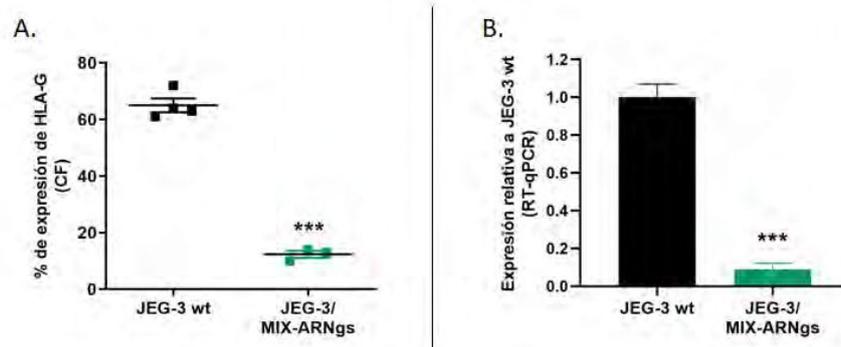
En resumen, los cuatro ARNgs han sido capaces de reconocer la secuencia genómica diana y se ha logrado modificar las regiones de interés. La edición generada se correlaciona con una disminución de la expresión del HLA-G tanto a nivel transcriptómico como proteico.

#### 7.4 Transfección del sistema CRISPR/Cas9 con los 4 ARN guías simultáneamente en la línea celular JEG-3.

Los resultados mencionados mostraron que la expresión del HLA-G se redujo, pero no se logró silenciar por completo cuando se utilizó cada ARNg por separado. Con el objetivo de encontrar una línea celular con un silenciamiento completo del HLA-G, se transfectaron las células JEG-3 con los 4 ARNg simultáneamente (condición que llamamos JEG-3/MIX-ARNgs). El nivel del ARNm de HLA-G (medido por RT-qPCR) y la expresión de la proteína (medida por WB y por CF) se redujeron en un 90% en las JEG-3/MIX-ARNgs con respecto a las células JEG-3 wt (Figura 7.9 y 10). Estos resultados nos indican que la expresión del HLA-G se alteró completamente, tanto a nivel transcriptómico como proteico.

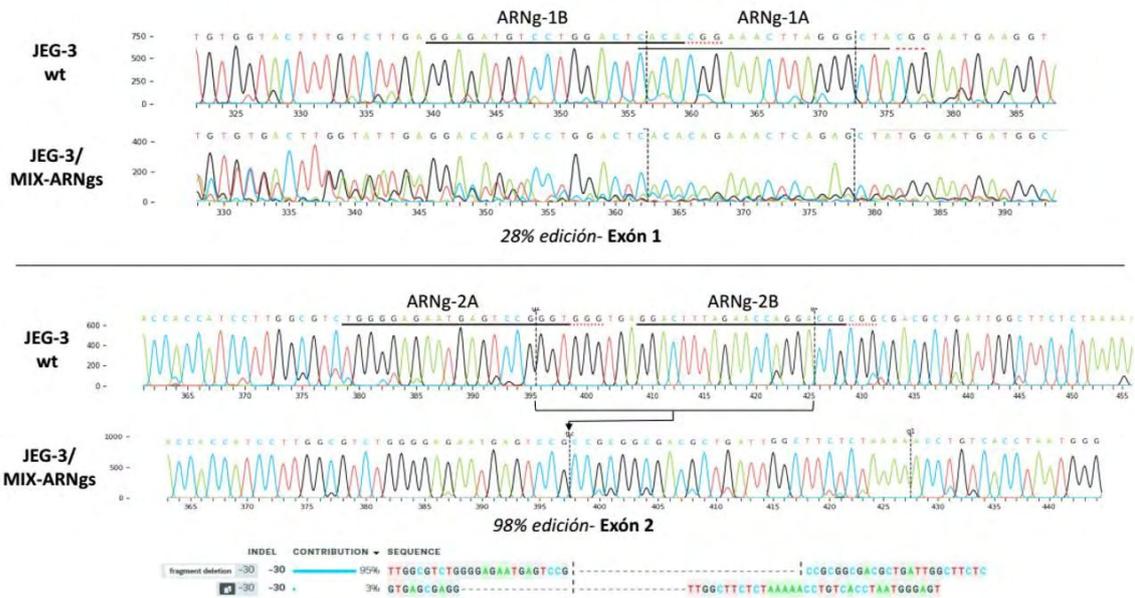


**Figura 7.9:** Medición de la proteína HLA-G: A- Mediante WB (anticuerpo 4H84). Se utiliza la  $\alpha$ -tubulina como control de carga. B- Mediante CF (anticuerpo MEM-G9/FITC). En negro se muestra el control de isotipo y en celeste las células en cuestión.



**Figura 7.10:** A- Nivel de expresión de la proteína HLA-G determinado por CF. B- Nivel del ARNm de HLA-G medido por RT-qPCR, los valores obtenidos para las JEG-3 editadas con los 4 ARNgs en simultáneo (JEG-3/Mix-ARNgs) se relativizan a la expresión de las JEG-3 sin editar (wt). Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) se muestran con \*\*\*.

Al analizar las secuencias genómicas, se vio que efectivamente en el 98% de los casos las células presentaron modificaciones en el gen *hla-g*. De hecho, se observó una delección de 30 pb en el exón 2 entre los sitios diana de los ARNg 2A y 2B (Figura 7.11). La gran modificación del genoma concuerda con la reducción significativa de la expresión del HLA-G.

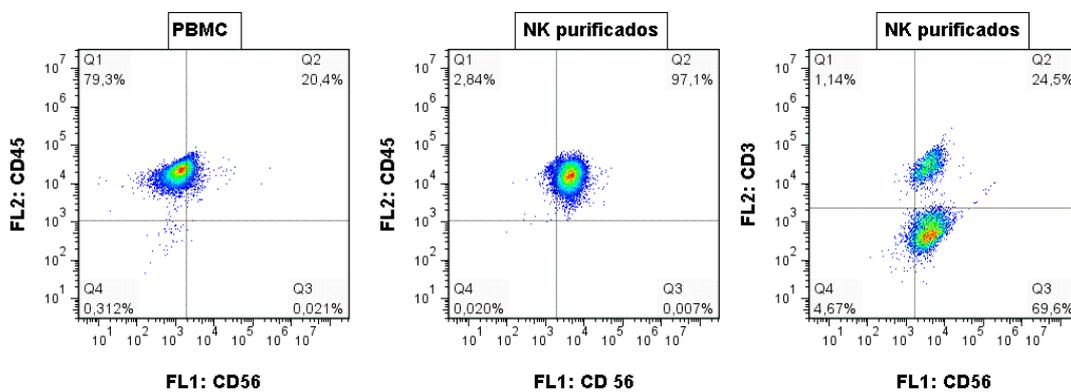


**Figura 7.11:** Análisis de la secuenciación. Se muestran los histogramas con los datos de secuencia de nucleótidos de las JEG-3 editadas con los 4 ARNs simultáneamente (1A, 1B, 2A y 2B). Se observan las modificaciones que ocurrieron tanto en el exón 1 como en el 2 y los posibles genotipos editados, predichos mediante un análisis de InDels (<https://www.ice.synthego.com/>) y el porcentaje total de edición.

## 7.5 Ensayo de degranulación de las células NK en co-cultivo con células JEG-3 sin editar (HLA-G +) y con las JEG-3 editadas (HLA-G -)

Una de las principales funciones del HLA-G es la inhibición de la degranulación de las células NK. Este proceso se puede medir detectando la expresión de la proteína 1 de membrana asociada al lisosoma (LAMP-1 o CD107a) en la superficie celular de las NK. Como consecuencia del proceso de degranulación, la membrana externa de los gránulos internos se fusiona con la membrana plasmática de las células NK, lo que conduce a la exposición superficial de las moléculas de CD107a. El ensayo consistió en co-cultivar a las NKs con las células JEG-3 sin editar, wt (HLA-G +) y con las JEG-3 editadas, MIX-ARNgs (HLA-G -) y medir mediante CF al CD107a.

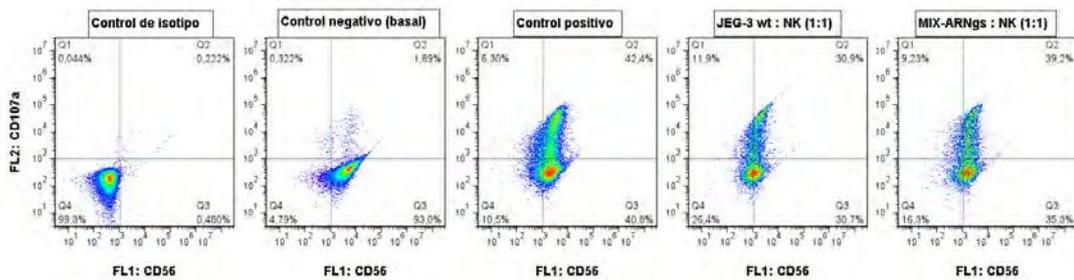
En primer lugar, se analizó la identidad de las células NK purificadas a partir de PBMC mediante CF con los anticuerpos anti-CD45/PE, anti-CD56/BB515 y anti-CD3/PE. El 97,1% de estas células fueron CD45 (+) y CD56 (+), y más del 60% de las células CD56 (+) fueron CD3 (-), lo que se corresponde con las NK. La población CD56 (+) y CD3 (+) correspondió a linfocitos T  $\gamma$   $\delta$  [90] (Figura 7.12).



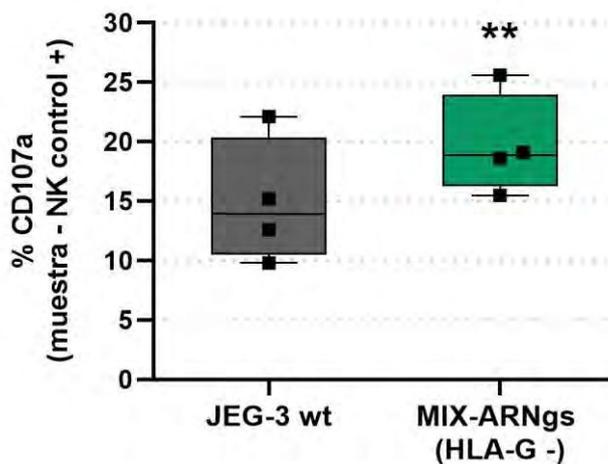
**Figura 7.12:** Análisis de la purificación de las NK obtenidas a partir de las PBMC. Las NK se tiñeron con anti-CD45/PE, anti-CD56/BB515 y anti-CD3/PE y se compararon con las PBMC.

