

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



## *ESTUDIO DE CÉLULAS INMUNOSUPRESORAS Y BIOMARCADORES CIRCULANTES EN CARCINOMA RENAL*

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: Alicia García Giménez

TUTOR/A: José Javier Forment Millet y Jaime Font de Mora Sainz

*Curso Académico: 2º*

VALENCIA, 30 de Junio de 2018

## Resumen

El carcinoma de células renales metastásico (CCR) y el uso del Sunitinib como terapia antiangiogénica de primera línea han sido ampliamente estudiados. El enfoque del presente estudio es la búsqueda de biomarcadores circulantes en sangre de pacientes con CCR y células inmunosupresoras que predigan el pronóstico y la respuesta a Sunitinib. Por ello se valoran las proteínas relacionadas con la angiogénesis, como el VEGF, con la inflamación y la carcinogénesis, como la IL-6 o el TNF- $\alpha$ , o con la inmunosupresión, como en el caso del S100A9. Se busca una correlación de dichas proteínas con el pronóstico del paciente teniendo en cuenta tanto su respuesta como su supervivencia libre de progresión y supervivencia global. Los niveles de células inmunosupresoras y de determinados metabolitos también se correlacionan con dichos parámetros.

### *Palabras clave:*

Carcinoma renal, Biomarcadores, MDSCs, Tregs, Sunitinib, Citoquinas

## Agradecimientos

Este Trabajo Fin de Máster ha sido posible gracias al apoyo y ayuda de muchas personas a las que me gustaría dar mi agradecimiento. Dar las gracias a todo el personal del área de Cáncer traslacional del IIS La Fe por dejarme formar parte de su fantástico equipo, y al área de citómica por su ayuda y formación.

<b>Tabla de contenido</b>	
Resumen.....	2
Abreviaturas.....	5
1. Introducción.....	6
2. Objetivos e hipótesis.....	11
3. Materiales y métodos .....	11
3.1.Adquisición de muestras.....	11
3.2.Análisis de proteínas en suero .....	12
3.3.Citometría.....	12
3.4.Metabolómica. ....	13
3.5.Análisis de datos y estadística.....	14
4. Resultados y discusión de los resultados.....	14
4.1.Características de los pacientes .....	14
4.2.Análisis de proteínas en suero .....	17
4.3.Citometría.....	20
4.4.Análisis de metabolitos .....	23
5. Conclusiones .....	29
6. Referencias Bibliográficas .....	30
7. Anexos.....	34
Información suplementaria .....	34

## Abreviaturas

ANG: Angiopoyetina-2	NIH: <i>National Institutes of Health</i> , Instituto nacional de la salud (USA)
ANGPT2: angiopoyetina-2	NOS: <i>Nitric Oxide Synthase</i> , sintasa de óxido nítrico.
ARG1: Arginasa	NS: No significativo
CCR: Carcinoma de células renales	ON: Óxido nítrico
EE: Enfermedad estable	PCA: <i>Principal Component Analysis</i> , Análisis de componentes principales.
EMA: European Medicines Agency	PE: Enfermedad progresiva
e-MDSC: Células MDSC tempranas o <i>early</i> .	PLSDA: <i>Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i> , Análisis Discriminante Mínimos Cuadrados Parciales.
Endocan: <i>Endothelial Cell-Specific Molecule-1</i>	PMN-MDSC: Células MDSC polimorfonucleares
ESM-1: <i>Endocan, Endothelial Cell-Specific Molecule-1</i>	RC: Respuesta Completa
FDA: Food and Drug Administration	RP: Respuesta parcial
FSC: Forward Scatter	S100A9: S100 calcium-binding protein A9
GCSF: <i>Granulocyte colony stimulating factor</i> , Factor estimulante de colonias de granulocitos.	SDF-1: <i>Stromal-Cell Derived Factor 1</i>
HIF: <i>Hypoxia Inducible Factor</i> , Factor inducible de hipoxia	SG: Supervivencia global, <i>overall survival</i> , OS
HMDB: Human Metabolome Data Base.	SLP: Supervivencia libre de progression, <i>Progression-free survival</i> , PFS
ICO: Instituto Catalán de Oncología	SSC: Side Scatter
IDO1: <i>Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1</i>	TIMP: <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i> , Inhibidores de tejido de las metaloproteasas.
IL-6: Interleuquina-6	TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
IL-8: Interleuquina-8, CXCL8	Treg: Linfocitos T reguladores
INF- $\gamma$ : Interferón gamma	VEGF: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , Factor de crecimiento del endotelio vascular
MDSC: <i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i> , células mieloides supresoras.	VIP score: <i>Variable importance in the projection</i> . Valor de importancia de una variable en el PLS-DA
MICA: <i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>	
MMP: <i>Matrix Metalloproteinase</i> , Metaloproteasa de matriz	
Mo-MDSC: Células MDSCs monocíticas	

## 1. Introducción

El cáncer de células renales (CCR) o cáncer de riñón, se encuentra entre los 10 cánceres más comunes en el mundo. Se pueden diferenciar diferentes subtipos de CCR dependiendo de su incidencia, siendo el más frecuente el carcinoma de riñón de células claras (*Clear cell RCC, ccRCC*), constituyendo el 80% de los casos, seguido por el carcinoma renal de células papilares (*Papillary RCC, pRCC*) y el carcinoma renal cromóforo (*Chromophobe RCC, chRCC*). El resto de los subtipos tienen una incidencia menor del 1%. Debido al mayor porcentaje de casos del ccRCC, este estudio estará centrado en este subtipo en concreto [1]. Durante los últimos años se ha observado un incremento de la incidencia de este carcinoma en los países desarrollados [2]. Este aumento se ha visto asociado con el hábito tabáquico, la exposición a ciertos químicos, la obesidad, la enfermedad quística renal adquirida en pacientes sometidos a diálisis crónica, la hipertensión y el abuso de ciertos analgésicos [2]. Los factores genéticos también son un factor a considerar pese a que solo un 5% de los casos se debe a un síndrome hereditario. Es un cáncer generalmente esporádico, siendo más frecuente en hombres que en mujeres, y con una edad media de diagnóstico de alrededor de los 64 años. Se han encontrado mutaciones relacionadas con el CCR familiar en 11 genes como el BAP1, FLCN, FH, MET, PTEN, SDHB, SDHC, SDHD, TSC1, TSC2 y VHL. Algunos de estos genes también se han visto asociados al CCR esporádico [1]. Los estudios de asociación a nivel de todo el genoma (GWAS) han descubierto diferentes loci de susceptibilidad relacionados con varios genes como los que se encuentran en las regiones cromosómicas 2p21 y el gen EPAS1, o 11q13.3 y el gen CCND1.

En cuanto a la genética subyacente, el gen mutado más frecuentemente en el ccRCC es el gen supresor de tumores *VHL*. La inactivación de su proteína, también llamada VHL, da lugar a la expresión y acumulación del factor inducible de hipoxia (HIF1 y HIF2). Esto se debe a que, en condiciones normales de ausencia de hipoxia, VHL está involucrado en la ubiquitinación del factor de transcripción HIF, y evita de esa forma la expresión de determinados factores de crecimiento. Por lo tanto, cuando VHL está inactivo, el factor HIF1- $\alpha$  se acumula, a pesar de que el microambiente se encuentre correctamente oxigenado, y estimula la angiogénesis y glicólisis. Esto concuerda con las observaciones de que los tumores son ricos en lípidos, glúcidos y muy vasculares [4]. La inactivación de VHL se puede deber a mutaciones puntuales, inserciones y deleciones, una pérdida del locus 3p25, o por mecanismos epigenéticos. Tanto la latencia encontrada tras la pérdida de VHL como los estudios en ratones han demostrado que hacen falta más eventos epigenéticos o genéticos para desencadenar el CCR, siendo la inactivación de VHL el evento base o fundamental [5]. Las mutaciones de segundo orden más prevalentes se producen en los genes PBRM1, SETD2, BAP1 y KDM5C. Estos genes se encuentran localizados en el locus 3p21, bastante cerca del locus de VHL, por lo que la pérdida del 3p es el evento más común para que se desarrolle el CCR [6]. PBRM1 codifica para la proteína BAF180, que es una subunidad del complejo remodelador de la cromatina PBAF, por lo que promueve la estabilidad del genoma por medio de la cohesión de la cromatina en los centrómeros. Por otra parte, SETD2 codifica para una metiltransferasa de histonas y contribuye al mantenimiento de la integridad del genoma al eliminar el estrés de replicación. BAP1 codifica para una deubiquitinasa y participa en la reparación de la recombinación homóloga y previene la inestabilidad cromosómica. Mutaciones en este gen están asociadas con un mal pronóstico [7]. Las funciones del gen KDM5C también están relacionadas con la remodelación de la cromatina. Cabe remarcar la clara variabilidad entre las células tumorales de un mismo tumor y la variabilidad entre pacientes. Las mutaciones de segundo orden tras el VHL suelen producirse en los mismos conjuntos de genes, como los comentados anteriormente, pero el orden de aparición de estas suele variar dando lugar a tumores muy diferentes del original dificultando el tratamiento y aumentando la variabilidad de respuesta a este [1, 7, 8]. Las alteraciones en la vía de PI3K/AKT/mTOR también son una causa importante de ccRCC con una incidencia del 28%, y por ello, se han dirigido terapias a inhibir mTOR [9].

Dentro del CCR se pueden diferenciar 4 estadios, desde grado 1 donde el tumor mide menos de 7cm y está localizado en el riñón, hasta grado 4 donde se ha producido metástasis a distancia. Conforme se avanza de estadio el pronóstico del paciente es peor, llegando a caer la supervivencia a 5 años del 95% en estadio I al 20% en estadio IV. Actualmente, la mayoría de los casos se diagnostican accidentalmente por medio de técnicas radiológicas no invasivas como las ecografías. A pesar de las técnicas de detección temprana, alrededor del 30% de pacientes acaban desarrollando metástasis, la cual está asociada a una alta mortalidad. Además, un tercio de los pacientes a los que se les ha realizado una nefrectomía suelen recaer [1]. En este caso nos centraremos en pacientes con CCR metastásico. Tal y como se comentó anteriormente, este carcinoma posee una gran heterogeneidad intratumoral e intertumoral lo que aumenta en gran medida la complejidad dando lugar a una gran variedad de respuestas clínicas al tratamiento. Cuando el tumor se encuentra localizado se suele realizar una nefrectomía, o extirpación total o parcial del riñón, la destrucción mediante ablación de las células cancerosas con calor o frío, o en determinados casos solo una monitorización del paciente. Además, hay en el mercado una gran cantidad de tratamientos dirigidos como sería el Sunitinib, la cual es una terapia antiangiogénica de la que se hablará a continuación.

