

ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <https://doi.org/10.14201/fj202491717>

## NEFROTOXICIDAD ASOCIADA A LA COMBINACIÓN DE CISPLATINO E INHIBIDORES DEL PUNTO DE CONTROL INMUNITARIO. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

### *Nephrotoxicity Associated with the Combination of Cisplatin and Immune Checkpoint Inhibitors. Histopathological Study*

Julia AUSIN; Javier TASCÓN; Alfredo G. CASANOVA; Laura VICENTE-VICENTE; Ana I. MORALES; Marta PRIETO

Área de Toxicología. Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca

\*Correo-e: [martapv@usal.es](mailto:martapv@usal.es)

**RESUMEN:** La introducción en terapéutica de los inhibidores del punto de control inmunitario (anti-CTLA-4 y anti-PD-1) como terapias dirigidas (inmunoterapia) han mejorado el perfil de eficacia y seguridad de los tratamientos oncológicos. Sin embargo, estos no están exentos de producir efectos adversos, entre los que se encuentran las lesiones renales. El objetivo de este trabajo fue la evaluación histológica del daño renal asociado a anti-CTLA-4 y anti-PD-1 en combinación con cisplatino, en un modelo murino. Se diseñó un modelo experimental en ratones C57BL/6 tratados con la terapia combinada de anti-CTLA-4 y anti-PD-1, así como terapia triple combinada de anti-CTLA-4, anti-PD-1 y cisplatino. Se incluyeron también grupos tratados con las monoterapias de los fármacos y un grupo control. Tras el sacrificio (día 6) se realizaron cortes histológicos renales y se tiñeron con hematoxilina-eosina. La evaluación del daño renal histológico se realizó de forma ciega siguiendo un protocolo de cuantificación de lesión tisular basado en una escala numérica. Los datos obtenidos fueron analizados con

el programa estadístico SPSS. Los resultados mostraron daño renal tubular significativo asociado a la terapia combinada de cisplatino con anti-CTLA-4 y anti-PD-1, potenciando estos últimos el daño producido por el cisplatino en monoterapia. Este modelo permitirá investigar los mecanismos de toxicidad involucrados, así como identificar posibles biomarcadores urinarios que se asocien con el daño renal producido por estas terapias.

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

**ABSTRACT:** The introduction of immune checkpoint inhibitors (anti-CTLA-4 and anti-PD-1) as targeted therapies (immunotherapy) has improved the efficacy and safety profile of cancer treatments. However, they are not free of adverse effects, including renal injury. The aim of this work was the histological evaluation of renal damage associated with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 in combination with cisplatin in a murine model. An experimental model was designed in C57BL/6 mice treated with combined anti-CTLA-4 and anti-PD-1 therapy, as well as combined triple therapy of anti-CTLA-4, anti-PD-1 and cisplatin. Groups treated with the drug monotherapies and a control group were also included. After sacrifice (day 6), renal histological sections were performed and stained with haematoxylin-eosin. Histological renal damage assessment was performed in a blinded fashion following a tissue injury quantification protocol based on a numerical scale. The data obtained were analysed using SPSS statistical software. The results showed significant renal tubular damage associated with the combined therapy of cisplatin with anti-CTLA-4 and anti-PD-1, the latter enhancing the damage produced by cisplatin monotherapy. This model will allow us to investigate the mechanisms of toxicity involved, as well as to identify possible urinary biomarkers associated with the renal damage produced by these therapies.

*Keywords:* Immune checkpoint inhibitors (ICIs); cisplatin; combination therapy; renal damage; histological quantification.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los quimioterápicos constituyen un grupo muy amplio de fármacos que basan su acción en el efecto citotóxico que producen de manera inespecífica en células que se encuentren en división activa. Dentro de ellos, los compuestos platinados son quimioterápicos del grupo de los agentes alquilantes cuyo mecanismo de acción produce cambios en la estructura helicoidal del ácido desoxirribonucleico