Luego, se midió la presencia de CD107a en la superficie celular de las NK. Se realizaron dos tipos de controles: un control negativo que incluye NKs sin el co-cultivo con células diana y sin añadir el cóctel de estimulación, para analizar la degranulación basal, y un control positivo que incluye NKs sin el co-cultivo con las células diana pero en presencia del cóctel de estimulación, para activar el proceso de degranulación espontánea (Figura 7.13) . Por último se incubaron las NK con las células diana (HLA-G + y -) y se midió la proteína CD107a en su superficie. Los resultados encontrados mostraron que el 19,7% de las NK co-cultivadas con las células editadas HLA-G - (JEG-3/MIX-ARNgs) expresaron CD107a, mientras que

solo el 14,9% de las NK que se cultivaron con las células sin editar HLA-G + (JEG-3 wt) expresaron CD107a en su superficie ( $p < 0,01$ ) (Figura 7.14). Esto indica que hubo un aumento de la degranulación de NK del 4,8% cuando estas fueron cultivadas conjuntamente con las células editadas que no expresan HLA-G.



**Figura 7.13:** Ensayo de degranulación, co-cultivo de las NK con las células sin editar JEG-3 wt (HLA-G +) o con las células editadas JEG-3/MIX-ARNgs (HLA-G -). Se muestra a las NK teñidas con CD107a/PE y CD56-BB515 en un ensayo representativo, las cuales fueron sometidas a diferentes condiciones: control de isotipo (NKs sin anticuerpo), control negativo (degranulación basal de las NK), control positivo (NKs estimuladas), y por último NKs co-cultivadas con JEG-3 wt o con JEG-3/Mix-ARNgs.



**Figura 7.14:** Gráfico de cajas y bigotes que muestra el % de células NK CD107a + cuando fueron co-cultivadas con las JEG-3 wt (HLA-G +) o con las JEG-3/Mix-ARNgs (HLA-G -). Las diferencias significativas se muestran con \* ( $p < 0,05$ ) ( $n = 4$ ).

## 8 Discusión

El CRCC es una neoplasia con un gran potencial de crecimiento, invasividad y malignidad, inclusive antes de manifestarse clínicamente. Éste carcinoma es resistente a los tratamientos oncológicos habituales, como la quimio y la radioterapia, por lo que estudiar y conocer su biología tumoral es de gran importancia en el ámbito clínico para encontrar nuevas opciones terapéuticas.

Debido al abundante desarrollo vascular que presenta el CRCC, en la actualidad, se están realizando ensayos clínicos con nuevas terapias que de alguna manera impiden el proceso angiogénico mediante el uso de anticuerpos monoclonales que bloquean la acción del VEGF-A o de su principal receptor, el VEGFR-2. Además, recientemente ha surgido la inmunoterapia como una opción atractiva y prometedora contra el cáncer, la cual se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales que, al bloquear ciertos PCI, mejoran la función de los linfocitos T antitumorales. Se han aprobado muchas inmunoterapias en varios tipos de cánceres, como el melanoma, el de pulmón y el CR [67], [91], [92]. Sin embargo, estas prácticas han demostrado una eficacia limitada y una proporción considerable de pacientes no respondieron a estos tratamientos.

En base a lo planteado, en el presente trabajo de tesis nos hemos enfocado en estudiar la biología del CRCC a partir de muestras obtenidas de pacientes. Específicamente, hemos analizado la expresión de marcadores involucrados en los procesos angiogénicos y el PCI HLA-G/ILTs como posible estrategia tumoral para evadir la acción del sistema inmune. Además, debido a la importancia de encontrar nuevos enfoques para el tratamiento oncológico hemos decidido estudiar dos

propuestas: la edición génica del HLA-G y el uso de CMM-CU como mediadoras de la vehiculización de drogas antitumorales.

## 8.1 Primera parte

**Análisis de la expresión del punto de control inmunológico HLA-G/ILT4 y su posible relación con la expresión del principal inductor de la angiogénesis, el VEGF-A, en muestras de pacientes diagnosticados con CRCC.**

Hemos utilizado 20 muestras de pacientes con diagnóstico de CRCC, cedidas por el Servicio de Urología del Hospital “Evita Pueblo” luego de la cirugía. Las muestras derivaron de 15 pacientes masculinos y 5 femeninos, es decir una relación 3:1. Si bien está reportado que el CRCC afecta en mayor proporción al género masculino que al femenino, en la mayoría de las estadísticas se observa una relación 2:1 o incluso algo menor en países desarrollados [22]. Según propone Colaci en su trabajo de tesis [93], quien trabajó con muestras donadas por el mismo hospital, este aumento observado en la incidencia sobre la población masculina podría deberse a que las muestras de tumores fueron obtenidas de un hospital del conurbano bonaerense, en donde abundan fábricas cuyos trabajadores en su mayoría son hombres que sufren exposición prolongada a las sustancias carcinogénicas que allí se producen.

La edad promedio de los pacientes operados fue de 59 años, encontrándose al 55% de los pacientes comprendidos en el rango etario entre los 50 y 59 años. Esta proporción es consistente con los valores estadísticos esperados para esta neoplasia, la cual es altamente agresiva y afecta a gente relativamente joven [94], [95].

Durante la cirugía, los médicos urólogos colectaron información sobre el estado de infiltración que presentaba el tumor, clasificándolo según si invadía la cápsula renal, la vena renal, los tejidos perirrenales o no invadía ningún tejido adyacente. Estos datos fueron correlacionados con la supervivencia del paciente y el desarrollo de metástasis. Nuestros resultados concuerdan con los datos reportados en la bibliografía, en donde los pacientes que poseen infiltración de la vena renal o de tejidos perirrenales tienen un pronóstico desfavorable, poseen una sobrevida menor a 5 años y mayores riesgos de desarrollar metástasis [96], [97]. Si bien solo 4 del total de pacientes presentaron infiltración de la vena renal, 3 de ellos desarrollaron metástasis y solamente 1 tuvo una supervivencia mayor a 5 años. Coincidiendo con estos hallazgos, Weiss y col. [98] informaron que la afectación vascular es un predictor independiente de curso clínico desfavorable. No hemos encontrado diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes sin infiltración local comparada con los que presentaron infiltración de la cápsula renal, en ambos casos la sobrevida fue mayor a 5 años y ninguno desarrolló metástasis. Sin embargo, varios estudios afirman que la invasión de la cápsula renal es un factor de riesgo significativo para la recurrencia del carcinoma y la sobrevida mayor a 3 años se reduce un 25% con respecto a pacientes que no presentaron infiltración local [99], [100].

Encontramos una correlación positiva entre el tamaño tumoral (pT) y el grado OMS/ISUP. La estadificación OMS/ISUP contempla al tamaño tumoral como una de las características para realizar la clasificación en estadios, por lo que era de esperar que un mayor pT se corresponda con un mayor grado OMS/ISUP. Como se describió en detalle en la introducción, esta estadificación tiene en cuenta otros parámetros, tales como la invasión de tejidos extrarrenales, la afección de ganglios linfáticos y el desarrollo de metástasis.

Además del análisis clínico-patológico de cada paciente, hemos recibido dos muestras de tejido del CRCC luego de la cirugía, de las cuales una se destinó al procesamiento histológico y la otra para el aislamiento de las CT en el laboratorio de cultivo celular. Las muestras fueron analizadas mediante IHQ o mediante RT-qPCR, para evaluar la expresión de marcadores a nivel proteico y a nivel transcriptómico respectivamente. Los marcadores estudiados están relacionados con la angiogénesis, como son el VEGF-A, el VEGF-C y el CD34, y con la sinapsis inmunológica HLA-G/ILT4. En conjunto, ambos análisis (IHQ y transcriptómico) revelan una significativa expresión de todos los marcadores analizados.

Con respecto al PCI HLA-G/ILT4, hemos encontrado positividad de esta sinapsis ligando/receptor en todas las muestras analizadas, en al menos un área del tumor. Según investigaciones previas, el porcentaje de expresión del HLA-G en biopsias de CRCC se encuentra cercano al 50% [53], [101], lo cual es menor al porcentaje hallado en nuestras muestras tumorales. En la revisión llevada a cabo por Loustau y col. acerca del rol de la expresión del HLA-G en tumores sólidos, se detalla con gran exactitud de qué manera esta proteína logra suprimir a las células del sistema inmune durante los tres estadios del crecimiento tumoral (eliminación, equilibrio y escape), por lo que su participación y relevancia en el escape inmunológico es fundamental para el éxito tumoral [62]. La extensa expresión hallada de este PCI en todas las muestras analizadas concuerda con esto.

Al relacionar los niveles de expresión del HLA-G con el grado tumoral, encontramos que éstos resultaron ser más elevados en las muestras de bajo grado OMS/ISUP (1 y 2) que en las de alto grado OMS/ISUP (3 y 4). Esto podría deberse a que los tumores más pequeños podrían ser más vulnerables a ser atacados por el

sistema inmune del hospedador y en consecuencia necesitan varias estrategias para sobrevivir y continuar con su expansión y desarrollo. En cambio, en los tumores de estadios avanzados el crecimiento celular está tan exacerbado que ya no requieren de una alta expresión del HLA-G.

En las CT crecidas en cultivo a partir de las muestras de tumores se determinaron los niveles de ARNm del HLA-G. Aquí nuevamente observamos que todas las muestras analizadas expresaron HLA-G, siendo los niveles de expresión diferentes entre los pacientes. Inclusive, en los casos donde fue posible obtener y estudiar dos fragmentos del mismo tumor, de las zonas central y periférica tumoral, observamos que la expresión también fue variable dentro del mismo paciente. Nuestros hallazgos concuerdan con lo reportado en investigaciones previas, donde destacan la importancia de la heterogeneidad inter- e intra-tumoral y el correlato que podría tener con las fallas terapéuticas observadas en la inmunoterapia [50], [68].

Como mencionamos anteriormente, hemos observado que el receptor ILT4 se expresa en macrófagos estromales, células plasmáticas y linfocitos infiltrantes, en todas las muestras tumorales analizadas por IHQ, presentando una marcación elevada en la mayoría de los casos. Además, hemos medido el nivel de ARNm del ILT4 en las CT crecidas de los cultivos celulares primarios, y encontramos que algunas fueron positivas, por lo que demostramos que este receptor no sólo se expresa en las células inmunes infiltrantes, sino que también está presente en las CT. La expresión del ILT4 ya ha sido reportada en varios tipos de tumores, como es el caso del cáncer de pulmón de células pequeñas y el cáncer de mama [102], [103].

Como resultado a destacar, debemos mencionar que este PCI, HLA-G/ILT4, solamente lo observamos en los tejidos tumorales, mientras que no detectamos su expresión en ninguna de las regiones de tejido renal normal de las muestras recibidas.

En la figura 5.4 de los resultados mostramos que en éstas últimas, mediante IHQ, no se observó marcación con los anticuerpos anti-HLA-G ni anti-ILT4. Además, mediante RT-qPCR mostramos que a nivel transcriptómico las células crecidas de las zonas de tejido renal normal tampoco expresaron HLA-G ni ILT4. Esto era lo esperado ya que esta descrito que en situaciones fisiológicas, el tejido sano circundante no expresa este PCI [104].