La terapia antiangiogénica es una terapia dirigida contra el CCR avanzado actuando frente a las células endoteliales, no directamente sobre las células tumorales; esta terapia se utiliza debido a que este carcinoma es un tumor muy angiogénico. La angiogénesis es esencial para el crecimiento de tumores más allá de los 1-2mm<sup>2</sup> al formarse microcapilares que sustentan el tumor. Además, es un proceso necesario para que se lleve a cabo la metástasis al permitir a las células tumorales entrar en la circulación sanguínea. La angiogénesis está regulada por el balance entre factores proangiogénicos, como por ejemplo el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF de sus siglas en inglés), y antiangiogénicos. En el cáncer, dicho equilibrio se decanta hacia un microambiente proangiogénico caracterizado por un aumento de factores proangiogénicos y una disminución de los antiangiogénicos. De esa forma se crean gran cantidad de vasos sanguíneos nuevos, pero con una estructura deficiente e inestable y por lo tanto, peor función en comparación con los vasos sanguíneos normales. Esto da lugar a una mala oxigenación y suministro de nutrientes que, junto con el rápido crecimiento del tumor da lugar a zonas necrosadas o en hipoxia lo que favorece a su vez la producción de vasos sanguíneos. Los factores proangiogénicos se unen a los receptores de tirosina quinasas de la superficie celular y desencadenan una cascada de señalización intracelular. En muchos tumores, dichos receptores y/o factores están sobreexpresados o mutados por lo que son una diana terapéutica importante [10]. Debido a la gran capacidad angiogénica del CCR los inhibidores de las tirosinas quinasas relacionadas con la vía de señalización del VEGF son tratamientos de primera línea [11].

Sunitinib malate (SU11248/Sutent; Pfizer) o Sunitinib fue aprobado por la FDA en 2006 y por la EMA en 2007 como una terapia antiangiogénica para el tratamiento del CCR avanzado o metastásico. Sunitinib es un oxindol oral que tras su absorción se convierte en su metabolito activo, SU12662, con capacidad de inhibir a diferentes receptores tirosina quinasas al competir con el ATP por el dominio intracelular. De esta forma es capaz de tener múltiples dianas sobre las que actuar como son VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , KIT, FLT3, RET y CSF-1R [12]. Además de tener efectos antiangiogénicos también tiene efectos citotóxicos sobre las células tumorales por medio de la vía de PI3K/AKT/mTOR [10]. Diversos estudios muestran que la terapia con Sunitinib disminuye la carga tumoral metastásica y prolonga la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global [13–17]. Tras más de 10 años desde la aprobación de Sunitinib, este sigue siendo de los tratamientos más efectivos e importantes para tratar el CCR metastásico. Destacar que las mutaciones en el gen KDM5C localizado en el locus Xp11.22 se ha correlacionado con una mejor respuesta a Sunitinib [8].

El CCR altera la capacidad antitumoral del sistema inmune mediante las vías comentadas anteriormente. Concretamente la inactivación del VHL y la acumulación de HIF1- $\alpha$  está

relacionado con la formación y progresión del carcinoma. La cascada de señalización de HIF involucra la regulación de la angiogénesis, glucólisis y apoptosis. HIF1- $\alpha$  promueve diversos factores de crecimiento como son el VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ , GM-CSF o GCSF, entre otros. Dichos factores en conjunción con otros productos génicos como serían la IL-10, prostanoídes y quimiocinas son los responsables de la inmunosupresión y evasión del sistema inmune por medio de la formación e infiltración de MDSCs y Tregs, entre otras células [18][19]. Se considera al CCR como un tumor bastante inmunogénico. La infiltración de células inmunes en el tumor promueve a su vez la liberación de más citoquinas inflamatorias por parte de las células inmunes (IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y oncostatina M), lo que favorece la producción de VEGF tanto por dichas células como por la célula tumoral. El microambiente tumoral está definido tanto por las células tumorales, las citoquinas y proteínas producidas por las células tumorales, como las células inmunes y las citoquinas y quimiocinas secretadas por estos. La relación entre la inflamación, la angiogénesis y el proceso tumoral es muy estrecha [20].

Los biomarcadores, o marcadores biológicos, son sustancias utilizadas como indicadores de un estadio biológico, en este caso patológico como es el cáncer, o en respuesta a un tratamiento farmacológico como es el Sunitinib. Son realmente útiles porque tienen valor pronóstico y diagnóstico. El NIH los define como una característica que se puede medir en forma objetiva y que permite evaluar un proceso biológico normal, un proceso patogénico o una respuesta farmacológica a intervenciones terapéuticas [21]. En este caso nos centraremos en sustancias endógenas como son las proteínas del plasma sanguíneo y metabolitos, y biomarcadores circulantes como son los niveles de algunas citoquinas o determinadas células del sistema inmune [22, 23]. Actualmente no se han validado biomarcadores para terapias dirigidas en CCR, sin embargo, diversos estudios han encontrado asociaciones significativas entre proteínas y respuesta como es el caso de la angiopoyetina-2 y MMP-2 [24]. Los posibles biomarcadores a tener en cuenta y las razones por las que se han seleccionado se encuentran recogidas a continuación.

El factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF media la angiogénesis y la vasculogénesis y se ve inducido por la hipoxia y por citoquinas como la IL-1, IL-6, IL-8, oncostatina M y TNF- $\alpha$  [20, 25]. Los dímeros de VEGF son los que se unen a su receptor (VEGFR) y desencadenan su cascada de señalización. Destaca el papel de este factor de crecimiento en la metástasis tumoral al favorecer la permeabilidad vascular y extravasación, así como la angiogénesis [26]. Respecto a los niveles en pacientes sanos, VEGF se encuentra elevado en el suero de pacientes con CCR [27]. Niveles elevados de VEGF se han visto asociados además con un aumento de las MDSCs en pacientes con cáncer [28]. Muy relacionado con el VEGF se encuentra la angiopoyetina-2, una citoquina proangiogénica, prometastásica y proinflamatoria. El VEGF a su vez regula positivamente la expresión de la angiopoyetina-2 en las células endoteliales [29, 30]. Por su parte, SDF-1 activa el receptor CXCR4 de las células tumorales induciendo la metástasis y promoviendo la proliferación; inhibe la apoptosis, e induce la angiogénesis actuando en conjunto con VEGF [31]. Los factores proangiogénicos como el VEGF también sobreexpresan el gen *endocan* en los vasos sanguíneos cercanos al tumor. Este proteoglicano se encuentra sobreexpresado en el suero de pacientes con CCR, ya que es un carcinoma bastante angiogénico y según estudios in vitro en células endoteliales, sus niveles son menores tras el tratamiento con Sunitinib [32, 33].

En cuanto a las citoquinas, estudiaremos la angiopoyetina-2, IL-6, IL-8, GCSF, y TNF- $\alpha$ . La IL-6 es una citoquina proinflamatoria muy pleiotrópica que, al igual que otras citoquinas proinflamatorias, proporciona el medioambiente óptimo para la proliferación tumoral. Interviene en gran cantidad de procesos diversos que van desde la apoptosis o supervivencia celular a la diferenciación, maduración y proliferación celular. Se han descrito elevados niveles de IL-6 en muchas patologías; en el CCR metastásico, una elevación de los niveles de IL-6 se ha asociado a un mal pronóstico y menor supervivencia al favorecer la invasión y extravasación de



células tumorales [27, 34]. En el CCR las células hipóxicas secretan IL-6 y favorecen un bucle autocrino en el que producen tanto IL-6 como el receptor de IL-6, favoreciendo su propio crecimiento [35]. Otra interleucina es la IL-8, la cual es una citoquina con capacidad quimiotáctica, es decir, atrae a las células inmunes al tumor. A su vez, las células tumorales secretan más IL-8 para activar la vía de señalización de AKT a través de CXCR2s, lo que induce la migración de MDSCs [36]. Niveles altos de la citoquina IL-8 se han visto asociados con una peor prognosis así como a una mayor resistencia al Sunitinib [27, 37]. Los niveles de IL-8 e IL-6 se han visto asociados con un incremento de MDSCs. El GCSF es una citoquina proinflamatoria que estimula la maduración, proliferación y migración de las células madre mieloides y MDSCs. Esta glicoproteína es secretada por células inmunitarias como monocitos, macrófagos y neutrófilos activados, pero también por células estromales y endoteliales. El receptor de GCSF (GCSFR) se encuentra expresado en las células tumorales. Debido a esto se ha tenido en cuenta en diferentes carcinomas concluyendo que, por medio de la vía de las MAPK y JAK/STAT estimula la proliferación y migración de las células tumorales. Por ello, unos niveles elevados de GCSF con respecto a los controles se correlaciona con un crecimiento del tumor y progresión en diversos carcinomas [27, 38]. Por último, el TNF- $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria liberada por las células inmunes del microambiente tumoral, concretamente por los macrófagos asociados al tumor, y en determinados casos, también por las propias células tumorales [39]. En principio, TNF- $\alpha$  es una citoquina con propiedades antitumorales, sin embargo, cuando la producción es crónica y en pequeñas cantidades, promueve la invasión del estroma y la metástasis al activar la expresión de la MMP9 que a su vez induce la transición epitelio-mesénquima. Por ello, la presencia de niveles relativamente altos de esta citoquina en los tumores, especialmente en el CCR, se asocia a un peor pronóstico [40].

La MMP2 pertenece a la familia de las metaloproteasas, endopeptidasas encargadas de degradar determinados componentes de la matriz extracelular favoreciendo la infiltración tumoral; en el caso de la MMP2, ésta degrada la gelatina y por ello se la conoce también como gelatinasa A. Se han encontrados niveles elevados de la MMP2 en tejidos tumorales. MMP2 está también asociada a la molécula A relacionada con la cadena de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MICA) al degradarla formando MICA soluble que facilita el escape del sistema inmune por parte de las células tumorales [41, 42]. Muy relacionado con las MMP se encuentra la familia de los TIMP, un inhibidor de metaloproteasas, incluyendo MMP9 y MMP2. Por lo tanto, TIMP2 tiene como función reducir la degradación de la matriz extracelular y la membrana basal. Además, regula la apoptosis y el crecimiento de las células endoteliales de manera independiente de las MMPs. En los tumores TIMP2 se encuentra desregulado [42, 43]. Otra proteína con función enzimática es la arginasa que se encarga de convertir la L-arginina en urea y ornitina durante el ciclo de la urea. De esta forma se reducen los niveles de amoníaco (NH<sub>3</sub>) y se produce ornitina que es el precursor de las poliaminas y prolinas. Las poliaminas son necesarias para la proliferación celular por lo que un aumento de ellas es favorable en el proceso tumoral. Otro resultado del aumento de la actividad y expresión de la arginasa es una disminución de la L-arginina, sustrato también de la NOS. Al disminuir los niveles de ON, se desregulan las células T del sistema inmune que permite a su vez un crecimiento tumoral [44]. Adicionalmente, la disminución de arginina en el microambiente durante la respuesta inmune hace que los linfocitos T activados dejen de expresar la cadena CD3 $\zeta$ , resultando en la inhibición de la respuesta funcional de la célula T ante el tumor [45]. Un aumento de los niveles de arginasa, debido a agentes inflamatorios, hipoxia o especies reactivas de oxígeno, está relacionado con muchas patologías, como por ejemplo el cáncer [46]. Concretamente en CCR se ha observado que las MDSCs producen arginasa, aumentando los niveles de esta proteína en sangre [28].

