

ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <https://doi.org/10.14201/fj2022725365>

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL DAÑO RENAL PRODUCIDO POR LOS INHIBIDORES DEL PUNTO DE CONTROL INMUNITARIO

Histological Evaluation of the Nephrotoxicity of Immune Checkpoint Inhibitors

Sara REVUELTA; Javier TASCÓN; Laura VICENTE-VICENTE; Alfredo G. CASANOVA; Ana I. MORALES; Marta PRIETO*

Unidad de Toxicología. Departamento de Fisiología y Farmacología. Edificio Departamental. Laboratorios 223-226. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca. España

Correo-e: martapv@usal.es*

RESUMEN: Los inhibidores del punto de control inmunitario (ICI) constituyen el grupo inmunoterapéutico más relevante del ámbito oncológico, pero no están exentos de efectos adversos. Las lesiones renales, aunque raras, empeoran el pronóstico. Actualmente existen combinaciones de inmunoterapia y quimioterapia que mejoran la eficacia, pero aumentan el riesgo de sufrir efectos secundarios nefrotóxicos. El objetivo fue la evaluación histológica del daño renal asociado a los ICI anti-CTLA-4 y anti-PD-1 en combinación con cisplatino.

Se diseñó un modelo experimental en ratones C57BL/6 tratados con la terapia combinada de cisplatino (10 mg/kg, dosis única) con anti-CTLA-4 o anti-PD-1 (10 o 15 mg/kg/día, durante 6 días). Se incluyeron grupos con las monoterapias de los fármacos y un grupo control. La evaluación del daño renal histológico se realizó de forma ciega siguiendo un protocolo de cuantificación de lesión tisular basado en una escala. Los datos fueron analizados con el programa estadístico IBM SPSS Statistics.

Los resultados mostraron daño renal tubular, más pronunciado en la corteza externa, asociado al tratamiento con cisplatino, mientras que no

hubo alteraciones estructurales en la monoterapia con ICI. El cotratamiento potenció el daño estructural renal del cisplatino. Esta potenciación fue más evidente en la región corticomedular, lo que sugiere que la combinación de fármacos provoca una lesión más profunda en el riñón.

Palabras clave: inhibidores del punto de control inmunitario (ICI); cisplatino; terapia combinada; daño renal; cuantificación histológica.

ABSTRACT: Immune checkpoint inhibitors (ICI) constitute the most relevant immunotherapeutic group in the oncology field, but they are not exempt from adverse effects. Renal lesions, although rare, worsen the prognosis. Currently there are combinations of immunotherapy and chemotherapy that improve efficacy but increase the risk of nephrotoxic side effects. The objective was the histological evaluation of renal damage associated with ICI anti-CTLA-4 and anti-PD-1 in combination with cisplatin.

An experimental model was designed in C57BL/6 mice treated with the combined therapy of cisplatin (10 mg/kg, single dose) with anti-CTLA-4 or with anti-PD-1 (both 10 or 15 mg/kg/day, for 6 days). Groups with drug monotherapies and a control group were included. Histological kidney damage assessment was performed blindly following a scale-based tissue injury quantification protocol. The data were analyzed with the statistical program IBM SPSS Statistics.

The results showed renal tubular damage, more pronounced in the outer cortex, associated with cisplatin treatment, while there were no structural alterations in monotherapy with ICI. Co-treatment potentiated renal structural damage from cisplatin. This potentiation was more evident in the corticomedullary region, so it seems that the drug combination causes a deeper injury in the kidney.

Keywords: Immune Checkpoint Inhibitors (ICI); cisplatin; combination therapy; kidney damage; histological quantification.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Cáncer y líneas de tratamiento*

La Sociedad Española de Oncología Médica define cáncer como un término que engloba numerosas enfermedades caracterizadas por el desarrollo de células anormales, que se dividen, crecen y se diseminan sin control en cualquier parte

del organismo. Esto puede formar masas, llamadas “tumores”, que destruyen a los tejidos sanos (SEOM, 2019).

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo. En 2020, se registraron 19,3 millones de casos y casi 10 millones de muertes, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2022).

El tratamiento que recibe cada paciente depende del tipo de cáncer y del estadio en que se encuentre. Algunos pacientes reciben un solo tratamiento, aunque la mayoría se someten a una combinación de estos (NIH, 2022).