Con respecto a los marcadores utilizados para analizar la angiogénesis tumoral, mediante IHQ hemos encontrado expresión del VEGF-A en todas las muestras tumorales en al menos un área, con intensidad variable y un elevado índice de MDV en la mayoría de los casos. Al igual que nosotros, algunos autores informan positividad para el VEGF-A en la totalidad de los CRCC [105]. Al agrupar las muestras según el grado OMS/ISUP, observamos que aquellas de bajo grado (1 y 2) presentan niveles de expresión de VEGF-A más bajos y un índice de MDV promedio mayor que las muestras de alto grado (3 y 4). Esto indicaría una correlación negativa entre ambos marcadores. De igual modo, al evaluar a cada muestra tumoral individualmente vemos que en aquellas donde la expresión de VEGF-A es alta, el índice de MDV es bajo (<20 microvasos/campo), mientras que en aquellas donde la expresión de VEGF-A es baja, el índice de MDV es alto. Estas observaciones podrían explicarse por el hecho de que una región tumoral bien irrigada (es decir, MDV alto) no necesita la formación de nuevos vasos vasculares, por lo que la expresión de VEGF-A por las CT disminuye. Por el contrario, cuando la región tumoral está mal irrigada (es decir, MDV bajo), este microambiente mal oxigenado induce la expresión del factor inducible por hipoxia-1 (HIF) por las CT, lo que estimula directamente la expresión de VEGF-A [10], [106], [107]. Sin embargo, hemos observado que esta

correlación se pierde en los pacientes que han desarrollado metástasis, en donde tanto el índice de MDV como los niveles de VEGF-A son bajos.

El índice de MDV también fue analizado en las muestras donde hemos obtenido fragmentos de la zona tumoral central y periférica, y la marcación hallada se comparó con lo observado en las zonas de tejido renal normal adyacentes al tumor. Los resultados mostraron diferencias entre los índices de MDV de las zonas tumorales con respecto a la zona renal normal, siendo los primeros significativamente superiores. El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos es indispensable para el crecimiento y expansión del tumor, por lo que es razonable encontrar valores de MDV mayores en los tejidos neoplásicos que en el tejido renal normal [27]. Además, las zonas periféricas tumorales presentaron en promedio un índice de MDV más alto que las regiones centrales tumorales, lo cual probablemente se deba a que la zona tumoral periférica tenga células metabólicamente más activas, en constante expansión que requieren de un buen suministro de oxígeno y de nutrientes en el lecho tumoral.

En el análisis transcriptómico del nivel de ARNm del VEGF-A realizado en las CT crecidas en el cultivo celular primario arribamos a las mismas conclusiones. Todas las muestras tumorales cultivadas fueron positivas, mostrando diferentes tasas de expresión, con un valor promedio significativamente mayor al hallado sobre las células obtenidas de los tejidos renales normales. En los casos donde obtuvimos CT de las dos zonas tumorales, central y periférica, observamos que hay heterogeneidad intratumoral. Cabe destacar que la diferencia de expresión del VEGF-A dentro de regiones pertenecientes a un mismo tumor puede explicar las fallas que se observan con los tratamientos anti-angiogénicos, ya que el crecimiento de las CT en las zonas donde no hay expresión de VEGF-A no se vería afectado por el suministro de drogas anti-VEGF-A [31]. Además, mediante RT-qPCR hemos determinado en las CT la

expresión del principal factor de inducción de la linfangiogénesis, el VEGF-C, y encontramos positividad sólo en algunos tumores. Al promediar los resultados de todas las muestras tumorales, tanto los valores positivos como los negativos, no hemos hallado diferencias significativas cuando lo comparamos con los valores obtenidos en las células del tejido normal.

En resumen, según los resultados del análisis de la marcación mediante IHQ podría decirse que el CRCC en los primeros estadios del desarrollo tumoral suele tener una elevada tasa de neoangiogénesis (con índices de MDV > 20 microvasos/campo), por lo que no requiere expresar altos niveles de VEGF-A, y a su vez está generando un ambiente inmunosupresor local gracias a la expresión del HLA-G. En cambio, los tumores en estadios avanzados suelen ser de mayor tamaño, el crecimiento y expansión de las CT se da a una gran velocidad y la neoformación de vasos no logra acompañar esa evolución, por ello el índice de MDV es bajo, se genera hipoxia y se induce la expresión del VEGF-A para estimular la angiogénesis. Se ha descrito además que la hipoxia es un gran inductor de la expresión del HLA-G, mediada por la presencia del HIF-1 $\alpha$  [108], aun así, sorprendentemente, los niveles de HLA-G observados en las muestras analizadas no resultaron ser tan elevados en los tumores de alto grado.

Los cánceres renales sólidos se componen de una mezcla de CT acompañadas por células normales, tanto células del sistema inmune infiltrantes como células del tejido conectivo, principalmente linfocitos y fibroblastos. Esta heterogeneidad celular dificulta los análisis moleculares que se realizan directamente a partir de fragmentos de biopsias. Es por ello que hemos planteado como uno de los objetivos del presente trabajo de tesis, desarrollar cultivos celulares primarios, a partir de las muestras

recibidas de pacientes con CRCC con el fin de aislar a las CT de aquellas células estromales normales.

Las técnicas más utilizadas para la obtención de células a partir de muestras de tejidos tumorales sólidos son la digestión enzimática y la siembra de los tejidos como explantes. Publicaciones previas describen que la técnica de digestión enzimática no es recomendada para el cultivo de CT ya que da como resultado una recuperación deficiente de células viables y una mayor expansión de las células estromales. Es por ello que elegimos utilizar la técnica de siembra de los fragmentos como explantes, la cual es menos traumática para las CT y permite minimizar la contaminación con las células estromales ya que éstas no se desprenden muy fácilmente de la matriz del tejido y no logran migrar hacia la superficie de la placa de cultivo [109].

El crecimiento celular a partir de los explantes se observó cuando el medio de cultivo RPMI fue suplementado con B27 que aporta una combinación de hormonas y factores de crecimiento que lograron satisfacer los requerimientos metabólicos celulares.

A partir de las muestras de tejido renal normal adyacentes al tumor hemos logrado la expansión de células pequeñas, de forma ahusada, con un núcleo redondeado central que se corresponde con el fenotipo de los renocitos normales. El tejido renal posee una baja tasa de renovación celular, sin embargo, estas células fueron las primeras en crecer en los cultivos. Este crecimiento temprano, comparado con el de las CT, probablemente se deba al gran aporte de factores de crecimiento con los que hemos suplementado al medio de cultivo, de hecho en estudios *in vitro* se ha reportado que la exposición a éstos factores activa la proliferación de células del parénquima renal [110], [111].

Las CT crecidas en los cultivos primarios a partir de las muestras de las zonas tumorales central y periférica, presentaron una morfología característica de células neoplásicas. Se observaron células más grandes, irregulares, con abundante citoplasma y núcleo con cromatina más laxa que permite ver uno o más nucléolos. Las CT obtenidas de la zona periférica tumoral crecieron más rápido que las de la zona central tumoral. Como mencionamos anteriormente, en la zona central tumoral obtuvimos mediante IHQ un índice de MDV significativamente menor que en la zona periférica, lo que indica una mala irrigación del tejido y se asocia a un estado metabólico celular menos activo. Esta podría ser la causa de las diferencias observadas en la velocidad de crecimiento entre ambas zonas tumorales. Por otro lado, como mencionamos anteriormente, las CT tardaron significativamente más días en crecer hasta llegar a su primer pasaje celular que las células obtenidas del tejido renal normal. Este retraso observado en la expansión de las CT podría deberse a la presencia de abundantes linfocitos infiltrantes en el tejido tumoral que inhiben y retrasan el crecimiento de éstas.

Una vez obtenidos los cultivos celulares primarios, hemos llevado a cabo una caracterización celular a través del estudio de marcadores de superficie, mediante CF, tanto en las CT crecidas a partir de la zona periférica tumoral como en los renocitos crecidos a partir del tejido renal normal.

En primer lugar, analizamos marcadores asociados con la proliferación, el desarrollo y la invasividad tumoral, los cuales detallamos a continuación. Encontramos marcación para el CD90 o Thy-1 en ambas poblaciones celulares (CT y renocitos). Este marcador originalmente fue descubierto como un antígeno de timocitos, pero se sabe que está presente en células mesangiales glomerulares renales y que juega un rol

importante en la regulación de la proliferación, metástasis y angiogénesis tumoral [112]. El CD98 también resultó positivo en ambos tipos de células. Esta proteína forma parte de transportadores funcionales de aminoácidos y se encuentra presente en muchas células que proliferan activamente. Además se expresa en varios tipos de cánceres, entre ellos el CRCC [113]. Tanto las CT como los renocitos expresaron CD44, el cual participa en diversos procesos biológicos como en la interacción célula-célula, la adhesión celular, la migración, la proliferación, la diferenciación y la angiogénesis. Esta descrito que la expresión de CD44 se asocia con el grado de Fuhrman, el estadio del tumor primario, el subtipo histológico y el mal pronóstico en pacientes con CRCC [114]. Por último, el CD117, que es un receptor de membrana asociado con el desarrollo del cáncer, se expresa en algunos subtipos de carcinoma renal, como el CR cromóforo y el oncocitoma renal, pero es negativo en el caso del CRCC [115]. Esta descripción concuerda con nuestros resultados ya que no obtuvimos marcación para este receptor.

Luego medimos la expresión de marcadores para determinar la estirpe celular. Entre ellos, la cadherina EP-CAM o CD326, molécula de adhesión de células epiteliales, resultó positiva para las CT y los renocitos. Sin embargo, no observamos expresión de la otra cadherina epitelial estudiada, CD324. Además, medimos la proteína del endotelio vascular, VE-cadherina o CD144, la cual no se detectó en ninguna de las dos poblaciones celulares. Estos resultados dan una idea de que el linaje de las células obtenidas es cercano al epitelial y que no hubo contaminación con células endoteliales en los cultivos.

Por último, elegimos estudiar el antígeno de superficie celular Tra 1-60, marcador que se asocia con un estado celular indiferenciado. Las células de la zona tumoral periférica resultaron Tra 1-60 positivas, mientras que las células del tejido renal

normal lo expresaron solo en un bajo porcentaje. Esto estaría indicando que efectivamente las CT se diferencian de los renocitos y que presentan un estado de indiferenciación mayor que el de las células normales.

Continuando con el análisis mediante CF de los cultivos celulares primarios, estudiamos la expresión de varios PCI, dentro de los cuales podemos mencionar PD-L1, HLA-G, CD137L, CD70, B7H3, ILT2 e ILT4. Se analizaron 10 muestras de CT crecidas a partir de diferentes pacientes con CRCC y en ellas observamos una gran heterogeneidad tanto en el tipo de PCI que expresó cada tumor como en la magnitud de expresión. Una observación muy importante que se desprende de los resultados, es que un tumor en particular puede expresar varios PCI simultáneamente. Esto debe ser considerado para optimizar futuras inmunoterapias, ya que los tratamientos vigentes hasta el momento consisten en el bloqueo de un único PCI, y estos no parecen funcionar o no son lo suficientemente eficientes. En particular, la proteína HLA-G se encontró presente en las 10 muestras tumorales analizadas con niveles de expresión desde muy bajos a elevados. Esto concuerda con nuestros hallazgos mediante IHQ y RT-qPCR donde también obtuvimos marcación para esta proteína en todas las muestras tumorales estudiadas. Además, es digno de mención el hallazgo de la expresión de los receptores de HLA-G en las CT, ya que generalmente se considera que ILT2 e ILT4 se expresan solo en los leucocitos [116]. Si bien ya se ha descrito la expresión del ILT4 en varios tipos de cánceres [102], [103], estos resultados revelan por primera vez la expresión del ILT2 en las CT.