por afectación del proceso de replicación y transcripción, conduciendo a la muerte celular programada o apoptosis (López *et al.*, 2013). La efectividad de este tipo de terapias se ve comprometida por su elevada toxicidad hacia células no neoplásicas. En concreto, el uso de platinados conlleva una elevada tasa de nefrotoxicidad asociada, entre otras causas, al efecto de su metabolito aniónico de tipo tiol, que constituye una potente nefrotoxina. Así mismo, se han descrito mecanismos que agravan esta nefrotoxicidad como procesos de inflamación, estrés oxidativo, el aumento de los niveles nucleares del gen p53 o el aumento de la expresión de la enzima gamma glutamil transferasa en células renales (Calderón-Ospina *et al.*, 2011). En consecuencia, los túbulos distales y el aparato yuxtaglomerular se verán afectados pudiéndose originar daño renal agudo por necrosis tubular extensa y, en tratamientos más prolongados, afectación intersticial secundaria conduciendo a enfermedad renal crónica (Ricaurte-Sarabia y Villalobos, 2019).

Los inhibidores del punto de control inmunitario o ICI son un grupo de fármacos considerados como terapias dirigidas frente al cáncer. Estos forman parte de la estrategia terapéutica denominada inmunoterapia, la cual actúa sobre la capacidad de evasión del sistema inmune que presentan las células neoplásicas, ya que, debido a su elevada inestabilidad genética, la progresión tumoral se guía por la capacidad de adaptación selectiva al microambiente tumoral. Este proceso de inmuoedición conlleva la reducción de la inmunogenicidad de estas células. Así mismo, se produce un efecto inmunosupresor por la expresión en membrana y/o secreción de moléculas con esta actividad y por el aumento del reclutamiento de células mieloides y linfoides en el microambiente tumoral (Vasquez *et al.*, 2020). Como terapias dirigidas, los ICI están diseñados para actuar sobre dos dianas específicas expresadas sobre la membrana de las células tumorales: CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) y PD1 (proteína 1 de muerte celular programada) o PD-L1 (su ligando). Así, se han desarrollado anticuerpos monoclonales capaces de identificar estos antígenos y bloquearlos. Por un lado, el ipilimumab con actividad anti-CTLA-4 provoca la desactivación de la señal inhibitoria de la célula T, favoreciendo la activación y proliferación de las células T efectoras. Por otro lado, pembrolizumab y nivolumab con actividad anti-PD1 y atezolizumab y avelumab con actividad anti-PD-L1 actúan aumentando la respuesta de las células T antitumorales, bloqueando la interacción entre PD1 y PD-L1, evitando así la inactivación de las células T (Darvin *et al.*, 2018).

Los ICI han mejorado el perfil de eficacia y seguridad de los tratamientos oncológicos. Sin embargo, el aumento de la respuesta inmunitaria frente al tumor producido por el uso de estos fármacos también se asocia a un conjunto de efectos secundarios denominados acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (iRAE), siendo estos principalmente diarrea, colitis, hepatitis, toxicidad cutánea y endocrinopatías como hipofisitis y disfunción tiroidea. Aunque

la lesión renal asociada a estos fármacos no es frecuente, sí se reconocen dentro de los iRAE algunos fenómenos como la elevación de la creatinina, la nefritis autoinmune o la nefritis intersticial (Spain *et al.*, 2016). En la actualidad es habitual que los ICI se indiquen en tratamiento combinado con otras estrategias terapéuticas como la quimioterapia. A pesar de presentar un efecto sinérgico a nivel de acción farmacológica, su combinación también resulta en una potenciación de la toxicidad producida de manera individual por cada uno de los fármacos. Por este motivo, la adición de quimioterapia adyuvante a la inmunoterapia debe hacerse a dosis bajas y utilizando un único principio activo para minimizar los efectos secundarios (Welsh *et al.*, 2021).