1.2. *Inmunoterapia*

Los avances en el conocimiento de la respuesta inmune frente a los tumores, junto con el estudio de sus mecanismos de evasión, han conducido al diseño de nuevos tratamientos enfocados a potenciar la respuesta inmune y a aumentar la supervivencia de los pacientes (Cancer Research UK, 2021). Es el caso del tratamiento inmunoterápico basado en los inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI), anticuerpos capaces de bloquear moléculas que modulan dichos puntos (ASCO, 2020).

1.3. *Inhibidores del punto de control inmunitario (ICI)*

Los puntos de control inmunitario son proteínas reguladoras que forman parte del sistema inmunitario (SI) impidiendo que la respuesta inmunológica resulte desmesurada y destruya las células del organismo (NIH, 2022). Cuando los receptores de los linfocitos T reconocen los antígenos de superficie de una célula cancerosa, se activan para eliminarla, pero también es necesaria una señal de *stop* que asegure que no haya sobreactivación (De Francisco *et al.*, 2019). Existen dos vías de regulación de linfocitos T mediante receptores de inhibición: 1) antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y 2) receptor de muerte programada 1 (PD-1) (De Francisco *et al.*, 2019). Las vías de CTLA-4 y PD-1 actúan en diferentes etapas de la respuesta inmune.

Las células tumorales han desarrollado formas de evadir el SI integrando estos mecanismos (Buchbinder y Desai, 2016). El conocimiento de estas vías ha llevado al desarrollo de nuevos medicamentos, los ICI, que son: ipilimumab (anti-CTLA-4); atezolizumab, avelumab y durvalumab (anti-PD-L1); pembrolizumab y nivolumab (anti-PD-1) (Buchbinder y Desai, 2016).

1.4. Toxicidad derivada del uso de ICI

La inmunoterapia (IT) mejora la respuesta en cánceres que no responden a la quimioterapia (QT). Aumenta su eficacia, disminuye la probabilidad de recaída y causa menos efectos secundarios (sus dianas farmacológicas se encuentran en el SI) (Booth, 2021).

Sin embargo, el tratamiento basado en ICI se asocia a efectos adversos derivados de una respuesta autoinmune (IrAEs), limitando su uso. Presentan toxicidad generalizada en la mayoría de los sistemas del organismo. Recientemente, se han aprobado terapias basadas en la combinación de IT y QT, las cuales mejoran la eficacia, pero aumentan el riesgo de sufrir efectos adversos (Perazella y Shirali, 2020).

1.5. Daño renal asociado a ICI

Una complicación de los ICI son los efectos adversos renales. Aunque la nefrotoxicidad es menos común que otras complicaciones, y apenas ha sido estudiada, se ha demostrado que los efectos renales empeoran el pronóstico de los pacientes. La incidencia de nefrotoxicidad en monoterapia es del 2 %, mientras que estudios basados en combinaciones demuestran un aumento de la toxicidad renal (El Rassy *et al.*, 2018). Estos efectos adversos incluyen daño renal agudo, proteinuria y anomalías electrolíticas. El daño renal agudo debido a nefritis tubulointersticial aguda es la lesión más común (Perazella y Shirali, 2020).

En nuestro laboratorio se ha puesto a punto un modelo experimental en ratón para caracterizar el daño renal asociado a los ICI en monoterapia y en combinación con cisplatino. La determinación de biomarcadores urinarios de daño renal subclínico pone de manifiesto que la terapia combinada de cisplatino con anti-CTLA-4 o anti-PD-1 presenta un efecto potenciador del daño renal funcional en comparación con los tratamientos en monoterapia (datos no publicados). Con base en estos resultados, nuestra hipótesis es que el daño funcional asociado al cotratamiento con ICI y cisplatino se acompaña de daño estructural renal.

2. OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo es la caracterización histológica del daño renal asociado a los ICI (anti-CTLA-4 y anti-PD-1) en monoterapia y en combinación con quimioterapia (cisplatino), en un modelo murino.

Los objetivos específicos fueron:

- 1) Establecer si el daño estructural renal asociado a los ICI es dosis-dependiente.

- 2) Determinar si existen diferencias entre el daño producido en distintas estructuras (glomérulos, túbulos, vasos e intersticio) y/o localizaciones renales (corteza externa, zona corticomedular y médula).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Modelo experimental*

Se emplearon ratones macho C57BL/6 de 8 semanas y peso medio de 25 gramos. En el *Anexo I* se encuentran los cronogramas asociados a los distintos grupos de tratamiento.