Como mencionamos, estudiamos la expresión del HLA-G mediante diferentes técnicas, y consistentemente encontramos que todas las muestras de CRCC recibidas fueron positivas para este marcador. En aquellas muestras donde obtuvimos

fragmentos de las zonas tumorales central y periférica, decidimos estudiar con mayor detalle este PCI y evaluar la presencia de las distintas isoformas del HLA-G. Si bien el número de muestras analizadas fue pequeño y no es posible realizar un análisis estadístico de los resultados obtenidos, estudiando solamente 3 muestras hemos observado una gran heterogeneidad en los tipos de HLA-G presentes en cada tumor. Aún más, hallamos diferentes isoformas dentro de cada zona tumoral en el mismo paciente. Detectamos expresión de la isoforma HLA-G5 soluble en todos los casos (en los 3 pacientes y en ambas zonas). Le continúa, en frecuencia de aparición, la isoforma HLA-G1. Llamativamente, el HLA-G1L, isoforma que fue descrita hace pocos años, se vió en los 3 pacientes pero solamente en la zona periférica tumoral. Sería interesante seguir evaluando la distribución selectiva de esta nueva isoforma y analizar que función puede estar cumpliendo en esa posición. Podríamos suponer que esa pequeña modificación de 5 aminoácidos en su extremo N-ter influye en la eficiencia de vehiculización de la proteína a la membrana plasmática generando allí una mayor supresión local, como un frente de batalla más fuerte para el avance y expansión tumoral. Cabe destacar que hasta el momento no se conoce con exactitud si cada isoforma del HLA-G posee una función diferente.

En las zonas de tejido renal normal analizadas, no se ha podido determinar la expresión de ninguna de las isoformas de HLA-G mediante RT-PCR, excepto en el paciente 2 donde se observa una banda muy tenue con los pares 257 F/526 R y con 257 F/963 R a 726 pb, que correspondería a HLA-G1. Esto resulta extraño ya que el tejido renal normal no debería expresarlo, pero podría suceder que el tejido tumoral adyacente estuviese induciendo a la región normal a expresar la proteína, o bien que estas células, aparentemente normales, estuvieran en vías de malignizarse.

## 8.2 Segunda parte

**Análisis de los posibles efectos generados por la aplicación de células madre mesenquimales de cordón umbilical humano (CMM-CU) en el microambiente tumoral de CRCC.**

**Estudio de la relación entre las CMM-CU y las CT obtenidas de cultivos primarios de muestras de pacientes con CRCC.**

Las CMM resultan de gran interés para la aplicación clínica debido a la gran capacidad multipotencial, plasticidad y acciones que poseen. Estas características permiten utilizarlas para modular reacciones inmunes en enfermedades autoinmunes; en el trasplante de médula ósea; en medicina regenerativa para tratar heridas dérmicas o cambios degenerativos en articulaciones; para reconstruir hueso, cartílago y tejidos destruidos o dañados como sucede en enfermedades neurodegenerativas, la diabetes o en cardiopatías [117]. Además, gracias a la capacidad que poseen de migrar hacia los sitios de daño tisular podrían ser utilizadas como vehículo terapéutico de genes, como por ejemplo en enfermedades monogénicas, incluso también como vehículo de drogas antitumorales, entre otras.

Como mencionamos en la introducción, las CMM-CU ofrecen una fuente ilimitada de células adultas que conservan las propiedades inmunomoduladoras, la capacidad de auto-renovarse y de diferenciarse a varios linajes celulares. Además son fáciles de obtener a partir de un tejido que se descarta en el momento del parto, no requiere de prácticas dolorosas y no presentan las objeciones éticas de las CM embrionarias.

En nuestro laboratorio, hemos logrado aislar y cultivar a las CMM a partir de muestras de cordones umbilicales humanos. Hasta el momento no se ha encontrado un único marcador para determinar la identidad de las CMM-CU, sino que deben

analizarse un conjunto de marcadores de superficie, los cuales medimos mediante CF [118]. Nuestros resultados mostraron que las células obtenidas en cultivo efectivamente eran CMM, ya que fueron positivas para CD90, CD73 y CD105, y negativas para CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a y HLA-DR. Además, incluimos en el análisis algunos otros marcadores como CD98, CD44 y la integrina CD29 que también resultaron positivos, los cuales refuerzan la identidad celular.

En la caracterización de las CMM es importante estudiar su capacidad de diferenciación hacia linajes mesenquimales, como osteocitos, condrocitos y adipocitos. Esta propiedad fue probada y confirmada en el laboratorio mediante un ensayo de diferenciación a multilínea [119], el cual se realizó previo al trabajo de tesis pero es un resultado necesario que avala la identidad de las CMM-CU.

En general, se acepta que las CMM no presentan propiedades inmunogénicas, por lo que pueden trasplantarse alogénicamente sin necesidad de inmunosupresión, ya que son capaces de suprimir la proliferación y activación de diferentes células del sistema inmunológico. Como se ha demostrado, el HLA-G contribuye a disminuir el rechazo de injertos gracias a la inmunosupresión local que genera [120], por lo que hemos decidido estudiar la expresión de esta proteína en las CMM-CU, lo cual nos permitiría un uso seguro de las mismas como vehículo de drogas antitumorales en huéspedes alogénicos. Según trabajos previos, las CMM-CU poseen altos niveles de expresión de HLA-G, cercano al 90% de los casos [81], y esto se debe a su cercanía con la placenta, donde las vellosidades coriónicas expresan esta molécula para mantener la tolerancia materno-fetal. En nuestro caso, los valores obtenidos fueron mucho menores a los reportados. Aproximadamente, el 50% de las muestras de cordones obtenidas expresaron HLA-G y además, estos valores decayeron notablemente luego de dos pasajes celulares. Estas diferencias probablemente se

deban a que mediante CF solamente detectamos a las isoformas de HLA-G de membrana, sin medir la expresión de aquellas solubles. De hecho, está reportado que las CMM suelen secretar altos niveles de la isoforma HLA-G5 [121].

Para reforzar el concepto del trasplante alogénico de las CMM-CU, estudiamos su efecto inmunomodulador sobre linfocitos activados obtenidos de sangre periférica. Los resultados de este ensayo mostraron una gran capacidad de las CMM-CU para inhibir la proliferación de los linfocitos.

Por último, realizamos un ensayo de proliferación celular para evaluar si las CMM-CU ejercen algún efecto sobre las CT que hemos obtenido de los cultivos celulares primarios. El medio condicionado obtenido de CMM-CU crecidas a un 50% de confluencia celular generó un pequeño estímulo en la tasa de proliferación de las CT, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas cuando las comparamos con las CT crecidas en el medio basal RPMI. Una publicación reciente ha estudiado el contenido de las vesículas extracelulares que liberan las CMM-CU al medio condicionado, mostrando una importante secreción de proteínas de la matriz extracelular, de adhesión célula al sustrato, de motilidad celular, y de factores asociados a la inducción de la angiogénesis y transformación epitelio-mesenquimal [122]. En conjunto, esta caracterización detallada del secretoma de las CMM-CU, donde los factores solubles presentes son pro-oncogénicos, induce a pensar que estos podrían ser favorables para el desarrollo tumoral. Si bien, nuestros ensayos no mostraron una importante inducción en la proliferación de las CT, no sería recomendable usar como vehículo de una droga antitumoral a una célula que podría generar el efecto contrario. Aún más, la expresión del HLA-G y el marcado efecto inmunomodulador que ejercieron las CMM-CU sobre los linfocitos de sangre periférica también sería contraproducente para su uso en tratamientos antitumorales.

Resumiendo, por un lado, estas características nos permitirían la aplicación alogénica de las CMM, pero por otro lado la generación de un entorno tolerogénico en el nicho tumoral favorecería el escape de las CT al sistema inmune, y consecuentemente su expansión y desarrollo.

Las propiedades enumeradas que poseen las CMM-CU, negativas para el caso de terapias antitumorales, podrían resultar sumamente beneficiosas para su aplicación en medicina regenerativa. Su trasplante alogénico ha sido propuesto para la cicatrización y regeneración de úlceras dérmicas crónicas que no responden a los tratamientos convencionales [82]. Sin embargo, en base a nuestros resultados, sería conveniente evaluar la presencia de neoplasias en los pacientes antes de involucrarlos en cualquier tipo de protocolo de aplicación de las CMM-CU, inclusive debería evitarse su uso en aquellos que han padecido algún tipo de cáncer en los 5 años previos.

### 8.3 Tercera parte

#### Silenciamiento del antígeno HLA-G mediante el sistema CRISPR/Cas9 de edición génica en líneas celulares tumorales establecidas.

Como hemos estado mencionando, durante las últimas décadas, se ha encontrado expresión anormal del HLA-G en numerosos tipos de cánceres, lo que se ha asociado con un estadio tumoral avanzado, una transformación agresiva y un mal pronóstico de la enfermedad [65]. Por otro lado, la expresión baja o nula del HLA-G en tejidos normales lo convierte en una diana terapéutica interesante. Es por ello que el bloqueo de la expresión del HLA-G podría ser beneficioso en cualquier neoplasia que lo utilice como mecanismo de evasión de la vigilancia inmunitaria [53]. De esta forma, nos propusimos realizar el bloqueo del antígeno HLA-G, por edición génica, mediante la técnica de CRISPR/Cas9 como una posible alternativa para la terapia tumoral. Esta novedosa estrategia constituye una herramienta eficaz para realizar manipulaciones de ingeniería genética, que podrían conducir a la reactivación del sistema inmunológico del huésped para atacar a las CT. En el presente trabajo, hemos puesto a punto la técnica utilizando varias secuencias de ARNg que se dirigen a dos regiones específicas del gen *hla-g*, las cuales son importantes para el inicio de la traducción. Utilizamos dos líneas celulares tumorales diferentes para transfectar el sistema CRISPR/Cas9.