En cuanto a la familia de proteínas S100, S1009A está expresada constitutivamente en células mieloides. Niveles elevados de esta proteína promueve la migración de las MDSCs al tumor e inhibe la diferenciación de las células dendríticas. Las células tumorales son capaces de

producir esta proteína, aumentando el número de MDSCs infiltradas en el tumor, protegiéndose así del sistema inmune [47]. Además de favorecer el microambiente tumoral, esta proteína favorece la metástasis. La expresión de S100A9 está regulada en parte por HIF1- $\alpha$ , VEGF y TNF- $\alpha$  [48]. En el CCR se han visto un aumento de esta proteína [49].

La desregulación del metabolismo, y por ende de sus metabolitos, es una característica de los tumores con el fin de producir más energía y moléculas como nucleótidos, lípidos y aminoácidos para seguir creciendo. Los hidratos de carbono también se encuentran en gran cantidad en los tumores mientras que la mayoría de los aminoácidos (excepto la cisteína, glutamato y glutamina) se encuentran en menor cantidad en las muestras tumorales frente a los controles. La progresión tumoral y la capacidad metastásica se asocian al aumento de metabolitos de las vías metabólicas del glutatión y de la cisteína/metionina. Por lo tanto, el aumento de dichos metabolitos están asociados a peor pronóstico y menor supervivencia [4]. La ruta de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs son de especial importancia ya que se ha asociado un aumento de los metabolitos de la primera ruta y un descenso de los metabolitos del ciclo de Krebs con un peor pronóstico [50]. Gran cantidad de metabolitos intervienen en el proceso tumoral, por ejemplo metabolitos intermediarios como el fumarato y el 2-hidroxiglutarato contribuyen a la tumorigénesis en gran cantidad de tumores al alterar el epigenoma [51]. En el caso del CCR, se ha observado niveles más altos de citrato y succinato frente a unos niveles más bajos de fumarato y malato en comparación con controles sanos [4]. Esto se debe al efecto negativo de HIF1- $\alpha$  en la fosforilación oxidativa. El citrato por su parte promueve la síntesis de acetil-CoA aumentando a su vez los niveles de lípidos. Esto concuerda con la morfología de las células tumorales en el CCR. Se ha observado una asociación clara entre la recurrencia y metabolitos secundarios del metabolismo de la metionina y la biosíntesis de glutatión como el AHB. De igual modo, la agresividad del tumor se asocia a niveles altos de glutatión. La vía del catabolismo del triptófano también tiene gran importancia en el CCR ya que se ha visto asociado con la producción de metabolitos inmunosupresores. El triptófano se metaboliza por medio de la vía de la quinurenina. Esta vía está relacionada con el sistema inmune, tanto innato como adaptativo, al inhibir la proliferación de los linfocitos T, promover la activación de las Tregs y desregular las células NK. En el CCR se ha visto una sobreexpresión de la enzima IDO1 que es la que promueve el paso de triptófano a quinurenina [52, 53].

Con respecto a las células inmunosupresoras, tendremos en cuenta dos tipos celulares diferentes, las MDSCs y las Tregs. Las MDSCs son un conjunto de células mieloides inmaduras con capacidad inmunosupresora. Suelen englobar a macrófagos, granulocitos, células dendríticas y otros tipos de células del linaje mieloides, todas ellas en estadios muy tempranos de diferenciación. El porcentaje de estas células se ve aumentado durante la progresión tumoral, correlacionándose incluso con el estadio tumoral [54]. Las MDSCs se inducen debido a inflamaciones crónicas y por lo tanto, por factores proinflamatorios como la IL-6, IL-1 $\beta$ , GM-CSF, S100A8, S100A9 y prostaglandinas [18]. El papel de las MDSCs es el de inhibir la activación de los linfocitos T por medio de la inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  y la liberación de arginasa. De esta forma los linfocitos permanecen en un estado de anergia. Además, las MDSCs estimulan la formación de las Tregs por medio de la liberación de IFN- $\gamma$  e IL-10 [18]. Por último, son capaces de liberar proteínas angiogénicas para promover la vasculatura tumoral. Las células T reguladoras o Tregs son linfocitos T CD4<sup>+</sup> con capacidad inmunosupresora. Dicha actividad es necesaria para mantener la homeostasis y evitar la autoinmunidad. En estos casos el tumor aprovecha este mecanismo natural para protegerse del sistema inmune y pasar desapercibido. Se han encontrado un mayor número de Tregs (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high+</sup>/FoxP<sub>3</sub><sup>+</sup>), así como el subtipo (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high+</sup>/FoxP<sub>3</sub><sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>), en pacientes con CCR que en controles [27]. Una mayor cantidad de Tregs se ha correlacionado con un peor pronóstico, sobre todo los que poseen el marcador CD45RA<sup>+</sup>.

## 2. Objetivos e hipótesis

Nuestra hipótesis de trabajo es que hay biomarcadores circulantes, tanto a nivel celular como a nivel de metabolitos, que pueden predecir la respuesta a Sunitinib y el pronóstico en pacientes con CCR. Esto permitiría seguir la evolución clínica del paciente de forma precisa e incluso fomentar la medicina personalizada.

El objetivo del presente estudio es la identificación de biomarcadores circulantes y células inmunosupresoras en la sangre periférica que predigan el pronóstico y la respuesta al tratamiento con Sunitinib en pacientes con CCR metastásico. Para ello, se estudiará la variación de las poblaciones de las células inmunosupresoras MDSCs y Tregs. Se realizará además un estudio de diversas proteínas relacionadas con el sistema inmune y la angiogénesis en suero. Por último, destacar el estudio de la metabolómica, ya que, los cambios en el metabolismo celular contribuyen al desarrollo y la progresión de los tumores, haciéndolos incluso vulnerables o resistentes al tratamiento.

Como variables clínicas se tendrá en cuenta la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global de los pacientes, así como la respuesta al tratamiento. El objetivo del desarrollo de biomarcadores de tratamiento con Sunitinib es preseleccionar a los pacientes que se beneficiarán de esta terapia.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Adquisición de muestras

El presente estudio se llevó a cabo gracias a la participación de 45 pacientes de diferentes hospitales españoles, 33 hombres y 12 mujeres tal y como se contempla en la **Tabla 1**. Se seleccionaron y reclutaron pacientes diagnosticados con carcinoma renal metastásico como criterio de inclusión entre 2014 y 2015. Dichos pacientes fueron tratados con Sunitinib como primera línea de tratamiento. Se realizaron dos extracciones de sangre, la primera de ellas antes de iniciar el tratamiento con la terapia antiangiogénica, que se llamará a día 1 o basal; y la segunda al día 28 del primer ciclo de tratamiento (50 mg al día durante 28 días y posteriormente 14 días de descanso antes del siguiente ciclo). Todas las muestras fueron autorizadas por el paciente por medio de un consentimiento informado. Un total de 45 pacientes fueron reclutados de los siguientes hospitales de España: Complejo Hospitalario Xeral-Calde-Hospital Lucus Augusti, Complejo hospitalario de Navarra, Hospital la Vall d'Hebron, Hospital Parc Taulí de Sabadell, ICO Hospital Duran y Reynals, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Hospital provincial de Castellón, Hospital Arnau de Vilanova y el Hospital Universitario Reina Sofia.

De la sangre periférica extraída de cada paciente se hicieron alícuotas que más tarde fueron enviadas en refrigeración al Hospital Universitario y Politécnico La Fe. La sangre total fue conservada a -80°C en presencia de un 10% DMSO en un criovial y la congelación se llevó a cabo con un frasco de congelación Mr. Frosty™ (ThermoFisher), lo cual ayuda a congelar las células a una velocidad óptima para evitar la lisis celular. El resto de los tubos extraídos se procesaron para obtener tanto plasma como suero, que también fueron congelados a -80°C.

<b>Edad media* y Rango</b>	62 (35-83)
<b>Edad, n (%)*</b>	
<65 años	22 (48.89%)
>65 años	23 (51.11%)
<b>Género, n</b>	
Hombres	33
Mujeres	12
<b>Numero de metástasis, n</b>	
1 metástasis	18
2 metástasis	18
3 o más metástasis	7
<b>Supervivencia libre de progresión, n(%)</b>	
< 6 meses	16 (35.56%)
> 22 meses	6 (13.33%)
<b>Supervivencia global, n(%)</b>	
<10 meses	9 (23.08%)
>36 meses	9 (23.08%)

\* Las edades han sido calculadas con respecto a la fecha de inclusión en el estudio.

**Tabla 1.** Características de los pacientes.

### 3.2. Análisis de proteínas en suero

El análisis de las proteínas en suero se llevó a cabo por medio de dos técnicas inmunoquímicas, el ensayo ELISA y Luminex. Las proteínas analizadas por medio de la técnica de multiplex fueron el GCSF, IL8, TNF $\alpha$  (MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP Human Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel, EMD Millipore), Endocan o ESM1 (MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP Human Cardiovascular Disease Magnetic Bead Panel 1, EMD Millipore), TIMP2 (MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP Human TIMP Magnetic Bead Panel 1, EMD Millipore), MMP2 (MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP Human MMP Magnetic Bead Panel 2, EMD Millipore), SDF1 (MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP Human Cytokine / Chemokine Panel II Magnetic Bead Panel, EMD Millipore) y angiopoyetina-2 (MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP Human Angiogenesis / Growth Factor Magnetic Bead Panel 1, EMD Millipore).

Por otra parte, se realizaron por medio de la técnica ELISA las proteínas IL-6 (QuantiGlo<sup>®</sup> Human IL-6 Immunoassay, R&D System Europe, Ltd), VEGF (QuantiGlo<sup>®</sup> Human VEGF Immunoassay, R&D System Europe, Ltd), GCSF (RayBio<sup>®</sup> Human G-CSF ELISA kit, RayBiotech, Inc), INF- $\gamma$  (Human IFN gamma Platinum ELISA, Invitrogen<sup>™</sup>), S100A9 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For S100 Calcium Binding Protein A9, Cloud-Clone Corp) y la arginasa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Arginase, Cloud-Clone Corp). Se ha de destacar que las lecturas de la IL-6 y del VEGF se realizaron mediante un luminómetro a diferentes tiempos seleccionándose el que daba una línea de tendencia y un R<sup>2</sup> mejor. Cada muestra se realizó por duplicado y la concentración de cada proteína se calculó mediante una recta estándar y un análisis de regresión. Un ejemplo de esto se muestra en la **Figura suplementaria 1**. Debido a la gran cantidad de muestras, junto con sus duplicados y controles, se utilizaron varios kits para cada muestra.

### 3.3. Citometría

Las muestras de sangre periférica total de los pacientes fueron procesadas mediante dos procedimientos distintos con el fin de obtener tanto MDSCs, como Tregs. Al encontrarse las muestras congeladas a -80°C, el primer paso es descongelar las muestras en un baño a 37°C en agitación. En el primer caso, el protocolo de las MDSCs partía de una previa separación con Ficoll de las muestras de sangre (900 $\mu$ l). Este preprocesamiento de las MDSCs se llevó a cabo debido a la lisis celular de las muestras producido en parte por una inadecuada congelación. Las MDSCs se encuentran en el halo tras realizar un gradiente de Ficoll junto con las células mononucleadas (linfocitos y monocitos) debido a su flotabilidad alterada [55]. En las Tregs no se realizó el preprocesamiento con Ficoll.