El daño renal derivado de estas terapias puede conllevar alteraciones renales funcionales y estructurales. El diagnóstico del daño funcional se evalúa mediante los biomarcadores plasmáticos y urinarios, entre los que se encuentran los biomarcadores clásicos (creatinina y urea) y los tempranos o subclínicos (NGAL, KIM-1, albúmina..., entre otros) (Abril *et al.*, 2023); por otra parte, el diagnóstico del daño estructural se lleva a cabo a través del examen histopatológico. Para su realización es necesaria una biopsia, técnica que resulta altamente invasiva para el paciente y no exenta de complicaciones. Sin embargo, en la actualidad para diagnosticar el daño renal por ICI es necesaria dicha biopsia, ya que los biomarcadores no son específicos del daño producido por estos fármacos. Así mismo, en el contexto del tratamiento del paciente oncológico es necesario el diagnóstico etiológico del daño renal, permitiendo así personalizar el tratamiento: retirando el fármaco en caso de daño o disminuyendo su dosis.

El objetivo del presente trabajo es la caracterización del daño estructural renal producido por los ICI y el tratamiento combinado de ICI con cisplatino identificando el tipo de daño y estudiando cuáles son las localizaciones renales afectadas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. *Modelo experimental*

Se emplearon ratones macho C57BL/6 de 8 semanas y peso medio de 25 gramos. El cisplatino se administró por vía intraperitoneal (i. p.) en dosis única tanto en la terapia individual como en la combinada, mientras que los ICI fueron administrados diariamente en todos los grupos experimentales, según el cronograma recogido en la Figura 1. Una vez terminados los tratamientos se llevó a cabo el sacrificio mediante la inyección i. p. de pentobarbital sódico (100 mg/kg). Se extirparon ambos riñones, fijándose uno de ellos en formaldehído (3,7-4,0 % w/v) para el posterior estudio histológico.



Figura 1. Cronogramas de los modelos experimentales.

## 2.2. Procesamiento de los riñones

Los riñones fijados en formaldehído se enviaron al Servicio de Patología Molecular Comparada de la Universidad de Salamanca para su procesamiento. Las muestras se trataron con formol, xilol y alcoholes degradados y se solidificaron utilizando parafina líquida. Para la observación al microscopio se realizaron cortes del tejido de 2-3  $\mu\text{m}$  con el micrótomos, que se sumergieron en agua a 50 °C para evitar la formación de pliegues. Posteriormente, se secaron en estufa a 60 °C durante 30 minutos. Tras el secado se llevó a cabo la tinción hematoxilina-eosina, tras la cual los núcleos celulares adquieren color azul, los citoplasmas se tiñen de rosa, los glóbulos rojos de naranja o rojo y la fibrina presenta un color rosa intenso.

## 2.3. Evaluación y cuantificación del daño histológico

Tras la tinción, los cortes se observaron al microscopio óptico Olympus CX31 de campo claro acoplado a una cámara Olympus DP70 (Olympus Optical, Tokyo). Las fotografías se realizaron con un aumento de 600X utilizando el programa informático DPController. Se tomaron en total 280 fotografías correspondientes a los 5 grupos experimentales indicados en la Figura 1. De cada riñón se tomaron 10 fotografías, 5 de la región cortical externa y 5 de la región corticomédular.

La evaluación y la cuantificación del daño renal histológico se realizaron de forma ciega dividiendo cada imagen en 6 áreas iguales. Para cuantificar el daño en cada área se le asignó una puntuación de 0 a 3, siendo 0 la ausencia de daño

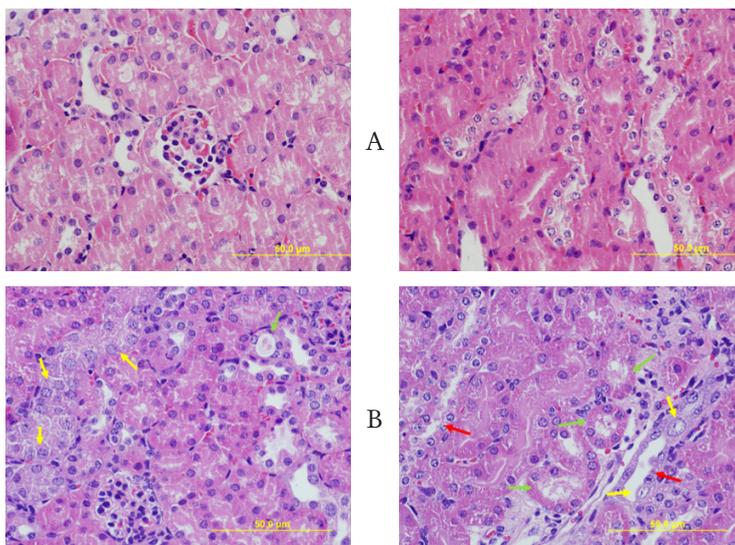
renal, 1 daño renal inferior a 1/3 del área, 2 daño entre 1/3 y 2/3 del área y 3 daño superior a 2/3 del área.