El día de sacrificio, los ratones se anestesiaron por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (100 mg/kg). Después se realizó una incisión en “V” en el abdomen y se abrió la cavidad torácica. Ambos riñones se extirparon y uno de ellos se fijó en formaldehído (3,7-4,0 % w/v) para realizar los estudios histológicos.

3.2. *Procesamiento de los riñones*

Los riñones fijados en formaldehído se procesaron con el fin de obtener cortes para realizar estudios estructurales renales.

Los riñones fueron enviados al Servicio de Patología Molecular Comparada de la Universidad de Salamanca. Fueron tratados en el procesador de tejidos con formol, xilol y alcoholes degradados hasta colocarlos en parafina líquida, formando bloques una vez que esta solidifica. Se hicieron cortes del tejido embebido en parafina de 2-3 μm con el microtomo. Para la tinción se desparafinaron las muestras. Tras ello se hidrataron, se sumergieron en hematoxilina, luego en eosina y se lavó con agua el exceso de colorante.

3.3. *Evaluación y cuantificación del daño histológico*

Los portas con los cortes se visualizaron al microscopio óptico de campo claro (Olympus31 multicabezal de 5 posiciones) acoplado a una cámara (Olympus DP70) y, posteriormente, se obtuvieron las fotografías con un aumento de 600X utilizando el programa informático DPController.

Se tomaron en total 420 fotografías de los riñones de los ratones de los 8 grupos experimentales. De cada riñón se tomaron 5 fotos de la región cortical externa y otras 5 de la región corticomedular. Se obvió la región medular, puesto que en la visualización general previa no se observó ninguna alteración en esta asociada a ninguno de los tratamientos.

La evaluación y la cuantificación se realizaron de forma ciega siguiendo un protocolo de cuantificación de daño renal histológico que se detalla a continuación.

Con el programa PowerPoint se dividió cada foto en 6 áreas iguales. Para evaluar el daño se asignó a cada área una puntuación:

- 0: sin daño
- 1: daño en hasta 1/3 del área
- 2: daño entre 1/3 y 2/3 del área
- 3: daño en más de 2/3 del área

Una vez obtenidas las puntuaciones de cada área se registraron en una hoja de Excel, donde se recopiló información referente a la identificación del riñón.

3.4. *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos fueron tratados del siguiente modo:

- 1) Cálculo de las medias de las puntuaciones de las 6 áreas de cada riñón.
- 2) Cálculo de la media de los valores obtenidos en todas las fotografías de un mismo riñón/zona evaluada (zona externa y zona corticomedular).
- 3) Cálculo de las medias de los valores de los riñones de un mismo grupo de tratamiento, así como el error estándar de la media.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa informático IBM SPSS Statistics. Se introdujeron como variables el grupo de tratamiento, el valor de cuantificación del daño renal y la identificación del ratón.

Para averiguar si los datos seguían una distribución normal o no normal se realizó la prueba de Shapiro-Wilk.

Si los datos seguían una distribución normal se aplicó el test ANOVA de un factor comparando medias y se realizó el test de Scheffe como post-hoc. En cambio, cuando eran no normales se aplicaron pruebas no paramétricas y se compararon medianas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

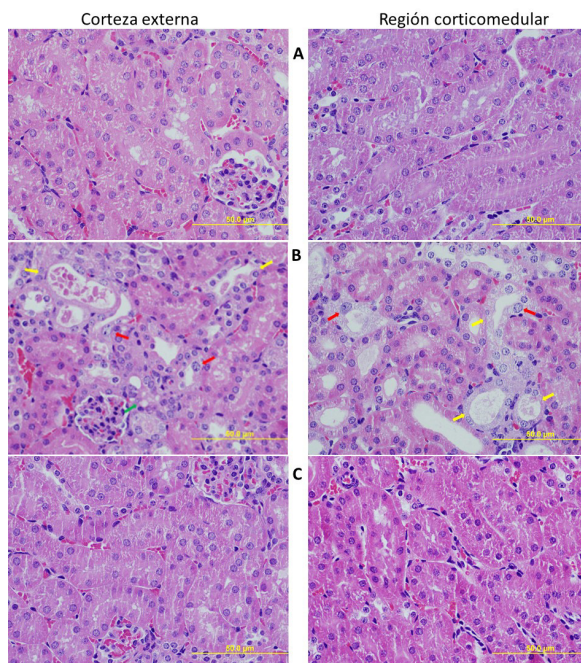
Finalmente, se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas entre grupos cuando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El daño histológico asociado a anti-CTLA-4 se valoró en los cortes de riñón teñidos con hematoxilina-eosina. Los resultados mostraron que el tratamiento con cisplatino causó alteraciones en los túbulos proximales y distales con acumulación