El protocolo previo a la adquisición de muestras en el citómetro para las MDSCs es el siguiente:

1. Tras obtener las células de interés al realizar la separación celular con Ficoll (Lymphoprep<sup>™</sup>, StemCell Technologies) por medio del protocolo estandarizado, se incuban con los anticuerpos monoclonales conjugados a un fluorocromo CD33-FITC, CD11b-PE, HLADR-PerCPCy5.5, CD15-APC, CD14-APCH7 (BD Biosciences) durante 15 minutos.
2. Pasado este tiempo las muestras se incuban durante 10 minutos con una solución hemolizante (FACS Lysing Solution, BD Biosciences).
3. Por último, se realizan dos lavados con PBS+0.2% BSA y centrifugaciones a 500g durante 5 minutos a temperatura ambiente para limpiar la muestra.

El protocolo previo a la adquisición de muestras en el citómetro para las Tregs es el siguiente:

1. Las muestras de sangre (100 $\mu$ l) son incubadas con los anticuerpos monoclonales conjugados a un fluorocromo CD4-FITC, CD3-PerCPCy5.5, CD127-PECy7, CD25-APC y CD45RA-APCH7 (BD Biosciences) durante 20 minutos.

2. Pasados los 20 minutos se añaden 2 ml de PBS+0.2%BSA y se centrifugan a 500g durante 10 minutos a temperatura ambiente quedándonos con el precipitado.
3. Tras ello, las muestras se fijan con el buffer A (Human FoxP3 Buffer Set, BD Biosciences) durante 10 minutos.
4. Se centrifugan a 500g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se lavan las células mediante un lavado con PBS+ 0.2%BSA.
5. Para permeabilizar las células, estas son incubadas con la solución C (Human FoxP3 Buffer Set, BD Biosciences) durante 30 minutos.
6. A continuación, las células se incuban con el anticuerpo monoclonal FoxP3-PE (BD Biosciences) durante 30 minutos.
7. Por último, se realizan dos lavados con PBS+0.2% BSA y las consiguientes centrifugaciones para limpiar la muestra de Tregs.

Tanto las MDSCs como las Tregs fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACSCanto-II mediante el software BD FACS Dive. Para llevar a cabo una correcta adquisición se realizó anteriormente un Set Up (**Tabla suplementaria 1**) y una compensación de los fluorocromos para evitar errores instrumentales en los que se pueda excitar los fluorocromos adyacentes. Finalmente, se analizaron los resultados mediante el software Infinicyt™. A la hora de analizar las distintas poblaciones es fundamental ser capaz de eliminar lo que no interesa, como, por ejemplo, la autofluorescencia en canales donde no hay nada marcado, los dobletes y las otras poblaciones que en este caso no son de interés, como por ejemplo los eosinófilos. Los datos de las Tregs se pudieron calcular en forma de porcentaje con respecto a los leucocitos totales, pero en el caso de las MDSCs fue imposible debido a la fase previa de la separación con Ficoll. El valor del número de Tregs con respecto a los leucocitos totales (Tregs LT) es mucho más informativo que el porcentaje de células con respecto a la celularidad total (Tregs CT). Un mayor porcentaje de Tregs CT no tiene por qué estar asociado a un elevado porcentaje de Tregs LT ya que depende del número inicial de leucocitos en sangre. Por ello es interesante estudiar las dos variables.

### 3.4. Metabólica.

Se realizaron 2 análisis metabólicos diferentes, un cromatograma general no dirigido por medio de un UPLC-TOF-ESI-MS (Agilent 1290 Infinity UPLC chromatograph; Agilent 6550 spectrometer (Agilent Technologies, CA, USA)) y otro análisis dirigido a la vía del triptófano. En el primer caso, las muestras de plasma fueron inicialmente descongeladas para posteriormente precipitarlas por medio de la adición de 100µl de acetonitrilo (0.1% v/v HCOOH) a 50 µl de plasma. A continuación, las muestras fueron homogenizadas en un vórtex y centrifugadas a 13,000g a 4°C durante 10 minutos. Se recogieron 120µl del sobrenadante y se evaporó en una placa de 96 pocillos en vacío a 25°C (SpeedVac Concentrator SPD121P, Thermo, Massachusetts, USA). El residuo obtenido se disolvió en 125 µl H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (98:2) (0.1% v/v HCOOH) y en 2 µl de una solución de fenilalanina-D5 (Cambridge Isotopes Laboratory Inc., Andover, MA, USA), cafeína-D9 (Toronto Research Chemicals, Toronto, Ontario, Canada), leucina encefalina y reserpina (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España) en H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH (1:1, 0.1% v/v HCOOH) a una concentración de 20 µM. Los blancos fueron preparados con H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH (1:1, 0.1% v/v HCOOH). El control de calidad está formado por una mezcla de 10 µl de cada muestra preparada. Se realizaron 93 lecturas de LC-MS de las que 20 eran controles de calidad repartidos entre las muestras, de los cuales 3 eran blancos, y 73 muestras de plasma. El software usado es MassHunter Workstation (Agilent).

En cuanto al análisis dirigido de la vía del triptófano, se cogieron 50µl de las muestras de plasma y se añadieron a 150µl de acetonitrilo para la precipitación de las proteínas. Tras centrifugarlo a 1,500g durante 10 minutos a 4°C el sobrenadante se evaporó en vacío (SpeedVac Concentrator SPD121P, Thermo, Massachusetts, USA). El residuo seco obtenido se reconstituyó en 50µl de una solución estándar. Las muestras se volvieron a centrifugar durante 5 minutos.

Por último, se realizó un análisis UPLC-MS/MS usando el sistema Acquity-Xevo TQS (Waters). El software usado es MassLynx (Waters).

Los metabolitos fueron identificados al enfrentar los valores de m/z (Da) frente a la base de datos del metaboloma humano (Human Metabolome Database<sup>1</sup>) y la base de datos METLIN<sup>2</sup>.

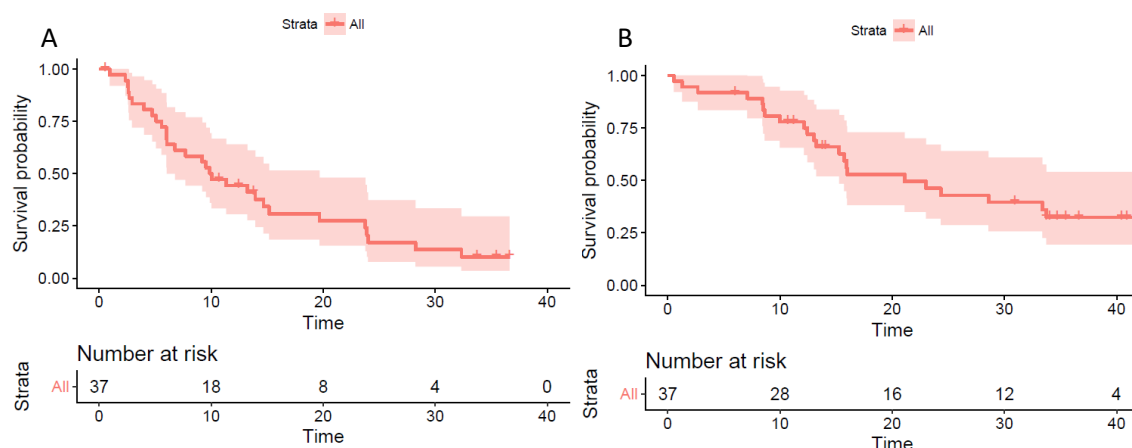
### 3.5. Análisis de datos y estadística.

Los datos se resumieron utilizando la media (desviación estándar) y la mediana (1er y 3er cuartil) en el caso de las variables continuas, y mediante las frecuencias relativas y absolutas en el caso de las variables categóricas. La correlación entre las diferentes variables se estudió utilizando el coeficiente de correlación de rango de Spearman. Para evaluar la asociación de las diferentes variables estudiadas con la supervivencia libre de progresión (SLP), y la supervivencia global (SG), se ajustaron los modelos de regresión de cox penalizando las redes elásticas, incluyendo todas las variables de predicción candidatas en el modelo. Además, también se realizó un análisis de fenotipos clínicos extremos utilizando una regresión logística penalizando las redes elásticas. La utilización de fenotipos extremos se basó en la bibliografía [24, 56]. La selección del parámetro de penalización lambda se realizó utilizando 500 repeticiones de 5 veces la validación cruzada. La regla de error estándar se usó para seleccionar la lambda óptima. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando R (versión 3.5) y los paquetes R glmnet (2.0-16) y clickR (0.4.04).

## 4. Resultados y discusión de los resultados

### 4.1. Características de los pacientes

La muestra de pacientes está formada por 45 pacientes de carcinoma de células renales metastásico a los cuales se les trató con Sunitinib. De los 45 pacientes el 73% de estos son hombres, lo que concuerda con la epidemiología. Además, la edad de detección media es de 63 años (**Tabla 1**). La media de supervivencia global de los pacientes es de 20.87 meses con una desviación de 12.71 mientras que la supervivencia libre de progresión es de 10.93 meses con una desviación de 8.12 meses. Dos pacientes no son considerados ya que fallecieron por causas ajenas a la enfermedad y los otros 6 no se consideran porque no llegaron las muestras debido a problemas técnicos de almacenamiento de la muestra. Estos datos de supervivencia tanto SLP como SG se encuentran recogidos en forma de curvas de Kaplan-Meier con el fin de mostrar de forma visual la disminución de la supervivencia con el tiempo (**Figura 1**). Como se puede