#### 2.4. Tratamiento de los datos y análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa IBM SPSS Statistics 27.0. Se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos y una prueba de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias entre muestras ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 2 muestra algunas de las fotografías recogidas para el grupo control y los diferentes tratamientos. El tratamiento con cisplatino 5mg/kg (Figura 2B) administrado en monoterapia causó alteraciones leves y puntuales en los túbulos proximales y distales, con presencia esporádica de contenido proteináceo en su interior y existencia de agrandamiento celular, aunque de manera focal. Sin embargo, para los tratamientos en monoterapia de anti CTLA-4 20mg/kg (Figura 2C) y anti PD-1 20mg/kg (Figura 2D) y para la terapia combinada doble de ambos ICI (anti CTLA-4 20mg/kg/día y anti PD-1 20mg/kg/día) (Figura 2E) no se observaron alteraciones estructurales reseñables a las dosis estudiadas.



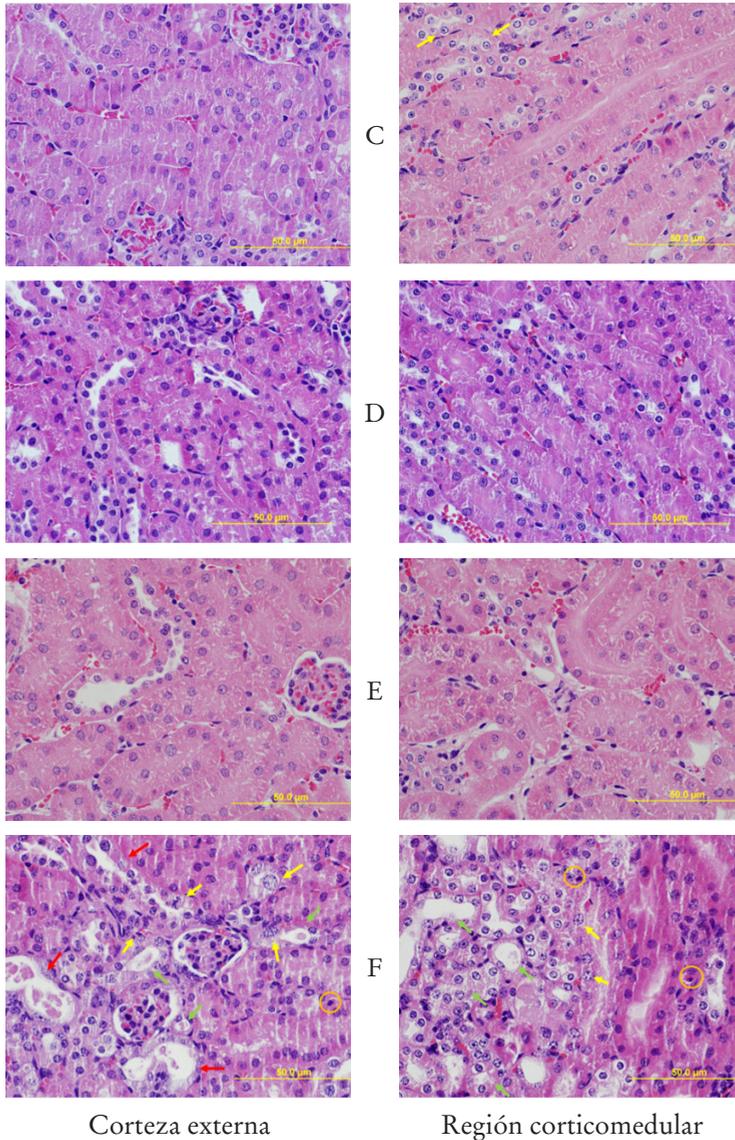
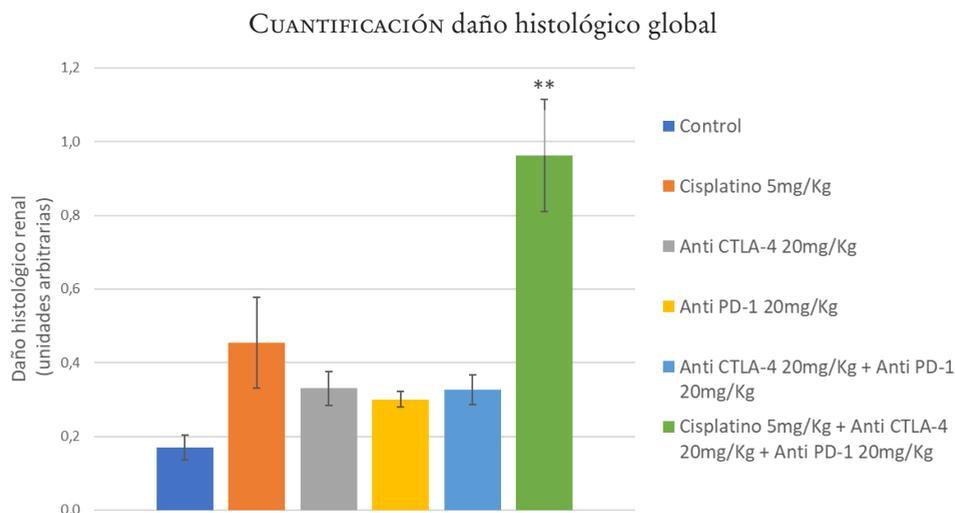