vacuolar y puntualmente agrandamiento nuclear (Figura 1B), mientras que la monoterapia con anti-CTLA-4 a las dosis estudiadas no causó alteraciones estructurales (Figura 1C); hay que señalar que estos ratones tampoco presentaron daño funcional renal (datos no mostrados). La combinación de ambos fármacos (Figuras 1D y 1E) parece provocar una potenciación del daño causado por el cisplatino, el cual parece ser dosis-dependiente ya que el aumento de dosis de anti-CTLA-4 (Figura 1E) acentuó el daño y su extensión. Se apreció un agrandamiento nuclear, además de desorganización y destrucción de los túbulos con acúmulo de contenido proteináceo, de manera similar en túbulos distales y proximales. En ocasiones se detectaron complejos apoptóticos (Figura 1E). Los glomerúlos estaban bien conservados y tampoco se observó daño en los vasos y en el intersticio asociado a ninguno de los tratamientos. Cabe destacar que no se evidenció daño en la región de la médula renal asociado a ninguno de los tratamientos.

Aunque el tratamiento con cisplatino cause lesiones renales estructurales (a dosis que no produce daño funcional evaluado no solo por creatinina, sino también por biomarcadores urinarios de daño renal temprano; datos no mostrados), estas son más acentuadas en la combinación de fármacos, pudiendo ser el ICI el responsable del aumento del daño.



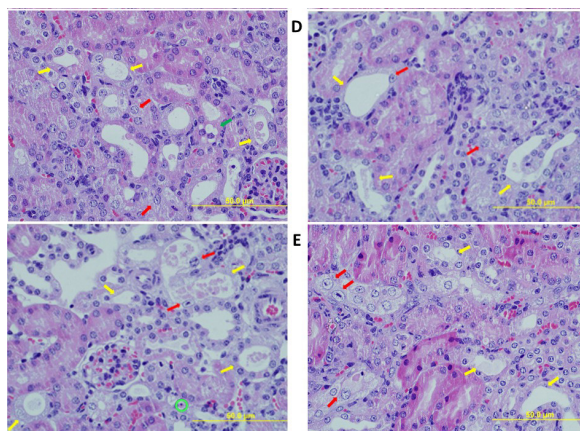


Figura 1. Valoración de la estructura renal tras el tratamiento con anti-CTLA-4 en monoterapia y combinado con cisplatino (CP). Imágenes representativas de los cortes de riñón teñidos con hematoxilina-eosina. A: control; B: cisplatino 10 mg/kg; C: anti-CTLA-4 20 mg/kg; D: cisplatino 10 mg/kg y anti-CTLA-4 10 mg/kg; E: cisplatino 10 mg/kg y anti-CTLA-4 15 mg/kg. La flecha verde señala una zona de acumulación vacuolar. Las flechas amarillas señalan daño tubular con dilatación tubular, en algunos casos, con depósitos de material hialino en la luz tubular. Las flechas rojas indican zonas de agrandamiento nuclear. El círculo verde señala células apoptóticas.

En el caso de los grupos de tratamiento con el otro ICI estudiado, anti-PD-1, la histología fue semejante a la de anti-CTLA-4; excepto la combinación de cisplatino 10 mg/kg + anti-PD-1 10 mg/kg, que produjo menos alteraciones estructurales en comparación con la misma dosis de anti-CTLA-4. La monoterapia del ICI no produjo alteraciones estructurales (Figura 2C). En la monoterapia por el cisplatino (Figura 2C) se observaron alteraciones en los túbulos proximales y distales, las cuales se van agravando con la combinación de fármacos (Figura 2E) con un aumento de la destrucción tubular, acumulación de depósitos proteináceos y agrandamiento nuclear. Igualmente se detectaron complejos apoptóticos (Figura 2E). Esto sugiere una potenciación del daño renal del cisplatino por el ICI.