La edición del gen *hla-g* en la línea celular RCC7/HLA-G1, utilizando el ARNg-2A, logró un silenciamiento total de la proteína en todas las líneas celulares clonales analizadas por WB y CF. Luego, realizamos una RT-PCR sobre los clones obtenidos utilizando oligonucleótidos específicos contra los exones 1 y 2, y no obtuvimos amplificación, lo que estaría indicando que estas regiones fueron editadas. Los

resultados de la secuenciación corroboraron que todos los clones fueron editados y mostraron que se introdujo un fragmento de 300 pb en el genoma. Esta inserción coincidió con la secuencia del vector lentiviral pWXPL. Una posible explicación es que cuando la endonucleasa Cas9 generó la doble ruptura en el ADN<sub>g</sub>, probablemente ésta fue reparada por reparación dirigida por homología (HDR) usando una segunda molécula de pWXPL como molde, también integrada en el genoma. La inserción de esta secuencia lentiviral es consecuencia de la manipulación genética que había sufrido previamente la línea celular RCC7 para sobreexpresar la isoforma HLA-G1, pero esta condición no sería extrapolable a la clínica. En cualquier caso, este primer ensayo sirvió para confirmar que el ARN<sub>g</sub>-2A fue capaz de dirigir a la Cas9 específicamente a la región del gen *hla-g*.

En segundo lugar, editamos la línea celular tumoral JEG-3, la cual expresa naturalmente altos niveles de HLA-G. Al momento del desarrollo del presente trabajo, a diferencia de lo mencionado en la introducción sobre la secuencia del *hla-g* según la base de datos Ensembl, la base de datos Internacional de Inmunogenética (IMGT/HLA; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>), no consideraba parte de la secuencia al exón 1 y sólo aceptaba como sitio de inicio de la traducción al ATG situado en el exón 2. Recientemente el IMGT/HLA ha adoptado el mismo criterio de nomenclatura que el Ensembl. Basandonos en las diferencias entre ambas bases de datos y con el fin de aumentar las posibilidades de interrumpir la expresión del HLA-G, decidimos diseñar cuatro ARN<sub>g</sub>s diferentes (1A, 1B, 2A y 2B) que dirijan a la Cas9 tanto hacia el exón 1 como al exón 2.

Los resultados mostraron que todas las condiciones fueron capaces de disminuir la expresión de la proteína, aunque los ARN<sub>g</sub>-2A y -2B fueron más efectivos que los ARN<sub>g</sub>-1A y -1B. Todos los ARN<sub>g</sub>s diseñados fueron capaces de reconocer y editar el

genoma del HLA-G, sin embargo, observamos que un solo ARNg no es suficiente para generar una población de células totalmente silenciadas. Esto podría deberse a que solamente modificamos uno de los sitios de inicio de la traducción (exón 1 o 2), pero no ambos. Por lo tanto, decidimos transfectar los cuatro ARNgs simultáneamente en las JEG-3 para aumentar la eficiencia de la edición. Encontramos que bajo esta condición se logró un silenciamiento casi total del HLA-G. Estos hallazgos estarían demostrando que las dos regiones ATG son importantes en el proceso de la traducción [123]. Finalmente, también mostramos que la función de la molécula HLA-G se vio afectada después de la edición génica, midiendo su influencia sobre el proceso de degranulación de las células inmunes NK. El cocultivo de las NK con las células editadas JEG-3/MIX-ARNgs demostró que cuando la expresión del HLA-G desaparece de la superficie de las CT, las células NK recuperan parcialmente su actividad de degranulación lo que se desencadenaría en una mayor capacidad para destruir a las CT. En la revisión publicada por Krijgsman y col. [69], mencionan que hay varios estudios *in vitro* que muestran resultados similares, donde diferentes líneas celulares tumorales HLA-G negativas son destruidas de manera más eficiente por las células NK en comparación con sus contrapartes transfectadas con HLA-G.

De acuerdo con el marco teórico de la edición génica, en la mayoría de los casos, la expresión del ARNm permanece normal, mientras que la expresión a nivel proteico se interrumpe. Esto ocurre cuando hay pequeñas modificaciones, como InDels de pocas pares de bases, que no alcanzan a alterar el proceso de transcripción pero que generan un corrimiento del marco de lectura, y la proteína no será funcional o directamente no se traducirá. Luego de haber transfectado a las células con el sistema CRISPR/Cas9, analizamos la expresión de ARNm mediante RT-PCR utilizando

cebadores ubicados en los exones 3-4 (257 F/526 R) en ambas líneas celulares. En todos los clones de RCC7/HLA-G1 editados hemos obtenido el fragmento de amplificación correcto para HLA-G; mientras que, inesperadamente, en las células JEG-3 editadas encontramos una disminución del ARNm usando los mismos pares de cebadores. Aún más, los niveles de ARNm y de proteína del HLA-G disminuyeron en la misma proporción en cada una de las condiciones de edición testeadas en las JEG-3. Una explicación posible es que las modificaciones que se producen mediante la técnica CRISPR/Cas9 son diferentes en las dos poblaciones analizadas y aunque ambas desencadenan la edición del HLA-G, los eventos moleculares no son los mismos en cada población celular. Los resultados de la secuenciación de Sanger mostraron una edición importante en las células JEG-3 editadas, con InDels de varios nucleótidos, como se muestra en las Figuras 7.8 y 7.11, que podrían albergar codones de terminación prematuros y el ARNm podría ser degradado por la vía de desintegración sin sentido del ARNm (NMD, en inglés *non-sense mediated decay*) [124], [125]. En cambio, en las células RCC7/HLA-G1 editadas, se insertó un amplicón de 300 pb correspondiente al vector lentiviral en todas las líneas celulares clonales analizadas (figura 7.5). Otra explicación posible a estas observaciones, se relaciona con el análisis del promotor que regula el proceso de transcripción. En las RCC7/HLA-G1, el HLA-G se transcribe a partir de un promotor constitutivo presente en el vector lentiviral, mientras que en las células JEG-3, el HLA-G se transcribe bajo su promotor natural. Entonces, la edición mediante CRISPR/Cas9, podría modificar el promotor natural del gen *hla-g* y disminuir la actividad de la ARN polimerasa y, en consecuencia, disminuir el nivel del ARNm [126]. En las RCC7/HLA-G1 editadas, el HLA-G se puede transcribir normalmente, pero no se produce la expresión de la proteína.

En la actualidad, la edición génica se propone como una nueva alternativa para muchos tratamientos contra el cáncer [127], [128]. Podemos mencionar como ejemplo un área prometedora en la inmunoterapia que utiliza CRISPR/Cas9 para modificar genéticamente a linfocitos T alogénicos, conocidos como linfocitos T de receptor de antígeno quimérico (CAR). En varios estudios, las células T-CAR derivadas de donantes sanos se editaron para silenciar o interrumpir tanto las moléculas de TCR como las de HLA para administrarlas de manera alogénica en pacientes oncológicos [71], [129]. Esto le permite a las células T-CAR reconocer antígenos asociados a tumores y mejorar la respuesta a la terapia mediante la activación de las células T sin el rechazo del huésped. Otra estrategia para potenciar la terapia con células T-CAR es destruir la expresión de PD-1 mediante el sistema CRISPR/Cas9 ya que esta señal inhibidora genera células T exhaustas, y su bloqueo podría mejorar la eficacia antitumoral y así obtener mejores resultados clínicos [73], [130].

La edición génica está actualmente en camino de ser aplicada en muchas enfermedades diferentes y tiene un enorme potencial [131]. Sin embargo, todavía existen ciertos desafíos que deben superarse para el uso seguro y efectivo de la tecnología CRISPR/Cas en aplicaciones de terapia génica clínica, como por ejemplo encontrar vehículos de administración específicos hacia el tejido diana, regular la inmunogenicidad y respuesta al daño del ADN, entre otros. Hacia el futuro, para superar estos obstáculos, proponemos administrar la terapéutica CRISPR para el bloqueo del HLA-G, en caso de neoplasias que expresen este PCI en el cuerpo humano, utilizando vectores de virus adenoasociados (AAV) [132]–[134]. El AAV es seguro, capaz de administrar el sistema CRISPR/Cas a varios tejidos y tipos de células, y es levemente inmunogénico dentro de una amplia gama de dosis. Además, el vector permanece en gran parte episomal dentro de las células huésped, se estabiliza

mediante concatemerización y circularización para mediar la expresión transgénica a largo plazo en células posmitóticas, lo que conduce a una eficacia terapéutica duradera.

## 9 Conclusiones

- Demostramos el rol fundamental que juega la angiogénesis y la expresión del PCI HLA-G/ILTs en la patogenia del CRCC, y hallamos posibles relaciones entre estos biomarcadores.
- Se determinó que la expresión de VEGF-A y HLA-G es sumamente heterogénea en las diferentes muestras de CRCC analizadas (heterogeneidad intertumoral). Incluso, esa heterogeneidad también está presente en las diferentes regiones estudiadas dentro de un mismo tumor (heterogeneidad intratumoral).
- Encontramos diferencias en el perfil de las isoformas del HLA-G que se expresan en las zonas tumorales central y periférica.
- Desarrollamos cultivos celulares primarios, a partir de muestras de pacientes con CRCC, lo cual nos permitió estudiar con mayor precisión la expresión de los marcadores de interés en las CT (VEGF-A, VEGF-C, HLA-G e ILT4), sin interferencia de otras células del estroma tumoral. De hecho, identificamos por primera vez la expresión del receptor ILT2 en las CT del CRCC.
- Estudiamos el efecto de las CMM-CU sobre las CT, y su capacidad para generar inmunosupresión, lo cual nos llevó a concluir que no sería recomendable su uso como vehículo de drogas anti-tumorales.

- Logramos el bloqueo de la expresión del HLA-G en dos líneas celulares tumorales diferentes mediante edición génica. El silenciamiento de esta proteína por el método de CRISPR/Cas9 mostró una reactivación de la actividad de las células inmunitarias NK.

Estos hallazgos permitieron conocer con mayor detalle la expresión de los marcadores angiogénicos y de la sinapsis inmunológica HLA-G/ILTs, otorgarles la importancia que amerita dentro de la patogenia del CRCC. Ambas demostraron ser estrategias que utiliza el tumor para favorecen su crecimiento y expansión. A futuro, consideramos de gran interés realizar un análisis molecular más detallado para comprender los mecanismos de acción de estos marcadores que expliquen las asociaciones encontradas en nuestros resultados. Ahondar en estos conceptos podría mejorar la efectividad de la terapia anti-angiogénica y de la inmunoterapia, aumentando así la tasa de supervivencia de los pacientes. Aún más valioso sería poder combinar ambas terapias ya que, según nuestros hallazgos, generarían una sinergia en el tratamiento de esta neoplasia. Mediante el uso de anticuerpos anti-VEGF-A, como el Bevacizumab, se evitaría el desarrollo de los nuevos vasos sanguíneos lo cual frenaría la expansión del tumor, y el bloqueo de la expresión del HLA-G mediante edición génica, reactivaría el sistema inmunológico del huésped y ayudaría a eliminar a las CT. El hecho de utilizar una inmunoterapia dirigida al PCI HLA-G/ILTs es muy prometedora ya que no generaría demasiados efectos secundarios, pues su expresión en condiciones fisiológicas está muy restringida.

El presente plan de tesis Doctoral sienta las bases para el desarrollo de terapéuticas que permitan el establecimiento de nuevas alternativas para el control del cáncer.