Figura 2. Cortes de tejido renal teñidos con hematoxilina-eosina. A: control; B: cisplatino 5 mg/kg; C: anti CTLA-4 20mg/kg; D: anti PD-1 20mg/kg; E: anti CTLA-4 20mg/kg y anti PD-1 20mg/kg; F: cisplatino 5mg/kg, anti CTLA-4 20mg/kg y anti-PD-1 20mg/kg. Las flechas rojas señalan daño tubular distal, en algunos casos, con depósitos de material hialino en la luz

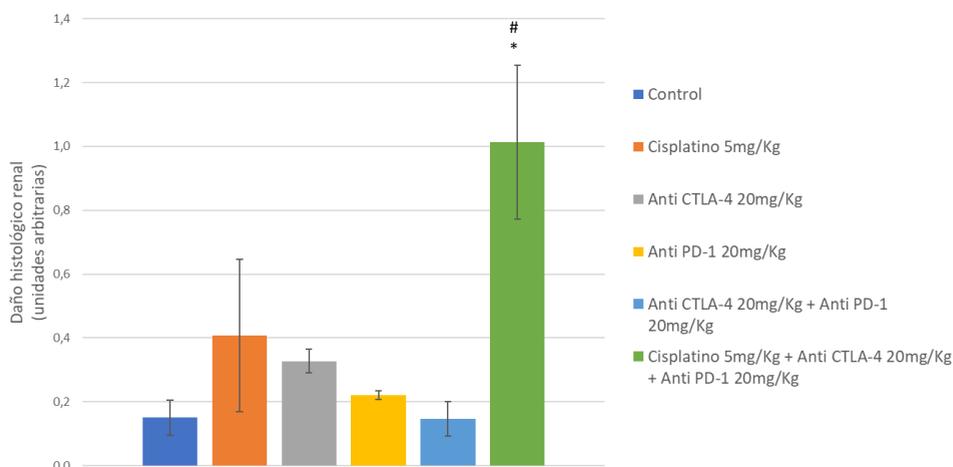
tubular. Las flechas verdes señalan daño tubular proximal, también con material hialino en algunos casos. Las flechas amarillas indican zonas de agrandamiento nuclear. Los círculos naranjas indican células apoptóticas.