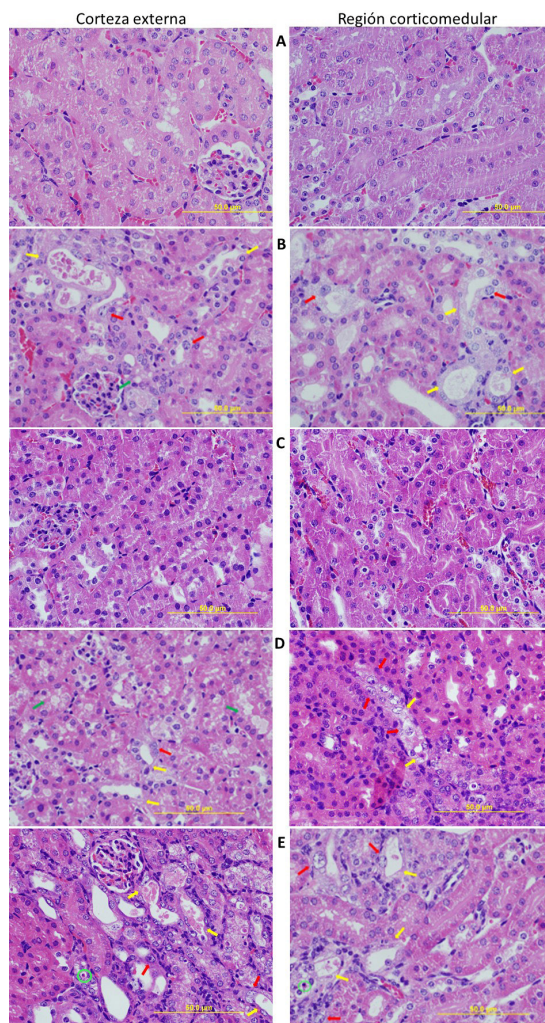


Figura 2. Valoración de la estructura renal tras el tratamiento con anti-PD-1 en monoterapia y combinado con CP. Imágenes representativas de los cortes de riñón teñidos con hematoxilina-eosina. A: control; B: cisplatino 10 mg/kg; C: anti-PD-1 20 mg/kg; D: cisplatino 10 mg/kg y anti-PD-1 10 mg/kg; E: cisplatino 10 mg/kg y anti-PD-1 15 mg/kg. Las flechas verdes señalan una zona de acumulación vacuolar. Las flechas amarillas señalan zonas representativas de daño tubular con dilatación tubular, en algunos casos, con depósitos de material hialino en la luz tubular. Las flechas rojas indican zonas de agrandamiento nuclear. El círculo verde señala células apoptóticas.

Tras la cuantificación del daño histológico en la corteza renal, se representaron gráficamente los datos obtenidos (datos no mostrados). Se observó que la monoterapia con ICI no causa daño estructural, a las dosis y tiempos estudiados. Esto concuerda con la bibliografía existente, ya que los IrAEs que afectan al riñón ocurren raramente en el tratamiento con ICI (Spiers *et al.*, 2019). La monoterapia del cisplatino causa daño, el cual se ve aumentado en las combinaciones con el ICI [lo que ya ha sido demostrado (El Rassy *et al.*, 2018)]; a excepción de la combinación del cisplatino con la dosis de anti-PD-1 más baja, que no parece que se potencie el daño por cisplatino, puede ser que no haya potenciación a esa dosis. Esta potenciación del daño por el ICI es significativa en la combinación con la dosis más alta de ICI respecto a la monoterapia de anti-CTLA-4 y anti-PD-1, lo cual sugiere que podría ser dosis-dependiente.