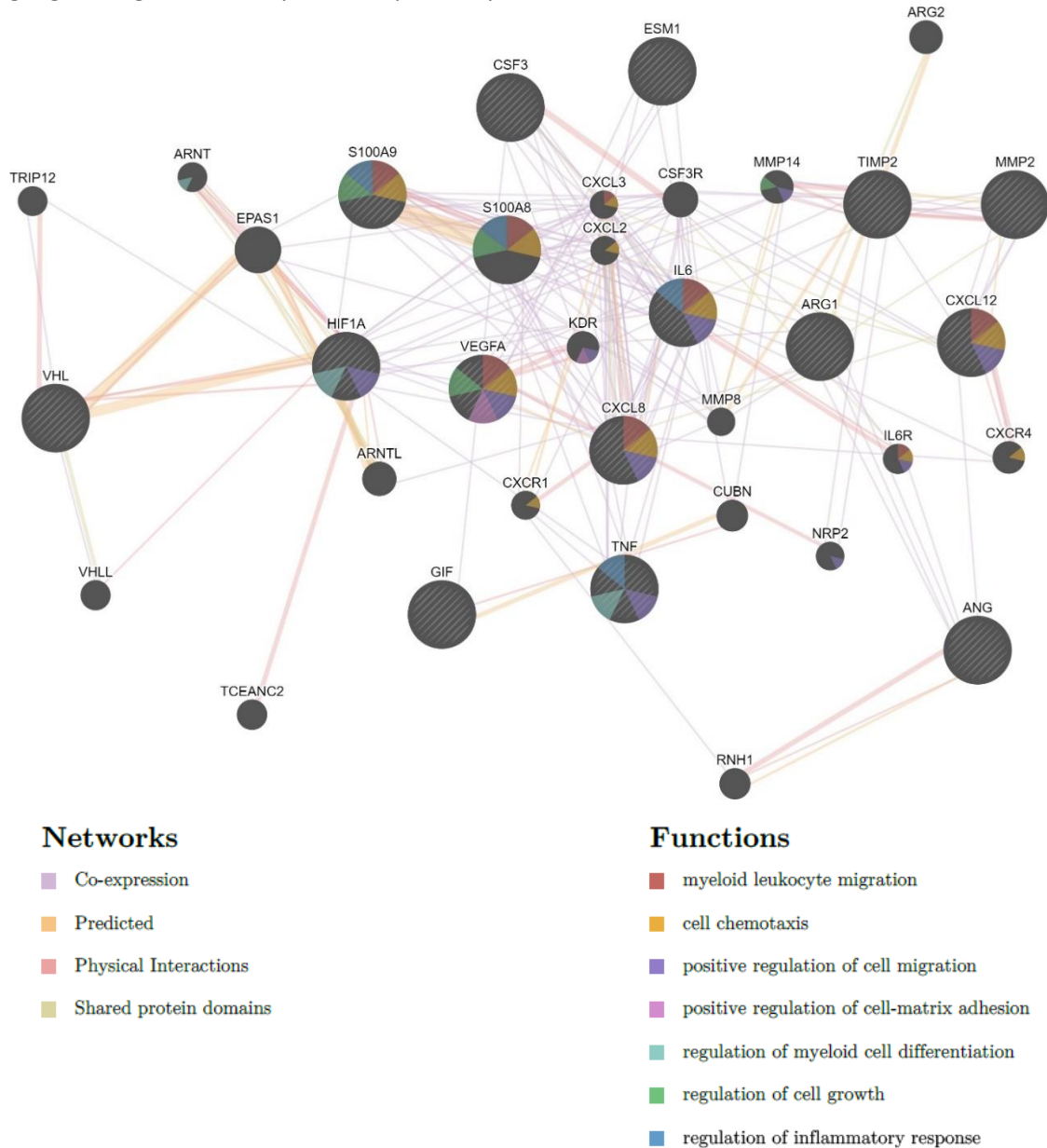


**Figura 1.** Representación de la supervivencia de los pacientes con respecto al tiempo. A) Curva de Kaplan-Meier de la SLP en probabilidad. B) Curva de Kaplan-Meier de la SG en probabilidad. El eje X hace referencia al tiempo en meses.

<sup>1</sup> Human Metabolome Database (HMDB): <http://www.hmdb.ca>

<sup>2</sup> METLIN: <http://metlin.scripps.edu/>

observar no hay ningún paciente con una SLP que llegue a los 40 meses. Hay una gran variabilidad entre pacientes por lo que es posible distinguir diferentes subgrupos dentro de la muestra total de pacientes, unos que responden bien con una supervivencia elevada y otros con un peor pronóstico. Esto es interesante para poder buscar marcadores de pronóstico. En cuanto a las lesiones metastásicas la mayoría se dan en primer lugar en el pulmón con un 61.36% de los casos seguido de los ganglios linfáticos con un 18.18%. La segunda lesión metastásica se da principalmente en los ganglios con un 59.26% de los casos. En cuanto a la formación de una tercera metástasis o más, éstas se dan con similar probabilidad entre diferentes dianas como los ganglios, hígado, hueso, páncreas, pulmón y riñón.

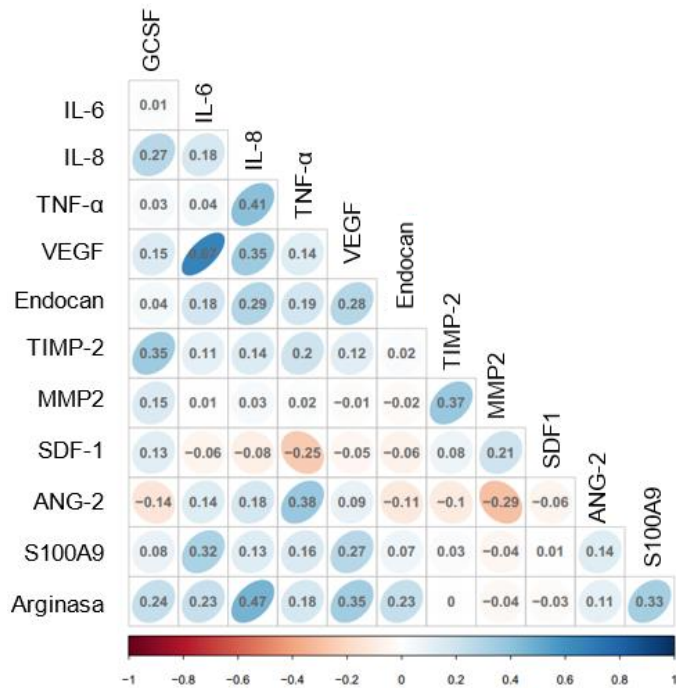


**Figura 2.** Representación en forma de Genemap de los genes asociados al CCR y de los genes codificantes de las proteínas a estudio. Se realizó por medio de GeneMANIA.org. Con un código de colores se muestran las diferentes funciones asociadas a dichos genes y la conexión entre ellos.

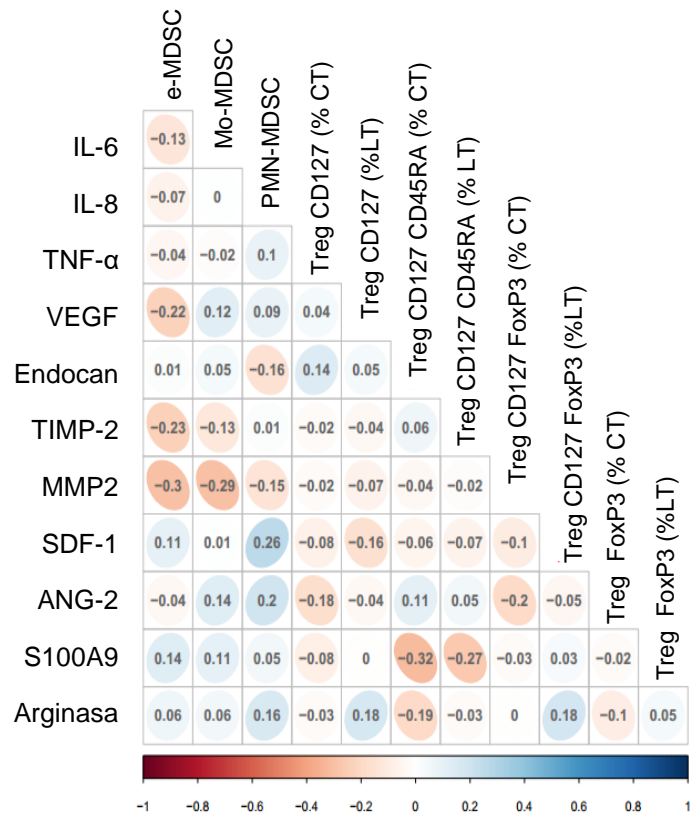
Con el fin de observar como estaban relacionadas las proteínas y genes de interés en los que se centra el siguiente trabajo, se realizó un mapa de asociaciones entre dichos genes y los genes codificadores de las proteínas de interés por medio de GeneMANIA<sup>3</sup>. Asimismo, en la

<sup>3</sup> GeneMANIA: <https://genemania.org/>

**Figura 2** se encuentra representado por medio de las líneas mediante un panel de colores el tipo de asociación, ya sea una co-expresión de dos genes, una predicción, una interacción física entre ambos o que compartan dominios proteicos. En cuanto a los círculos que representan cada gen, encontramos diferentes colores que indican las funciones que desempeñan cada uno. En este caso nos centramos en la migración de las células de linaje mieloides, así como la regulación de la migración celular y la quimiotaxis, la regulación de la adhesión célula-matriz, la diferenciación de las células mieloides, la regulación del crecimiento celular y la regulación de la respuesta inflamatoria. En otros *genemaps* que no se encuentran representados se utilizaron las funciones angiogénesis y respuesta a hipoxia al ser un tumor muy angiogénico. Se han elegido estas funciones ya que están relacionadas con la implicación del sistema inmune en la inflamación y tumorigénesis, así como en la migración y formación de MDSCs; también hay funciones asociadas con la metástasis y crecimiento tumoral. De dicha figura se puede concluir que todas las proteínas y genes están relacionados entre sí mediante diferentes rutas de señalización interactuando en diferentes procesos fisiológicos como son la inflamación, el crecimiento celular o la angiogénesis. A rasgos generales, se observa una asociación por medio de la predicción e interacciones físicas entre VHL, el gen mutado en el CCR, y HIF1 $\alpha$ . A su vez, el gen HIF1 $\alpha$  se encuentra asociado con S100A9, S100A8, VEGF, IL-6, IL-8 (CXCL8) y TNF- $\alpha$ . VEGF conecta a su vez con IL-8, Endocan (ESM1) y TIMP2. Este a su vez se asocia a MMP2, SDF1 (CXCL12), y VEGF. SDF1 se asocia con TIMP2, MMP2, IL-8 y ANG (angiopoyetina-2), y esta última con ARG1 (arginasa). La IL-6, de gran interés debido a sus propiedades pleiotrópicas, se encuentra asociada a muchos genes como serían el



**Figura 3.** Correlaciones entre las proteínas estimadas mediante una matriz de correlación de Spearman. Las concentraciones de las proteínas se dan en pg/ml.



**Figura 4.** Correlaciones entre las proteínas y las variables de la citometría estimadas mediante una matriz de correlación de Spearman. Los valores de concentración de las proteínas se dan en pg/ml.



endocan, CSF3 (análogo a GCSF), S100A9, S100A8, HIF1 $\alpha$ , IL-8 y TNF- $\alpha$ . En cuanto a las funciones, destacar que, aunque no se encuentra representado en este *gene map* debido a la falta de espacio, HIF1 $\alpha$ , VHL y VEGF comparten la función de respuesta celular a hipoxia; mientras que ANG, IL-6, IL-8, HIF1 $\alpha$  y VEGF están relacionados con la angiogénesis. Con respecto a las funciones representadas en la **Figura 2**, separaremos tres grupos, los relacionados con la migración celular y quimiotaxis (representados por los colores rojo, amarillo, morado) que son IL-6, S100A8, S100A9, HIF1 $\alpha$ , VEGF, IL-8, TNF- $\alpha$  y SDF1; los relacionados con la inflamación y el sistema inmune (azul claro y oscuro) que son S100A9, S100A8, IL-6, TNF- $\alpha$ , HIF1 $\alpha$ ; y por último los relacionados con el crecimiento celular (verde) que son VEGF, S100A9 y S100A8.