Por su parte, los resultados para la triple terapia combinada de cisplatino e ICI (cisplatino 5 mg/kg, anti-CTLA-4 20 mg/kg/día y anti-PD-1 20 mg/kg/día) (Figura 2F) presentaban un extenso daño tanto en los túbulos proximales como distales, acentuándose tanto la desorganización y la destrucción tubulares como el acúmulo de contenido proteináceo observados en la monoterapia con cisplatino. Así mismo, se detectó una mayor extensión de hipertrofia celular e incluso la existencia de complejos apoptóticos. Estos resultados sugieren una posible potenciación del daño renal, propio del tratamiento con cisplatino, por parte de los ICI. Cabe destacar que en ninguno de los tratamientos se observó alteración en los vasos sanguíneos ni en el intersticio y en todos los casos los glomérulos se encontraban bien conservados.

La Figura 3 recoge la cuantificación del daño histológico. Se observa que tanto la monoterapia con ICI como la terapia combinada de estos no causan daño estructural a la dosis y tiempo de estudio. Estos resultados concuerdan con los descritos por Spiers *et al.* (2019), que indican que la afectación renal ocurre raramente con este tipo de terapias.



### CUANTIFICACIÓN daño histológico en la corteza externa



### CUANTIFICACIÓN daño histológico en la región corticomedular

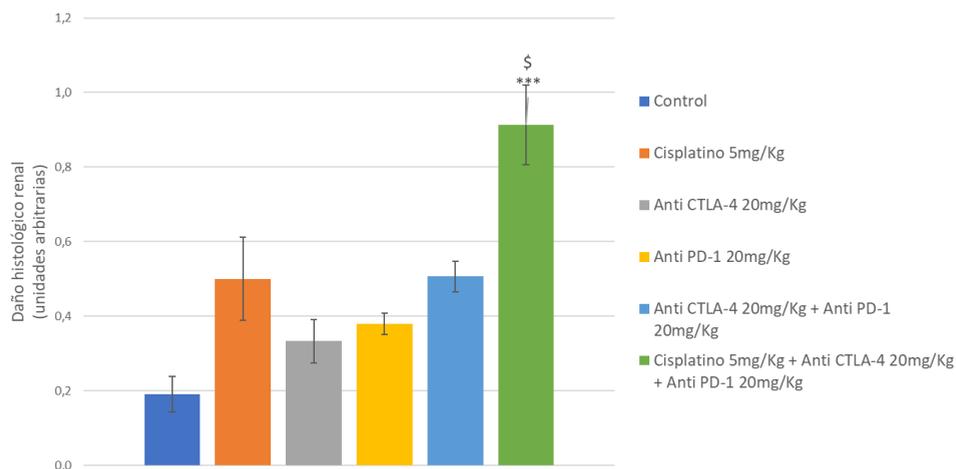


Figura 3. Cuantificación del daño histológico. Los símbolos muestran diferencias significativas respecto al grupo control \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \$ respecto al grupo anti CTLA-4 ( $p < 0,05$ ), # respecto al grupo anti CTLA-4 + anti PD-1 ( $p < 0,05$ ).

La monoterapia con cisplatino 5mg/kg tampoco produce daño estructural, sin embargo, se puede observar una tendencia al alza respecto al tratamiento con inmunoterapia. Esto puede responder a la nefrotoxicidad ampliamente descrita

del cisplatino que, sin embargo, administrado a una dosis terapéutica para el ratón, produce un daño renal mínimo (Yao *et al.*, 2007; Méndez *et al.*, 2014). La terapia triple combinada causa daño renal estadísticamente significativo respecto al grupo control. Por tanto, se sugiere una potenciación del daño en el tratamiento combinado de quimioterapia e inmunoterapia, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Abdel-Rahman y Fouad (2016).

Comparando la afectación renal en la corteza externa (Figura 3b) y en la región corticomedular (Figura 3c) se observa una tendencia al alza en esta última para los tres grupos de tratamiento con ICI. Alonso *et al.* (2022) pusieron de manifiesto que los ICI producen un efecto mayor sobre la región corticomedular. Así mismo, esta afectación es ligeramente superior en la terapia combinada de ICI con respecto a las monoterapias, lo que sugiere un posible efecto potenciador del daño renal en administración concomitante de ambos fármacos. El uso de la terapia combinada de quimioterapia e inmunoterapia puede ofrecer beneficios superiores en comparación con su uso individual, tal y como indican Dumoulin *et al.* (2020). Sin embargo, estudios previos (Rassy *et al.*, 2018) han puesto de manifiesto un aumento en el daño renal debido a esta combinación. Los resultados obtenidos muestran una gran variabilidad interindividual dentro de cada grupo experimental por lo que será necesario continuar investigando en este modelo incrementando el número de animales para cada grupo.