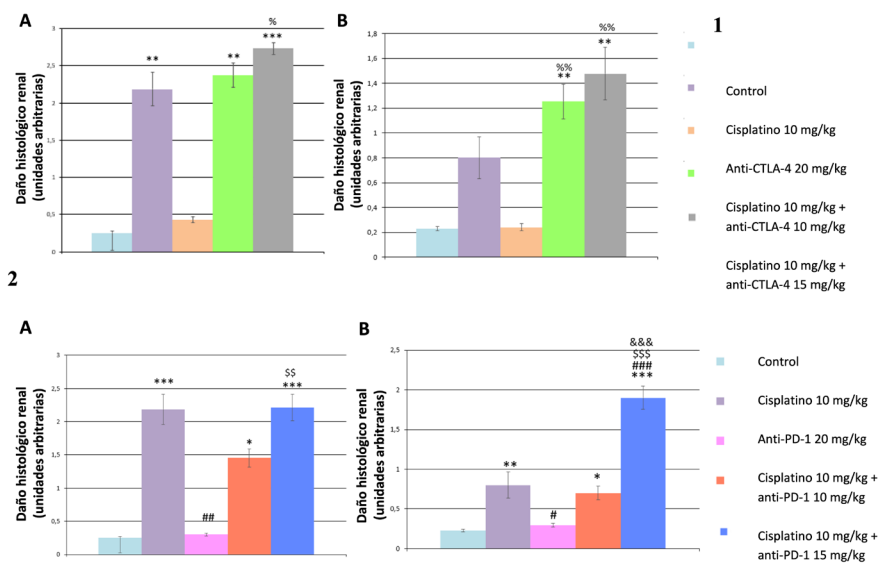


Figura 3. Cuantificación del daño histológico en (1) el modelo de anti-CTLA-4 y en (2) el modelo de anti-PD-1 en (A) la corteza externa y en (B) la región corticomedular. Escala de cuantificación: 0, sin daño; 1, daño en hasta 1/3 del área cuantificada; 2, daño entre 1/3 y 2/3 del área cuantificada; 3, daño en más de 2/3 del área cuantificada. (1) Diferencias estadísticamente significativas vs. grupo control: **p < 0,01; ***p < 0,001; vs. Grupo anti-CTLA-4 20 mg/kg: %p < 0,05; %%p < 0,01. N = 5, excepto en el grupo control (n = 7). (2) Diferencias estadísticamente significativas vs. grupo control: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; vs. grupo cisplatino 10 mg/kg: #p < 0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001; vs. grupo anti-PD-1 20mg/kg: \$p < 0,01; \$\$\$p < 0,001; vs. grupo cisplatino 10 mg/kg + anti-PD-1 10 mg/kg: &&&p < 0,001. N = 5, excepto en el grupo control (n = 7).

El daño causado por el cisplatino fue más intenso en la corteza externa sin producir casi alteraciones en la región corticomedular (Figura 3.1.B y 3.2.B). Existen estudios que también han demostrado que las lesiones por cisplatino más prominentes se producen en la corteza externa (Figura 3.1.A y 3.2.A) (Prost y Cinat, 2017). La combinación de fármacos genera un daño más extenso, es decir, el daño se extiende más hacia la región corticomedular que en la monoterapia con el cisplatino. Esto se podría explicar por un mayor efecto potenciador del ICI en la región corticomedular.

La terapia combinada de QT e IT puede proporcionar beneficios antineoplásicos superiores al uso de estos individualmente (El Rassy *et al.*, 2018; Spielbauer *et al.*, 2018). Sin embargo, la potenciación del daño renal resultante de la combinación se ha descrito en diversos estudios (Dumoulin *et al.*, 2020; Puzanov *et al.*, 2017). Actualmente, la nefrotoxicidad asociada a la IT y su combinación con la QT no se conoce en profundidad. Con este estudio se ha logrado un modelo preclínico que ha permitido estudiar el daño histológico renal asociado a los ICI en combinación con cisplatino. Este modelo permitirá el estudio de sus mecanismos de toxicidad, así como la búsqueda de biomarcadores asociados al daño. Dichos biomarcadores pueden proporcionar información relativa a las lesiones renales que evitaría la necesidad de realizar biopsias diagnósticas en la práctica clínica.