## 10 Referencias bibliográficas

- [1] J. R. Srigley *et al.*, “The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of renal neoplasia,” *Am J Surg Pathol*, vol. 37, no. 10, pp. 1469–1489, 2013.
- [2] H. Moch, A. L. Cubilla, P. A. Humphrey, V. E. Reuter, and T. M. Ulbright, “The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours,” *Eur. Urol.*, vol. 70, no. 1, pp. 93–105, 2016, doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.029.
- [3] C. Diaz, C. Gabay, J. Caldano, and P. Nannini, *Terapia de alto costo en cáncer de riñón avanzado*, vol. combinado, no. 1ra edición. 2017.
- [4] C. Frantzen, T. Klasson, T. Links, and R. Giles, “Von Hippel-Lindau Syndrome. GeneReviews,” in *GeneReviews*, 2015.
- [5] J. I. López, A. Ugalde, and M. Zhou, “Carcinomas renales con células claras,” *Rev Esp Patol*, vol. 41, no. 3, pp. 169–182, 2008.
- [6] P. Colaci, M. García, A. Errecalde, and A. Inda, “Correlation between MVD and two prognostic factors: Fuhrman grade and tumoral size, in clear cell renal cell carcinoma,” *J. Cancer Sci. Ther.*, vol. 4, no. 10, pp. 313–316, 2012.
- [7] M. Zhou, A. Roma, and C. Magi-Galluzzi, “The Usefulness of Immunohistochemical Markers in the Differential Diagnosis of Renal Neoplasms,” *Clin. Lab. Med.*, vol. 25, no. 2, pp. 247–257, 2005.
- [8] B. R. Seizinger *et al.*, “Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma,” *Nature*, vol. 332, no. 6161, pp. 268–269, 1988.
- [9] H. Hasumi and M. Yao, “Hereditary kidney cancer syndromes : Genetic disorders driven by alterations in metabolism and epigenome regulation,” *Cancer Sci.*, vol. 109, pp. 581–586, 2018, doi: 10.1111/cas.13503.
- [10] P. M. Wierzbicki *et al.*, “Prognostic significance of VHL, HIF1A, HIF2A, VEGF-A and p53 expression in patients with clear - cell renal cell carcinoma treated with sunitinib as first - line treatment,” *Int. J. Oncol.*, vol. 55, pp. 371–390, 2019, doi: 10.3892/ijo.2019.4830.
- [11] V. A. Carroll and M. Ashcroft, “Targeting the molecular basis for tumour hypoxia,” *Expert Rev. Mol. Med.*, vol. 7, no. 6, pp. 1–16, 2005, doi: 10.1017/S1462399405009117.
- [12] E. Guðmundsson, H. Hellborg, S. Lundstam, S. Erikson, and B. Ljungberg,

- “Metastatic potential in renal cell carcinomas  $\leq 7$  cm: Swedish kidney cancer quality register data,” *Eur. Urol.*, vol. 60, no. 5, pp. 975–982, 2011, doi: 10.1016/j.eururo.2011.06.029.
- [13] B. Ljungberg *et al.*, “Guía del carcinoma de células renales,” *Actas Urológicas Españolas*, vol. 33, no. 3, pp. 270–279, 2009, doi: 10.1016/s0210-4806(09)74140-3.
- [14] M. Bianchi *et al.*, “Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: A population-based analysis,” *Ann. Oncol.*, vol. 23, no. 4, pp. 973–980, 2012, doi: 10.1093/annonc/mdr362.
- [15] M. H. Bagheri *et al.*, “Advances in medical imaging for the diagnosis and management of common genitourinary cancers,” *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, vol. 35, no. 7, pp. 473–491, 2017, doi: 10.1016/j.urolonc.2017.04.014.
- [16] M. B. Amin *et al.*, *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th ed. Springer International Publishing, 2017.
- [17] S. Edge, D. R. Byrd, C. C. Compton, A. G. Fritz, F. Greene, and A. Trotti, *AJCC Cancer Staging Handbook*, 7th ed. Springer- Verlag New York, 2010.
- [18] K. M. Cornejo, T. Rice-Stitt, and C. L. Wu, “Updates in staging and reporting of genitourinary malignancies,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 144, no. 3, pp. 305–319, 2020, doi: 10.5858/arpa.2019-0544-RA.
- [19] F. Algaba, I. Trias, M. Scarpelli, L. Boccon-Gibod, Z. Kirkali, and H. Van Poppel, “Handling and Pathology Reporting of Renal Tumor Specimens,” *Eur. Urol.*, vol. 45, pp. 437–443, 2004, doi: 10.1016/j.eururo.2003.11.026.
- [20] S. A. Fuhrman, L. C. Lasky, and C. Limas, “Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 6, no. 7, pp. 655–663, 1982.
- [21] E. Morán *et al.*, “Usefulness of new schemes to group Fuhrman grades in clinical practice for clear cell renal tumor,” *Actas Urológicas Españolas*, vol. 36, pp. 352–358, 2012.
- [22] B. Ljungberg *et al.*, “European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma : The 2019 Update,” *Eur. Urol.*, vol. 75, no. 5, pp. 799–810, 2019, doi: 10.1016/j.eururo.2019.02.011.
- [23] B. Gershman *et al.*, “Radical Nephrectomy with or without Lymph Node Dissection for High Risk Nonmetastatic Renal Cell Carcinoma : A Multi-Institutional Analysis,” *J. Urol.*, vol. 199, no. 5, pp. 1143–1148, 2018, doi: 10.1016/j.juro.2017.11.114.
- [24] E. C. Campbell, “Advances in angiogenesis research: Relevance to urological oncology,” *J. Urol.*, vol. 158, no. 5, pp. 1663–1674, 1997.

- [25] B. I. Rini and E. J. Small, “Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 5, pp. 1028–1043, 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.01.186.
- [26] M. J. Cross, J. Dixelius, T. Matsumoto, and L. Claesson-Welsh, “VEGF-receptor signal transduction,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 28, no. 9, pp. 488–494, 2003, doi: 10.1016/S0968-0004(03)00193-2.
- [27] S. S. Yu, D. I. Quinn, and T. B. Dorff, “Clinical use of cabozantinib in the treatment of advanced kidney cancer: Efficacy, safety, and patient selection,” *Onco. Targets. Ther.*, vol. 23, no. 9, pp. 5825–5837, 2016, doi: 10.2147/OTT.S97397.
- [28] B. I. Rini *et al.*, “Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 33, pp. 5422–5428, 2008, doi: 10.1200/JCO.2008.16.9847.
- [29] R. Tamma *et al.*, “Microvascular density, macrophages, and mast cells in human clear cell renal carcinoma with and without bevacizumab treatment,” *Urol. Oncol.*, vol. 37, no. 6, pp. 355.e11–355.e19, 2019, doi: 10.1016/j.urolonc.2019.01.025.
- [30] R. B. Cohen and S. Oudard, “Antiangiogenic therapy for advanced renal cell carcinoma: Management of treatment-related toxicities,” *Invest. New Drugs*, vol. 30, no. 5, pp. 2066–2079, 2012, doi: 10.1007/s10637-012-9796-8.
- [31] N. Dey, P. De, and L. J. Brian, “Evading anti-angiogenic therapy: Resistance to anti-angiogenic therapy in solid tumors,” *Am. J. Transl. Res.*, vol. 7, no. 10, pp. 1675–1698, 2015, doi: 10.1038/bjc.2014.439.
- [32] M. W. Kieran, R. Kalluri, and Y. J. Cho, “The VEGF pathway in cancer and disease: Responses, resistance, and the path forward,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, pp. 1–17, 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a006593.
- [33] A. M. Inda *et al.*, “Evaluation of angiogenesis with the expression of VEGF and CD34 in human non-small cell lung cancer,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 26, no. 3, pp. 375–378, 2007.
- [34] H. Miao, S. Ruan, and M. Shen, “VEGF-C in rectal cancer tissues promotes tumor invasion and metastasis,” *J. B.U.ON.*, vol. 23, no. 1, pp. 42–47, 2018.
- [35] K. Rauniyar, S. K. Jha, and M. Jeltsch, “Biology of vascular endothelial growth factor C in the morphogenesis of lymphatic vessels,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, 2018, doi: 10.3389/fbioe.2018.00007.
- [36] Y. Dai, R. Tong, H. Guo, T. Yu, and C. Wang, “Association of CXCR4, CCR7, VEGF-C and VEGF-D expression with lymph node metastasis in patients with cervical cancer,” *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, vol. 214, pp. 178–183, 2017, doi: 10.1016/j.ejogrb.2017.04.043.

- [37] C. Ma *et al.*, “OxLDL promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in gastric cancer by upregulating VEGF-C expression and secretion,” *Int. J. Oncol.*, vol. 54, pp. 572–584, 2019.
- [38] P. Zhang *et al.*, “Immunoglobulin-like transcript 4 promotes tumor progression and metastasis and up-regulates VEGF-C expression via ERK signaling pathway in non-small cell lung cancer,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 15, pp. 13550–13563, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.3624.
- [39] A. W. Hahn, D. M. Gill, S. K. Pal, and N. Agarwal, “The future of immune checkpoint cancer therapy after PD-1 and CTLA-4,” *Immunotherapy*, vol. 9, no. 8, pp. 681–692, 2017, doi: 10.2217/imt-2017-0024.
- [40] J. A. Marin-Acevedo, B. Dholaria, A. E. Soyano, K. L. Knutson, S. Chumsri, and Y. Lou, “Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: New developments and challenges,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 11, no. 39, pp. 1–20, 2018, doi: 10.1186/s13045-018-0582-8.
- [41] J. Weber, “Immune checkpoint proteins: A new therapeutic paradigm for cancer—Preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade,” *Semin. Oncol.*, vol. 37, no. 5, pp. 430–439, 2010, doi: 10.1053/j.seminoncol.2010.09.005.
- [42] M. Collin, “Immune checkpoint inhibitors: A patent review (2010-2015),” *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 26, no. 5, pp. 555–564, 2016, doi: 10.1080/13543776.2016.1176150.
- [43] P. Darvin, S. M. Toor, V. Sasidharan Nair, and E. Elkord, “Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 50, no. 165, pp. 1–11, 2018, doi: 10.1038/s12276-018-0191-1.
- [44] K. M. Hargadon, C. E. Johnson, and C. J. Williams, “Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 62, pp. 29–39, 2018, doi: 10.1016/j.intimp.2018.06.001.
- [45] S. Mikami *et al.*, “Recent advances in renal cell carcinoma from a pathological point of view,” *Pathol. Int.*, vol. 66, no. 9, pp. 481–490, 2016, doi: 10.1111/pin.12433.
- [46] B. Santiago-Agredano, J. Álvarez-Kindelán, P. Font-Ugalde, A. Blanca-Pedregosa, A. López-Beltrán, and M. J. Requena-Tapia, “Valor pronóstico de la invasión microvascular en la predicción de la supervivencia en el carcinoma de células renales,” *Actas Urol. Esp.*, vol. 37, no. 8, pp. 504–512, 2013, doi: 10.1016/j.acuro.2012.07.008.
- [47] Z. Liu *et al.*, “P2X7 receptor predicts postoperative cancer-specific survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma,” *Cancer Sci.*, vol. 106, no. 9, pp. 1224–1231, 2015, doi: 10.1111/cas.12736.
- [48] N. Rouas-Freiss, R. M. B. Gonçalves, C. Menier, J. Dausset, and E. D. Carosella,