#### 4. CONCLUSIONES

Actualmente, existe un limitado conocimiento acerca de la nefrotoxicidad asociada al uso de ICI. El desarrollo de este modelo preclínico ha permitido el estudio del daño histológico renal asociado a estas terapias, así como a su combinación con cisplatino. Este modelo permitirá investigar los mecanismos de toxicidad involucrados, así como identificar biomarcadores urinarios que se asocien con el daño renal producido por estas terapias. El hallazgo de estos marcadores proporcionaría un diagnóstico diferencial del daño evitando la necesidad de realizar biopsia.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman O, Fouad M. A network meta-analysis of the risk of immune-related renal toxicity in cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Immunotherapy*. 2016;8(5):665-74.
- Abril A, Tascón J, Vicente-Vicente L, Casanova AG, Prieto M, Morales AI. Caracterización funcional del daño renal asociado a la inmunoterapia oncológica. *FarmaJournal*. 2023;8(1):7-19.

- Alonso F, Martín de Francisco ÁLM, Auñón P, García-Carro C, García P, Gutiérrez E *et al.* Efectos renales adversos por inhibidores del check-point (ICP) en pacientes con cáncer. Recomendaciones del grupo de Onco nefrología de la Sociedad Española de Nefrología (SEN). Nefrología [Internet]. [citado 8 may. 2023]. Disponible en: <http://www.revistanefrologia.com/es-efectos-renales-adversos-por-inhibidores-avance-S0211699522001990>
- Calderón-Ospina CA, Guzmán-Ramírez GM, Sarmiento-Monroy JC, Gómez-Angulo DL, Joya-Higuera AY, Ríos-Barajas LF *et al.* Nefrotoxicidad inducida por medicamentos. Médicas UIS [Internet]. 26 de abril de 2011 [citado 6 abr. 2023];24(1). Disponible en: <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistamedicasuis/article/view/2583>
- Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med.* 2018;50(12):1-11.
- 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):1472-83.
- López JM, Ensuncho AE, Robles J. Estudio Teórico de la Reactividad Química y Biológica de Cisplatino y algunos Derivados con Actividad Anticancerosa. *Inf Tecnológica.* 2013;24(3):3-14.
- Méndez JDM, Hernández JSC, Plazas WDE, López EFB. Nefrotoxicidad por cisplatino en pacientes de la unidad de cancerología del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva. *RFS Rev Fac Salud.* 2014;6(2):39-44.
- Rassy EE, Bakouny Z, Yared F, Chelala DN, Karak FE, Ghosn M. The nephrotoxicity of immune checkpoint inhibitor-based combinations. *Eur J Cancer.* 2018;103:274-8.
- Ricaurte Sarabia M, Villalobos J. Efecto nefrotóxico causado por cisplatino mediante su acumulación a través de proteínas transportadoras. *Vitae Acad Bioméd Digit.* 2019;(78):3.
- Spain L, Diem S, Larkin J. Management of toxicities of immune checkpoint inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2016;44:51-60.
- Spiers L, Coupe N, Payne M. Toxicities associated with checkpoint inhibitors—an overview. *Rheumatology.* 2019;58(Supplement 7) 7-16.
- Vasquez L, Castro D, León J de, Beltrán B. Inmunoterapia en cáncer: de los inicios al premio Nobel. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2020;37:115-21.
- Welsh J, Paul. D. What to Know About Adjuvant Therapies [Internet]. Verywell Health. 2021 [citado 7 abr. 2023]. Disponible en: <https://www.verywellhealth.com/adjuvant-therapy-5198903>
- Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. *Am J Med Sci.* 2007;334(2):115-24.