Para observar las asociaciones entre los diferentes datos obtenidos de cada muestra de paciente, se realizaron correlaciones entre proteínas, y entre las proteínas y las variables de la citometría. Se observó que las proteínas no están correlacionadas entre sí ya que los valores más elevados de correlación, tal y como se recoge en la **Figura 3**, se encuentran entre VEGF e IL-6, con un índice de correlación positiva, es decir, cuando aumenta IL-6 también se ha observado un aumento en VEGF, el cual es superior a 0.5, y entre la arginasa y la IL-8 que se aproxima a 0.5. De igual forma se realizó entre las variables de la citometría y las proteínas. En este caso, las correlaciones son incluso más bajas, con valores por debajo de 0.4 (**Figura 4** *Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Las variables de citometría se dan tanto en porcentaje de las células de interés frente a las células totales (% CT) sin considerar los desechos celulares, como en porcentaje de dichas células con respecto al número de leucocitos totales de la muestra sanguínea obtenido en el hemograma (%LT). En dichos gráficos las correlaciones negativas se colorean de tonos rojizos y las positivas de tonos azulados, y a mayor correlación el círculo que engloba al valor de correlación se convierte en una elipse.

Tras el estudio de la relación entre proteínas, y entre las proteínas y las variables de la citometría, no se han encontrado correlaciones claras entre las distintas variables. No se parte de correlaciones preexistentes a las asociaciones encontradas en los posteriores análisis.

#### 4.2. Análisis de proteínas en suero

Los estudios actuales han mostrado una clara correlación entre el cáncer y la inflamación. El CCR es un carcinoma angiogénico muy relacionado con la inflamación; por esta razón se realizó un estudio de citoquinas y proteínas relacionadas con estos procesos. Con el fin de encontrar biomarcadores en muestras de sangre, se realizaron tanto ELISAS como ensayos multiplex para ver los niveles de dichas proteínas en suero. Las proteínas estudiadas fueron: arginasa, S100A9, endocan, angiopoyetina-2, SDF1, IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , GCSF, INF- $\gamma$ , MMP2, TIMP2 y VEGF.

De todas las proteínas, solo se encontró asociación significativa con el pronóstico en la IL-6, VEGF, Angiopoyetina-2 y S100A9 (**Tabla 2**). Si nos centramos en la SLP, encontramos una asociación inversa entre esta y la IL-6, ANG-2 y S100A9. A mayores niveles de IL-6, ANG-2 y/o S100A9, menor supervivencia libre de progresión y, por lo tanto, peor pronóstico. En el caso de la supervivencia global, esta se encuentra inversamente asociada con el IL-6, el VEGF y S100A9 por lo que, a mayores niveles, menor supervivencia global. Considerando los fenotipos clínicos extremos tanto para la SG como para la SLP, encontramos las proteínas IL-6, VEGF y ANG-2 asociadas inversamente con la SLP; mientras que en el caso de la SG la asociación inversa se produce con la IL-6 y VEGF. Los fenotipos extremos nos dan otro tipo de información, aunque posiblemente más sesgada, de los pronósticos de los pacientes. Podemos considerar que al tener en cuenta los fenotipos extremos se pueda estar separando una población de pacientes con un tumor biológicamente diferente del resto. De esta forma encontraremos buenos y malos respondedores al tratamiento y diferentes pronósticos.

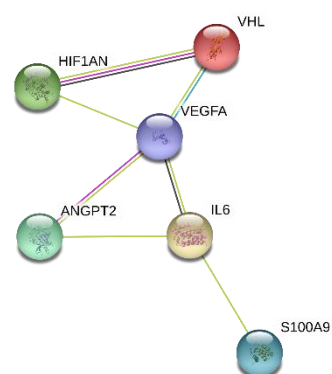
En el caso de la asociación entre la arginasa y la respuesta al tratamiento (RC.RP vs. PE.EE), esta proteína se encuentra al límite de no ser significativa, es muy probable que con una N un

poco más elevada fuese significativa. La proteína que si está asociada significativamente a la respuesta al tratamiento es VEGF.

Proteínas (pg/mL)	SLP	SG	6m≥SLP≥22m	6m≥SG≥22m	RC.RP Vs PE.EE
IL-6	P = 0.003	P = 0.001	P = 0.006	P = 0.006	NS
VEGF	NS	P = 0.02	P = 0.004	P = 0.019	P = 0.015
ANG-2	P = 0.006	NS	P = 0.016	NS	NS
S100A9	P = 0.025	P = 0.003	NS	NS	NS
Arginasa	NS	NS	NS	NS	NS*

**Tabla 2.** Correlaciones significativas entre las proteínas y el pronóstico del paciente. Para ello se contrastaron las proteínas frente a la supervivencia libre de progresión (SLP), la supervivencia global (SG), la supervivencia libre de progresión por fenotipos extremos, la supervivencia global por fenotipos extremos y por fenotipos extremos de respuesta, es decir, respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP) frente enfermedad estable (EE) o enfermedad progresiva (PE). NS = No significativo. ANG-2 = Angiopoietina-2. \* P-valor = 0.0501

Los resultados obtenidos muestran el papel de dichas proteínas (IL-6, VEGF, ANG-2, S100A9 y arginasa) en la evolución del CCR, al participar en su progresión. Esta correlación y asociación con un peor pronóstico clínico del paciente con CCR metastásico puede ser usada como biomarcador a expensas de un nuevo estudio de validación con un mayor número de pacientes. En la **Figura 5** se muestra claramente la conexión entre las proteínas halladas significativas y la proteína VHL que es la que se encuentra mutada en el CCR. Esta representación se realizó por medio de la página web STRING<sup>4</sup> usando como organismo modelo al *Homo Sapiens*. Los nódulos se encuentran relacionados por medio de líneas de las que cada color significa un tipo diferente de interacción. El color amarillo representa que se ha encontrado evidencia de su relación en diferentes artículos, el color verde y el azul oscuro indican que son interacciones predichas, el verde hace referencia a que son genes vecinos y el azul oscuro a que sus genes se expresan al mismo tiempo; el rosa y azul muestran una interacción conocida, el rosa indica que se ha determinado dicha relación experimentalmente, y el azul que proviene de bases de datos revisadas. Además, esta base de datos (STRING) muestra que estas proteínas se encuentran asociadas al carcinoma de células renales, así como a vías que intervienen en el cáncer. Los 3 principales procesos biológicos con los que encuentra asociación son la respuesta a la hipoxia, la migración leucocitaria y la regulación de la vasculogénesis.

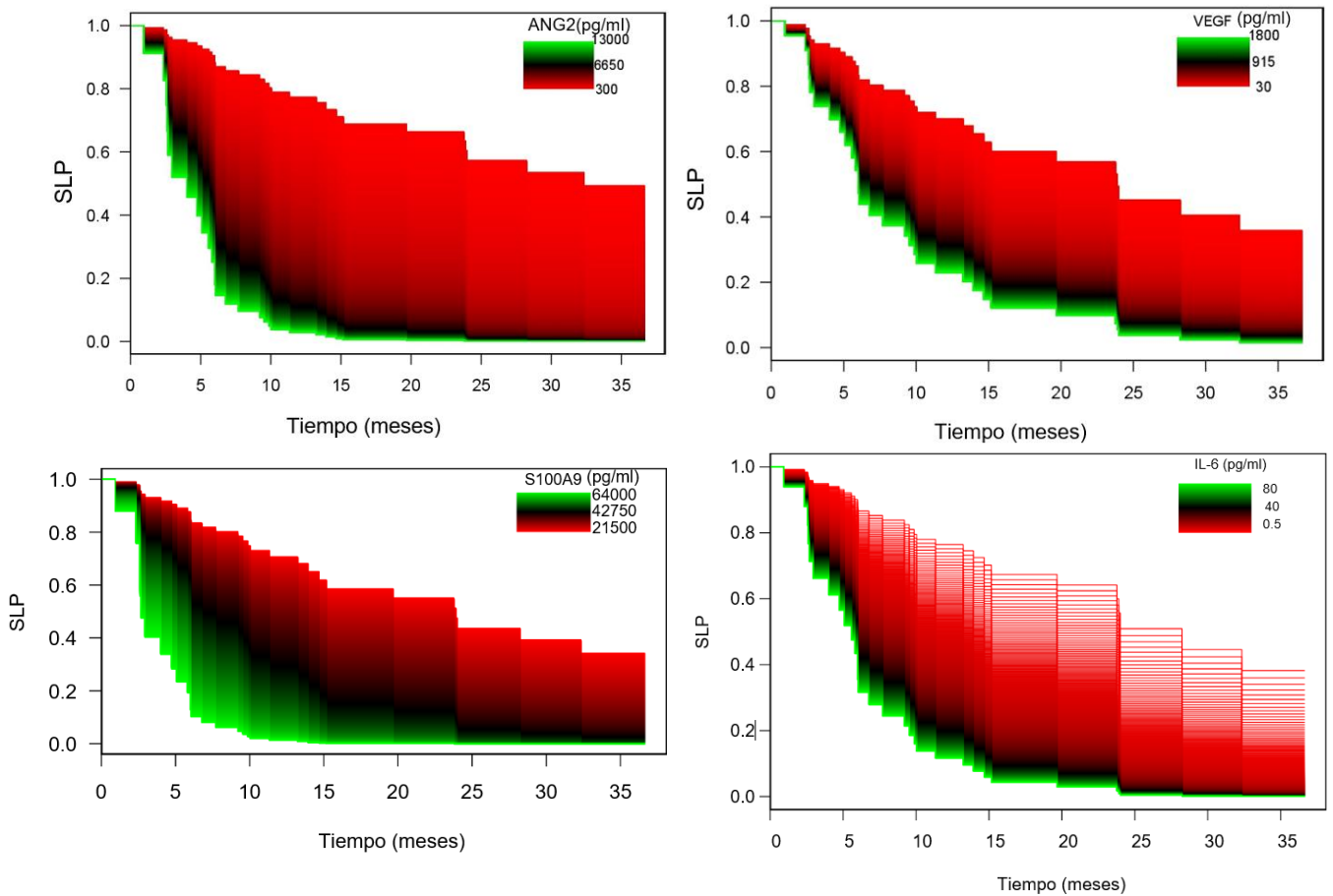


**Figura 5.** Relaciones entre proteínas significativas por medio de STRING

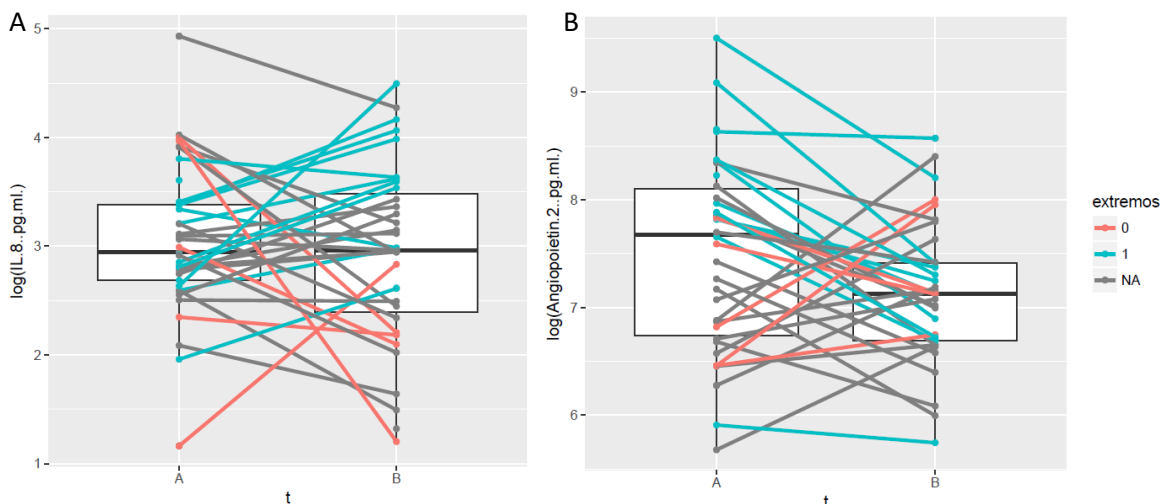
Para cada una de las 4 proteínas con una asociación significativa para SLP se realizó una curva Kaplan-Meier con el fin de observar la correlación entre los niveles de la proteína en suero y la supervivencia del paciente (**Figura 7**). El rango de valores de la proteína se determinó según valores continuos entre el más bajo y el más alto. El hecho de que sean valores continuos permite dar valores de supervivencia a todo el rango de concentraciones de cada proteína. Conforme pasa el tiempo se puede observar que, a menores concentraciones de las proteínas la supervivencia es mayor. Esto se debe a que todas las proteínas estudiadas tienen una correlación inversa con la SLP. No se puede definir una concentración límite a partir de la cual los pacientes se consideren de mal pronóstico. En el caso de IL-6, se puede distinguir claramente que no se solapan las curvas en los valores más bajos de concentración debido a que, un pequeño cambio en la concentración supone un gran cambio de la supervivencia. En el caso de la S100A9 el gráfico no se ha realizado usando los datos en forma logarítmica y por ello el gráfico