- “Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 21, pp. 11520–11525, 1997, doi: 10.1073/pnas.94.21.11520.
- [49] E. D. Carosella, N. Rouas-Freiss, D. Tronik-Le Roux, P. Moreau, and J. LeMaout, *HLA-G. An Immune Checkpoint Molecule*, 1st ed., vol. 127. Elsevier Inc., 2015.
- [50] D. Tronik-Le Roux *et al.*, “Novel landscape of HLA-G isoforms expressed in clear cell renal cell carcinoma patients,” *Mol. Oncol.*, vol. 11, no. 11, pp. 1561–1578, 2017, doi: 10.1002/1878-0261.12119.
- [51] S. Lefebvre *et al.*, “Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells,” *Hum. Immunol.*, vol. 61, no. 11, pp. 1095–1101, 2000, doi: 10.1016/S0198-8859(00)00192-0.
- [52] C. Menier, M. Rabreau, J. C. Challier, M. Le Discorde, E. D. Carosella, and N. Rouas-Freiss, “Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis,” *Blood*, vol. 104, no. 10, pp. 3153–3160, 2004, doi: 10.1182/blood-2004-03-0809.
- [53] C. Menier, N. Rouas-Freiss, and E. D. Carosella, “The HLA-G non classical MHC class I molecule is expressed in cancer with poor prognosis. Implications in tumour escape from immune system and clinical applications,” *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, vol. 13, no. 7, pp. 531–542, 2009, doi: 10.4267/2042/44529.
- [54] F. F. Zhang *et al.*, “Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors in cancer development,” *Sci. China Life Sci.*, vol. 58, no. 12, pp. 1216–1225, 2015, doi: 10.1007/s11427-015-4925-1.
- [55] W. H. Yan and L. A. Fan, “Residues Met76 and Gln79 in HLA-G  $\alpha$ 1 domain involved in KIR2DL4 recognition,” *Cell Res.*, vol. 15, no. 3, pp. 176–182, 2005.
- [56] J. V.D. Attia, C. E. Dessens, R. van de Water, R. D. Houvast, P. J. K. Kuppen, and D. Krijgsman, “The molecular and functional characteristics of HLA-G and the interaction with its receptors: Where to intervene for cancer immunotherapy?,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 22, p. 8678, 2020, doi: 10.3390/ijms21228678.
- [57] N. Rouas-Freiss, P. Moreau, J. LeMaout, and E. D. Carosella, “The dual role of HLA-G in cancer,” *J. Immunol. Res.*, vol. 2014, pp. 13–21, 2014, doi: 10.1155/2014/359748.
- [58] M. Faure and E. O. Long, “KIR2DL4 (CD158d), an NK Cell-Activating Receptor with Inhibitory Potential,” *J. Immunol.*, vol. 168, no. 12, pp. 6208–6214, 2002, doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6208.
- [59] S. Rajagopalan and E. O. Long, “Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 50, pp. 20596–20601, 2012, doi: 10.1073/pnas.1208248109.

- [60] A. Najj *et al.*, “CD3+ CD4low and CD3+ CD8low are induced by HLA-G: Novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance,” *Blood*, vol. 110, no. 12, pp. 3936–3948, 2007, doi: 10.1182/blood-2007-04-083139.
- [61] S. Le Rond *et al.*, “Evidence to Support the Role of HLA-G5 in Allograft Acceptance through Induction of Immunosuppressive/ Regulatory T Cells,” *J. Immunol.*, vol. 176, no. 5, pp. 3266–3276, 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.5.3266.
- [62] M. Loustau, F. Anna, R. Dréan, M. Lecomte, P. Langlade-Demoyen, and J. Caumartin, “HLA-G Neo-Expression on Tumors,” *Front. Immunol.*, vol. 11, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01685.
- [63] L. Loumagne, J. Baudhuin, B. Favier, F. Montespan, E. D. Carosella, and N. Rouas-Freiss, “In vivo evidence that secretion of HLA-G by immunogenic tumor cells allows their evasion from immunosurveillance,” *Int. J. Cancer*, vol. 135, no. 9, pp. 2107–2117, 2014, doi: 10.1002/ijc.28845.
- [64] V. Sasidharan Nair and E. Elkord, “Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: A focus on T-regulatory cells: A,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 96, no. 1, pp. 21–33, 2018, doi: 10.1111/imcb.1003.
- [65] A. Lin and W. H. Yan, “Heterogeneity of HLA-G Expression in Cancers: Facing the Challenges,” *Front. Immunol.*, vol. 9, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02164.
- [66] S. George, B. I. Rini, and H. J. Hammers, “Emerging Role of Combination Immunotherapy in the First-line Treatment of Advanced Renal Cell Carcinoma: A Review,” *JAMA Oncol.*, vol. 5, no. 3, pp. 411–421, 2019, doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4604.
- [67] A. K. A. Lalani *et al.*, “Systemic Treatment of Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma in 2018: Current Paradigms, Use of Immunotherapy, and Future Directions,” *Eur. Urol.*, vol. 75, no. 1, pp. 100–110, 2019, doi: 10.1016/j.eururo.2018.10.010.
- [68] N. Rouas-Freiss *et al.*, “Intratumor heterogeneity of immune checkpoints in primary renal cell cancer: Focus on HLA-G/ILT2/ILT4,” *Oncoimmunology*, vol. 6, no. 9, 2017, doi: 10.1080/2162402X.2017.1342023.
- [69] D. Krijgsman, J. Roelands, W. Hendrickx, D. Bedognetti, and P. J. K. Kuppen, “HLA-G: A new immune checkpoint in cancer?,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 12, 2020, doi: 10.3390/ijms21124528.
- [70] G. P. Dunn, L. J. Old, and R. D. Schreiber, “The three Es of cancer immunoediting,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 22, no. 4, pp. 329–360, 2004, doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.
- [71] C. H. Huang, K. C. Lee, and J. A. Doudna, “Applications of CRISPR-Cas Enzymes

- in Cancer Therapeutics and Detection,” *Trends in Cancer*, vol. 4, no. 7, pp. 499–512, 2018, doi: 10.1016/j.trecan.2018.05.006.
- [72] B. Liu, A. Saber, and H. J. Haisma, “CRISPR/Cas9: a powerful tool for identification of new targets for cancer treatment,” *Drug Discov. Today*, vol. 24, no. 4, pp. 955–970, 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2019.02.011.
- [73] C. Zhang, Y. Peng, P. Hublitz, H. Zhang, and T. Dong, “Genetic abrogation of immune checkpoints in antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte as a potential alternative to blockade immunotherapy,” *Sci. Rep.*, vol. 8, p. 5549, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-23803-7.
- [74] F. A. Ran, P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, and F. Zhang, “Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system,” *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 11, pp. 2281–2308, 2013, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
- [75] E. Karaöz, P. Ç. Demircan, G. Erman, E. Güngörürler, and A. E. Sarıboyacı, “Comparative analyses of immunosuppressive characteristics of bone-marrow, Wharton’s jelly, and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells,” *Turkish J. Hematol.*, vol. 34, no. 3, pp. 213–225, 2017, doi: 10.4274/tjh.2016.0171.
- [76] D. C. Ding, Y. H. Chang, W. C. Shyu, and S. Z. Lin, “Human umbilical cord mesenchymal stem cells: A new era for stem cell therapy,” *Cell Transplant.*, vol. 24, no. 3, pp. 339–347, 2015, doi: 10.3727/096368915X686841.
- [77] C. Linard *et al.*, “Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Improve the Quality and Stability of Vascularized Flap Surgery of Irradiated Skin in Pigs,” *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 7, no. 8, pp. 569–582, 2018, doi: 10.1002/sctm.17-0267.
- [78] L. Masłowski *et al.*, “Autotransplantation of the Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Therapy of Venous Stasis Ulcers,” *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, vol. 68, no. 5, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1007/s00005-020-00571-9.
- [79] M. C. Corotchi, M. A. Popa, A. Remes, L. E. Sima, I. Gussi, and M. Lupu Plesu, “Isolation method and xeno-free culture conditions influence multipotent differentiation capacity of human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 4, no. 81, 2013, doi: 10.1186/srct232.
- [80] C. Y. Fong *et al.*, “Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton’s jelly stem cells,” *Reprod. Biomed. Online*, vol. 21, no. 3, pp. 391–401, 2010, doi: 10.1016/j.rbmo.2010.04.010.
- [81] A. Naji, N. Rouas-Freiss, A. Durrbach, E. D. Carosella, L. Sensébé, and F. Deschaseaux, “Concise review: Combining human leukocyte antigen g and mesenchymal stem cells for immunosuppressant biotherapy,” *Stem Cells*, vol. 31, no. 11, pp. 2296–2303, 2013, doi: 10.1002/stem.1494.

- [82] M. B. Palma *et al.*, “Wound Healing by Allogeneic Transplantation of Specific Subpopulation From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells,” *Cell Transplant.*, vol. 30, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1177/0963689721993774.
- [83] S. J. Greco and P. Rameshwar, “Mesenchymal stem cells in drug/gene delivery: Implications for cell therapy,” *Ther. Deliv.*, vol. 3, no. 8, pp. 997–1004, 2012, doi: 10.4155/tde.12.69.
- [84] T. E. G. Krueger, D. L. J. Thorek, S. R. Denmeade, J. T. Isaacs, and W. N. Brennen, “Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise,” *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 7, no. 9, pp. 651–663, 2018, doi: 10.1002/sctm.18-0024.
- [85] H. H. Wu, Y. Zhou, Y. Tabata, and J. Q. Gao, “Mesenchymal stem cell-based drug delivery strategy: from cells to biomimetic,” *J. Control. Release*, vol. 294, pp. 102–113, 2019, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.12.019.
- [86] S. Wittnebel *et al.*, “The sensitivity of renal cell carcinoma cells to interferon alpha correlates with p53-induction and involves Bax,” *Eur. Cytokine Netw.*, vol. 16, no. 2, pp. 123–127, 2005.
- [87] M. García *et al.*, “The immune-checkpoint HLA-G/ILT4 is involved in the regulation of VEGF expression in clear cell renal cell carcinoma,” *BMC Cancer*, vol. 20, p. 624, 2020, doi: 10.1186/s12885-020-07113-8.
- [88] N. Weidner, J. P. Semple, W. R. Welch, and J. Folkman, “Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 324, no. 1, 1991.
- [89] J. M. Ruijter *et al.*, “Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 6, p. e45, 2009, doi: 10.1093/nar/gkp045.
- [90] H. H. Van Acker, A. Capsomidis, E. L. Smits, and V. F. Van Tendeloo, “CD56 in the immune system: More than a marker for cytotoxicity?,” *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 892, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00892.
- [91] P. Jain, C. Jain, and V. Velcheti, “Role of immune-checkpoint inhibitors in lung cancer,” *Ther. Adv. Respir. Dis.*, vol. 12, pp. 1–13, 2018, doi: 10.1177/1753465817750075.
- [92] I. Lugowska, P. Teterycz, and P. Rutkowski, “Immunotherapy of Melanoma,” *Contemp. Oncol.*, vol. 22, no. 1A, pp. 61–67, 2018, doi: 10.5114/wo.2018.73889.
- [93] P. Colaci, “Determinación de la microdensidad vascular y su correlación con el estadio tumoral en carcinomas renales de células claras,” Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, Buenos Aires, Argentina, 2016.