5. CONCLUSIONES

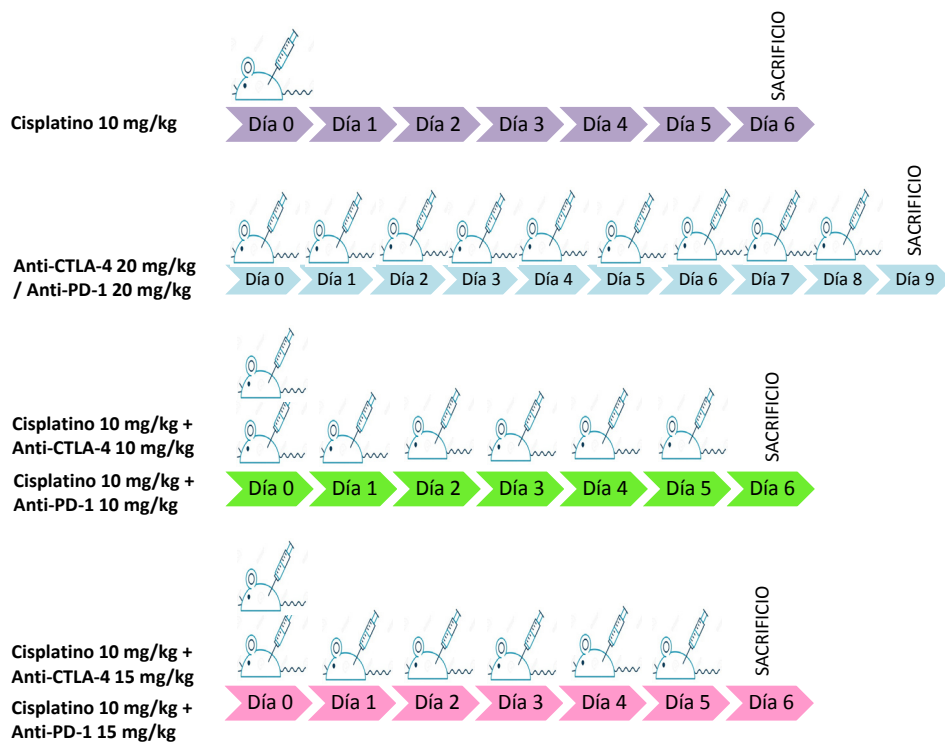
1. La IT basada en anti-CTLA-4 o anti-PD-1 no produce daño histológico por sí misma en nuestro modelo experimental.
2. La combinación de cisplatino con anti-CTLA-4 o anti-PD-1 potencia el daño renal causado por cisplatino.
3. Las alteraciones estructurales renales son mayores en la corteza externa, sin embargo, la potenciación por los ICI es más pronunciada en la región corticomedular.
4. La potenciación del daño observado podría ser dosis-dependiente, tanto en el caso de anti-CTLA-4 como de anti-PD-1.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *J. Clin. Oncol.* 2016; 39(1):98-106.
- Cancer.Net [Internet]. EE. UU.: American Society of Clinical Oncology; 2020 [actualizado may 2020; citado 5 abr 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atencion-del-cáncer/cómo-se-trata-el-cáncer/inmunoterapia/qué-es-la-inmunoterapia>

- Cancer Research UK [Internet]. Londres: Cancer Research UK; 2021 [actualizado 20 ene 2021; citado 5 abr 2022]. Disponible en: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/immunotherapy/what-is-immunotherapy>
- De Francisco ALM, Macía M, Alonso F, García P, Gutiérrez E, Quintana LF et al. Onco-Nefrología: cáncer, quimioterapia y riñón. *Nefrología*. 2019; 39(5):473-481.
- Dumoulin DW, Visser S, Cornelissen R, van Gelder T, Vansteenkiste J, von der Thusen J et al. Renal Toxicity From Pemetrexed and Pembrolizumab in the Era of Combination Therapy in Patients With Metastatic Nonsquamous Cell NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2020; 15(9):1472-1483.
- El Rassy E, Bakouny Z, Yared F, Chelala DN, El Karak F, Ghosn M. The nephrotoxicity of immune checkpoint inhibitor-based combinations. *Eur J Cancer*. 2018; 103:274-278.
- Perazella MA, Shirali AC. Immune checkpoint inhibitor nephrotoxicity: what do we know and what should we do? *Kidney Int*. 2020; 97(1):62-74.
- Prost, DM, Cinat, G. Manejo de toxicidades por inmunoterapia. *Puesta al día*. 2017; 22:46-51.
- Puzanov I, Diab A, Abdallah K, Bingham CO, Brogdon C, Dadu R et al. Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group. *J Immunother Cancer*. 2017; 5(1):95.
- Spielbauer K, Cunningham L, Schmitt, N. PD-1 Inhibition Minimally Affects Cisplatin-Induced Toxicities in a Murine Model. *Sage Journals*. 2018; 159(2):343-346.
- Spiers L, Coupe N, Payne M. Toxicities associated with checkpoint inhibitors—an overview. *Rheumatology*. 2019; 58(7):7-16.
- Who.int [Internet]. World Health Organization; 2022 [actualizado 2 feb 2022; citado 5 abr 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

ANEXO I: modelo experimental



Cronogramas de los modelos experimentales: el cisplatino se administró a dosis única el primer día del experimento y los ICI con pauta diaria.