<sup>4</sup> STRING: <https://string-db.org/>

muestra una mayor parte en color verde. En el resto de los gráficos, los valores en color verde, es decir, los más altos se encuentran más agrupados. Además, por más que aumenta la concentración de dichas proteínas no se produce una variación muy significativa de la SLP.



**Figura 7.** Curvas de Kaplan-Meier de las proteínas significativas frente a la supervivencia libre de progresión (SLP). El rango de concentraciones va desde la más grande hallada en los pacientes a la más pequeña.



**Figura 6.** Gráficos de cajas de la diferencia entre las muestras tomadas antes del tratamiento (A) y tras un ciclo de tratamiento con Sunitinib (B). En color rojo se representan los pacientes extremos con una mejor evolución clínica (SLP más elevada), mientras que en azul se representan los pacientes extremos que evolucionan peor (SLP más baja). A) Se muestran los datos con respecto a los niveles de IL-8. B) Se muestran los datos con respecto a los niveles de Angiopoietina-2.

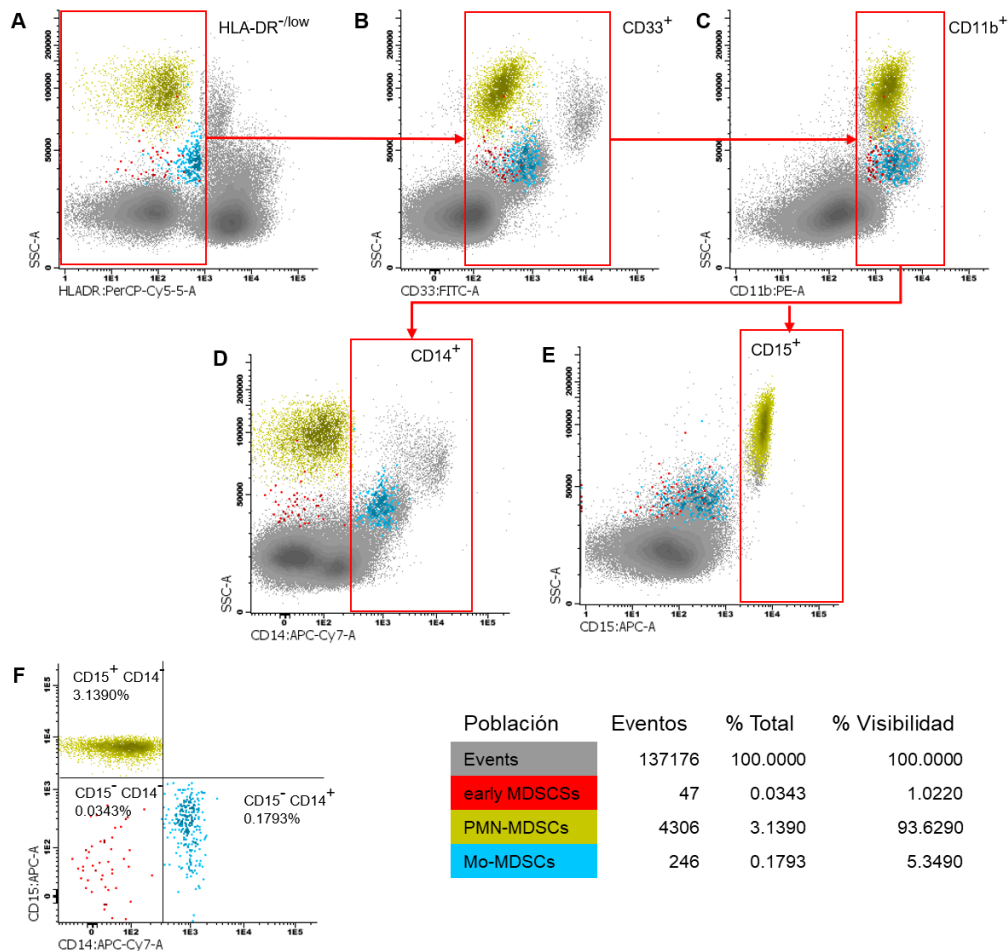
Por último, se estudió el efecto del Sunitinib en los niveles de proteínas de los pacientes estudiando cuales variaban, es decir que proteínas aumentaban o disminuían en los pacientes antes o después del primer ciclo de tratamiento con Sunitinib. Esto también se comprobó para la SLP por extremos, SLP, SG y SG por extremos. Sería interesante también ver, qué pacientes son los que tienen cambios muy radicales en los niveles de proteínas antes y después de la quimioterapia. Las únicas variaciones observables entre los niveles de proteínas antes (A) y después (B) del tratamiento se dan en la Angiopoyetina-2 e IL-8 por fenotipos extremos de respuesta, que es equiparable al de SLP por extremos ya que el que ha respondido bien al tratamiento tiene una mayor SLP, y el que no responde al tratamiento tiene una menor SLP. Desgraciadamente los valores no son significativos cuando se hace un análisis estadístico, debido en parte a la poca cantidad de pacientes extremos, por lo que con que un paciente siga una tendencia diferente al resto, esto perjudica gravemente. En el caso de la IL-8 (**Figura 6.A**), se observa un incremento de dicha proteína tras el tratamiento con Sunitinib en pacientes que no responden y que tienen una menor SLP (marcados en azul), mientras que los niveles de IL-8 son menores tras el tratamiento en pacientes que responden al tratamiento y que tienen una mayor SLP (marcados en rojo). Tres pacientes siguen una tendencia contraria al resto, dos de SLP baja y uno de SLP elevada. Se puede decir que se asocia un descenso de IL-8 con pacientes que responden al tratamiento, por lo que encontrar unos menores niveles de IL-8 durante el tratamiento con Sunitinib es una buena señal de pronóstico. Esto hay que corroborarlo con un mayor número de pacientes. En cuanto a los niveles de Angiopoyetina-2 (**Figura 6.B**), aumentan en el caso de los pacientes que responden al tratamiento y tiene una SLP elevada (marcados en rojo) mientras que disminuyen en los pacientes que no responden al tratamiento y tienen una SLP baja (marcados en azul). En la Angiopoyetina-2, hay un paciente que se queda con unos niveles similares, no cambian, y otros dos que tienen una tendencia contraria al resto. A pesar de que no se encuentre recogido en los gráficos de arriba se realizó el estudio también según la SLP sin extremos, considerando todo el rango de pacientes y se obtuvieron dos asociaciones significativas. El aumento de angiopoyetina-2 tras el tratamiento se encuentra correlacionado con un buen pronóstico mediante un p-valor de 0.047 y el aumento de IL-6 tras el tratamiento se correlaciona también con un buen pronóstico mediante un p-valor de 0.019. Se desconoce la causa de este aumento tras el tratamiento ya que en un principio se esperaría que la angiopoyetina-2, encargada de formar vasos sanguíneos disminuyese si se trata con una terapia antiangiogénica. Este incremento tras el tratamiento se observa tanto con el estudio de la respuesta al tratamiento como por SLP. Lo mismo se esperaría de IL-6, pero debido a la gran cantidad de funciones que realiza, este aumento puede deberse a una alteración por el tratamiento con Sunitinib.

### 4.3. Citometría

El estudio de las poblaciones de células inmunosupresoras se centra en la caracterización de las MDSC y linfocitos T reguladores mediante citometría de flujo.

Se consideraron 3 subpoblaciones de MDSCs: las MDSCs monocíticas (Mo-MDSCs) caracterizadas por los marcadores HLA-DR<sup>-o low</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD15<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>; las MDSCs polimorfonucleares (PMN-MDSCs) caracterizadas por los marcadores HLA-DR<sup>-o low</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>; y las MDSCs de estadio temprano (eMDSCs), caracterizadas por los marcadores HLA-DR<sup>-o low</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD15<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>. En primer lugar, es necesario limpiar las muestras mediante la eliminación de las células muertas y suciedad acumulada para seguidamente poder diferenciar las tres poblaciones descritas. Esto se realiza por medio de la representación del tamaño (FSC) frente a la complejidad (SSC) (**Figura suplementaria 2.A**). Las células que poseen un tamaño bajo y no se engloban dentro de las poblaciones conocidas de linfocitos, monocitos o neutrófilos se consideran debris. A continuación, se eliminan los dobletes, que son todos aquellos puntos que se salen de la linealidad en la representación FSC frente FSC en altura (FSC-H) (**Figura suplementaria 2.B**). Por último, se representan cada