- [94] M. V. Bürgesser, V. Riba, S. M. Ojeda, D. Muñoz Morales, P. Calafat, and A. Diller, “Expression of VEGF-A, HIF-1 A, CD34 and Ki67 in clear cell renal cell carcinomas and their relationship with conventional prognostic markers,” *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*, vol. 71, no. 1, pp. 7–15, 2014.
- [95] W. P. Parker *et al.*, “Application of the stage, size, grade and necrosis (SSIGN) score for clear cell renal cell carcinoma in contemporary patients,” *Eur. Urol.*, vol. 71, no. 4, pp. 665–673, 2017, doi: 10.1016/j.eururo.2016.05.034.Application.
- [96] B. Delahunt *et al.*, “The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters,” *Am J Surg Pathol*, vol. 37, no. 10, pp. 1490–504, 2013, doi: 10.1097/PAS.0b013e318299f0fb.
- [97] J. J. Patard *et al.*, “Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: An international multicenter study,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 22, no. 16, pp. 3316–3322, 2004, doi: 10.1200/JCO.2004.09.104.
- [98] V. L. Weiss *et al.*, “Prognostic significance of venous tumour thrombus consistency in patients with renal cell carcinoma (RCC),” *BJU Int*, vol. 113, no. 2, pp. 209–17, 2014, doi: 10.1111/bju.12322.
- [99] U. S. Ha *et al.*, “Renal capsular invasion is a prognostic biomarker in localized clear cell renal cell carcinoma,” *Sci. Rep.*, vol. 8, p. 202, 2018, doi: 10.1038/s41598-017-18466-9.
- [100] Ç. V. Öztekin, A. Ö. Akdemir, Ö. G. Doluoğlu, Ö. Uğurlu, M. Sungur, and M. Çetinkaya, “Impact of renal capsular infiltration on disease specific survival in patients with localized renal cell carcinoma ( $\leq pT2$ ),” *Turk Urol. Derg.*, vol. 36, no. 4, pp. 328–332, 2010, doi: 10.5152/tud.2010.039.
- [101] B. L. Li *et al.*, “Characterization of HLA-G expression in renal cell carcinoma,” *Tissue Antigens*, vol. 74, no. 3, pp. 213–221, 2009, doi: 10.1111/j.1399-0039.2009.01302.x.
- [102] J. Liu *et al.*, “Inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 4 was highly expressed in primary ductal and lobular breast cancer and significantly correlated with IL-10,” *Diagn. Pathol.*, vol. 9, no. 1, p. 85, 2014, doi: 10.1186/1746-1596-9-85.
- [103] L. Wang *et al.*, “Co-expression of immunoglobulin-like transcript 4 and angiopoietin-like proteins in human non-small cell lung cancer,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 11, no. 4, pp. 2789–2796, 2015, doi: 10.3892/mmr.2014.3029.
- [104] G. Singer *et al.*, “HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, no. 12, pp. 4460–4464, 2003.
- [105] F. Veselaj *et al.*, “Prognostic value of vascular endothelial growth factor A in the

- prediction of the tumor aggressiveness in clear cell renal cell carcinoma,” *Open Access Maced. J. Med. Sci.*, vol. 5, no. 2, pp. 167–172, 2017, doi: 10.3889/oamjms.2017.035.
- [106] D. Zhang, F. L. Lv, and G. H. Wang, “Effects of HIF-1 $\alpha$  on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression,” *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 22, no. 16, pp. 5071–5076, 2018, doi: 10.26355/eurrev\_201808\_15699.
- [107] G. Mouillot *et al.*, “Hypoxia Modulates HLA-G Gene Expression in Tumor Cells,” *Hum. Immunol.*, vol. 68, no. 4, pp. 277–285, 2007, doi: 10.1016/j.humimm.2006.10.016.
- [108] E. C. Castelli, L. C. Veiga-Castelli, L. Yaghi, P. Moreau, and E. A. Donadi, “Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene,” *J. Immunol. Res.*, vol. 2014, no. 734068, p. 15, 2014, doi: 10.1155/2014/734068.
- [109] J.-G. Park, J.-L. Ku, and S.-Y. Park, “Isolation and Culture of Renal Cancer Cell Lines,” in *Cancer Cell Culture: methods and protocols*, Methods in., no. February 2004, S. P. Langdon, Ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2004, pp. 111–119.
- [110] Y. H. Chou, S. Y. Pan, C. H. Yang, and S. L. Lin, “Stem cells and kidney regeneration,” *J. Formos. Med. Assoc.*, vol. 113, no. 4, pp. 201–209, 2014, doi: 10.1016/j.jfma.2013.12.001.
- [111] A. Maeshima, H. Sakurai, and S. K. Nigam, “Adult kidney tubular cell population showing phenotypic plasticity, tubulogenic capacity, and integration capability into developing kidney,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 17, no. 1, pp. 188–198, 2006, doi: 10.1681/ASN.2005040370.
- [112] A. Kumar, A. Bhanja, J. Bhattacharyya, and B. G. Jaganathan, “Multiple roles of CD90 in cancer,” *Tumor Biol.*, vol. 37, pp. 11611–11622, 2016.
- [113] M. Poettler, M. Unseld, K. Braemswig, A. Haitel, C. C. Zielinski, and G. W. Prager, “CD98hc (SLC3A2) drives integrin-dependent renal cancer cell behavior,” *Mol. Cancer*, vol. 12, no. 169, pp. 1–12, 2013, doi: 10.1186/1476-4598-12-169.
- [114] C. Corrà and H. Moch, “Biomarker discovery for renal cancer stem cells,” *J. Pathol. Clin. Res.*, vol. 4, no. 1, pp. 3–18, 2018, doi: 10.1002/cjp2.91.
- [115] S. Krüger, K. Sotlar, I. Kausch, and H. P. Horny, “Expression of KIT (CD117) in renal cell carcinoma and renal oncocytoma,” *Oncology*, vol. 68, pp. 269–275, 2005, doi: 10.1159/000086783.
- [116] F. Desgrandchamps *et al.*, “Prediction of non-muscle-invasive bladder cancer recurrence by measurement of checkpoint HLAG’s receptor ILT2 on peripheral CD8+ T cells,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 69, pp. 33160–33169, 2018, doi: 10.18632/oncotarget.26036.

- [117] M. B. Murphy, K. Moncivais, and A. I. Caplan, “Mesenchymal stem cells: Environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 45, p. e54, 2013, doi: 10.1038/emm.2013.94.
- [118] M. Krampera, J. Galipeau, Y. Shi, K. Tarte, and L. Sensebe, “Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells-The international society for cellular therapy (ISCT) working proposal,” *Cytotherapy*, vol. 15, no. 9, pp. 1054–1061, 2013, doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.010.
- [119] C. Luzzani *et al.*, “A therapy-grade protocol for differentiation of pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells using platelet lysate as supplement,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 6, no. 6, pp. 1–13, 2015, doi: 10.1186/scrt540.
- [120] R. Sheshgiri *et al.*, “Myocardial HLA-G Reliably Indicates a Low Risk of Acute Cellular Rejection in Heart Transplant Recipients,” *J. Hear. Lung Transplant.*, vol. 27, no. 5, pp. 522–527, 2008, doi: 10.1016/j.healun.2008.02.004.
- [121] Z. Selmani *et al.*, “Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4+ CD25high FOXP3+ Regulatory T Cells,” *Stem Cells*, vol. 26, no. 1, pp. 212–222, 2008, doi: 10.1634/stemcells.2007-0554.
- [122] A. La Greca *et al.*, “Extracellular vesicles from pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells acquire a stromal modulatory proteomic pattern during differentiation,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 50, p. 119, 2018, doi: 10.1038/s12276-018-0142-x.
- [123] A. V. Kochetov, “Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs,” *BioEssays*, vol. 30, no. 7, pp. 683–691, 2008, doi: 10.1002/bies.20771.
- [124] S. Brogna and J. Wen, “Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 2, pp. 107–113, 2009, doi: 10.1038/nsmb.1550.
- [125] N. Hug, D. Longman, and J. F. Cáceres, “Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 4, pp. 1483–1495, 2015, doi: 10.1093/nar/gkw010.
- [126] J. E. F. Butler and J. T. Kadonaga, “The RNA polymerase II core promoter: A key component in the regulation of gene expression,” *Genes Dev.*, vol. 16, no. 20, pp. 2583–2592, 2002, doi: 10.1101/gad.1026202.
- [127] S. Baliou *et al.*, “CRISPR therapeutic tools for complex genetic disorders and cancer (Review),” *Int. J. Oncol.*, vol. 53, no. 2, pp. 443–468, 2018, doi: 10.3892/ijo.2018.4434.
- [128] T. Wan *et al.*, “Genome editing of mutant KRAS through supramolecular polymer-mediated delivery of Cas9 ribonucleoprotein for colorectal cancer therapy,” *J.*

- Control. Release*, vol. 322, pp. 236–247, 2020, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.03.015.
- [129] H. Mollanoori, H. Shahraki, Y. Rahmati, and S. Teimourian, “CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment,” *Hum. Immunol.*, vol. 79, no. 12, pp. 876–882, 2018, doi: 10.1016/j.humimm.2018.09.007.
- [130] W. Hu *et al.*, “CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances human mesothelin-targeted CAR T cell effector functions,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 68, no. 3, pp. 365–377, 2019, doi: 10.1007/s00262-018-2281-2.
- [131] S. S. Wu, Q. C. Li, C. Q. Yin, W. Xue, and C. Q. Song, “Advances in CRISPR/Cas-based Gene Therapy in Human Genetic Diseases,” *Theranostics*, vol. 10, no. 10, pp. 4374–4382, 2020, doi: 10.7150/thno.43360.
- [132] W. L. Chew *et al.*, “A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response,” *Nat. Methods*, vol. 13, no. 10, pp. 868–874, 2016, doi: 10.1038/nmeth.3993.
- [133] S. S. C. Hung *et al.*, “AAV-Mediated CRISPR/Cas Gene Editing of Retinal Cells in Vivo,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 57, pp. 3470–3476, 2016, doi: 10.1167/iovs.16-19316.
- [134] D. Wang, F. Zhang, and G. Gao, “CRISPR-Based Therapeutic Genome Editing: Strategies and In Vivo Delivery by AAV Vectors,” *Cell*, vol. 181, no. 1, pp. 136–150, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.023.