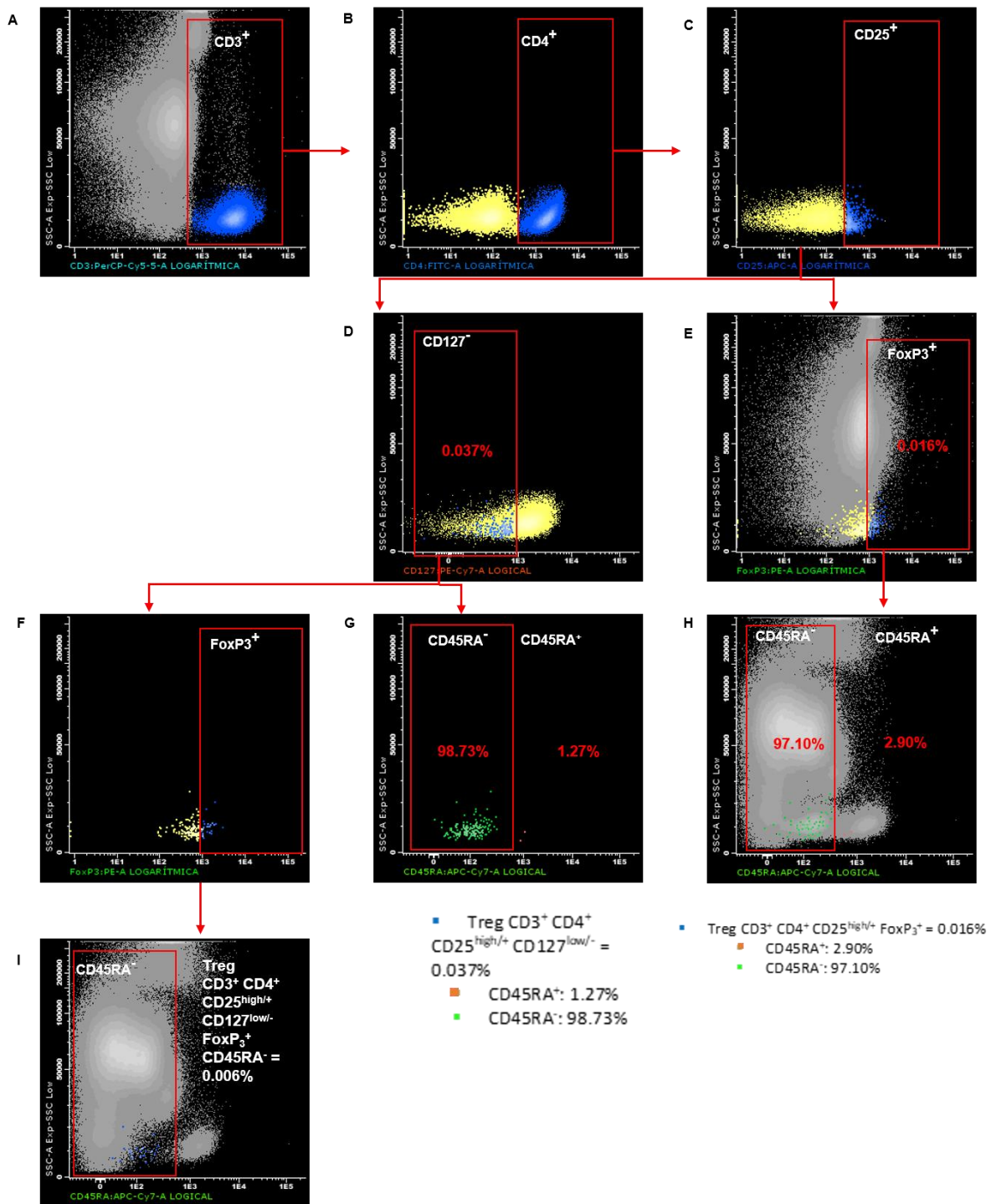
marcador frente a SSC con el fin de seleccionar la población de interés al eliminar los HLA-DR positivos (**Figura 8. A**), seleccionar los CD33<sup>+</sup> (**Figura 8.B**) y CD11b<sup>+</sup> (**Figura 8.C**), y ya seleccionar las poblaciones con respecto a CD15 y CD14 (**Figura 8. D-F**). Si son positivas para CD14 y no para CD15 son Mo-MDSC; si son CD15 positivas, pero CD14 negativas son PMN-MDSC; mientras que si son negativas para CD14 y CD15 son e-MDSC.



**Figura 8.** Representación mediante gráficos de puntos (dot plot) de las poblaciones de MDSCs obtenidas mediante la técnica de citometría de flujo. A) Selección de las poblaciones de células HLA-DR negativas o low. B) Selección de las poblaciones CD33 positivas. C) Selección de las poblaciones CD11b positivas. D) Selección de la población CD14 positiva (PMN-MDSCs). E) Selección de la población CD15 positiva (Mo-MDSCs). F) Representación de las poblaciones de interés con respecto a CD15 y CD14.

La criopreservación de las muestras, a pesar de realizarse en las mejores condiciones posibles, ha afectado negativamente a la muestra, aumentando notablemente el número de células muertas y la suciedad con respecto a las muestras en fresco. La viabilidad de las células se ve drásticamente afectada, sobre todo las PMN-MDSCs. Sin embargo, las Mo-MDSCs son más resistentes a dicho proceso. La frecuencia de Tregs también se ve afectada negativamente con la criopreservación [58]. La congelación afecta sobre todo a las PMN-MDSCs y de igual forma a la expresión del marcador CD33. El CD33 es un fluorocromo débil con una baja expresión y debido al efecto de la congelación en los PMS-MDSCs se encuentran desplazados a la izquierda al estar dañados. El tiempo de congelación de dichas muestras ha sido relativamente elevado al superar los dos años por lo que es un importante factor para considerar. Como factor externo en dicho proceso de congelación se puede considerar el hecho de que las muestras procedan de diferentes hospitales y no se puede saber a ciencia cierta si todas las muestras fueron congeladas de la misma forma que en el Hospital La Fe de Valencia. Las muestras de MDSCs fueron separadas por un gradiente de densidad de 1.077 g/l, o comúnmente llamado gradiente de

Ficoll, como paso posterior a su congelación con el fin de reducir las células muertas y separar las PMN-MDSC de los neutrófilos, facilitando así su análisis e interpretación. Esto es posible debido a que las PMN-MDSC tienen alterada la flotabilidad debido a su baja densidad similar a la fracción de células mononucleadas [55].



**Figura 9.** Representación mediante gráficos de puntos (dot plot) de las poblaciones de Tregs obtenidas mediante la técnica de citometría de flujo. A) Selección de la población CD3<sup>+</sup> propia de linfocitos T. B) Selección de la población CD4<sup>+</sup>. C) Selección de la población CD25<sup>+</sup>. Las células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> son las de linaje. D) Selección de la población CD127<sup>-</sup> a partir de las de linaje<sup>+</sup>. E) Selección de la población FoxP3<sup>+</sup> a partir de las de linaje<sup>+</sup>. F) Selección de las FoxP3<sup>+</sup> a partir de las Linaje<sup>+</sup> y CD127<sup>-</sup>. G) Selección de las CD127<sup>-</sup> tanto CD45RA<sup>-/+</sup>. H) Selección de las FoxP3<sup>+</sup> tanto CD45RA<sup>-/+</sup>. I) Selección de las CD127<sup>-</sup>, FoxP3<sup>+</sup> tanto CD45RA<sup>-/+</sup>.

En cuanto a las células Tregs, se estudiaron diferentes tipos de células a raíz de la combinatoria de marcadores. Las poblaciones estudiadas fueron: Treg CD127<sup>-</sup>; Treg CD127<sup>-</sup>/CD45RA<sup>+</sup>; Treg CD127<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>; Treg FoxP3<sup>+</sup>; Treg FoxP3<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>; Treg FoxP3<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup>; Treg CD127<sup>-</sup>/FoxP3<sup>+</sup>; Treg CD127<sup>-</sup>/FoxP3<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>; Treg CD127<sup>-</sup>/FoxP3<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>. Se consideran Tregs las células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup> (**Figura 9. A-C**). Se tuvo en cuenta las Tregs FoxP3<sup>+</sup> ya que se ha visto asociado con un peor pronóstico, una menor supervivencia global en pacientes con CCR. Lo mismo ocurre con las Tregs CD45RA<sup>+</sup> las cuales se han visto asociadas con un peor pronóstico [59, 60]. CD127 y FoxP3 no dan la misma información ya que las poblaciones son diferentes [61, 62]. Para diferenciar las poblaciones de Tregs es necesario eliminar las células muertas y suciedad acumulada por medio de la representación en *dot plot* de FSC frente SSC. Los dobletes se eliminan de la misma forma que la explicada para MDSCs. Los pasos iniciales para la limpieza de la muestra de Tregs se encuentran recogidos en la (**Figura suplementaria 3**). A continuación, se representa cada marcador frente a SSC con el fin de seleccionar los CD3<sup>+</sup>, los linfocitos CD4<sup>+</sup>, y los CD25<sup>high</sup> (**Figura 9. A-C**). Estos pasos representados en la **Figura 9. A-C** son los comunes a todas las poblaciones de Tregs. El resto de *dot plots* de la **Figura 9** muestran las diferentes combinaciones de marcadores necesarias para determinar las poblaciones de Tregs. Dependiendo de si cogemos el marcador CD45RA como positivo o como negativo, y si tenemos en cuenta el marcador CD127 y/o FoxP3 encontramos diferentes poblaciones. En el caso de Treg CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/CD127<sup>low</sup>/FoxP3<sup>+</sup> no encontramos CD45RA<sup>+</sup>, todas son negativas para este marcador. Eso no descarta que no existan estas poblaciones, ya que el número de células obtenidas al hacer todas estas selecciones es muy bajo, en concreto, el porcentaje de las CD45RA<sup>-</sup> con respecto a la población total es de 0.006% sin tener en cuenta los residuos celulares (**Figura 9. F,I**). En el caso de tener en cuenta una menor restricción al no considerar tanto FoxP3 como CD127 a la vez, en las Treg CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/CD127<sup>low</sup> (**Figura 9. D, G**), el porcentaje de Tregs frente a la celularidad total es más alto (0.037%). Esta población se puede subdividir en dos más, el 98.73% de estas Tregs son CD45RA<sup>-</sup> y el restante 1.27% son CD45RA<sup>+</sup>. Por último, en el caso de las Treg CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/FoxP3<sup>+</sup> (**Figura 9. E,H**) el porcentaje de Tregs frente a la celularidad total es de 0.016%. Esta población se puede subdividir en dos más, el 97.10% de estas Tregs son CD45RA<sup>-</sup> y el restante 2.90% son CD45RA<sup>+</sup>.

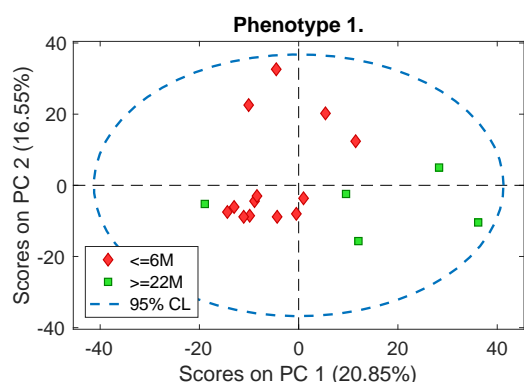
No se observaron correlaciones significativas entre las diferentes poblaciones de células inmunosupresoras y la SLP, SG o respuesta ni SLP por extremos o SG por extremos. Los resultados no significativos del análisis de las células inmunosupresoras por medio de citometría de flujo se pueden deber fundamentalmente al estado de las muestras de sangre periférica debido a la congelación y al escaso número de pacientes.

Se realizaron correlaciones entre las proteínas que se habían hallado significativas y las poblaciones de células inmunosupresoras y se observó una correlación directa significativa entre la IL-6 y las Mo-MDSCs con un p-valor de 0.013, así como entre la angiopoyetina-2 y las Mo-MDSCs con un p-valor de 0.029. El porcentaje de células Tregs CD127<sup>-</sup>/CD45RA<sup>+</sup> se asoció con una menor concentración de S100A9. Esto no se sostiene con las evidencias por lo que puede ser un error debido a la gran cantidad de análisis estadísticos realizados o al bajo número de pacientes ya que el p-valor es de 0.047.

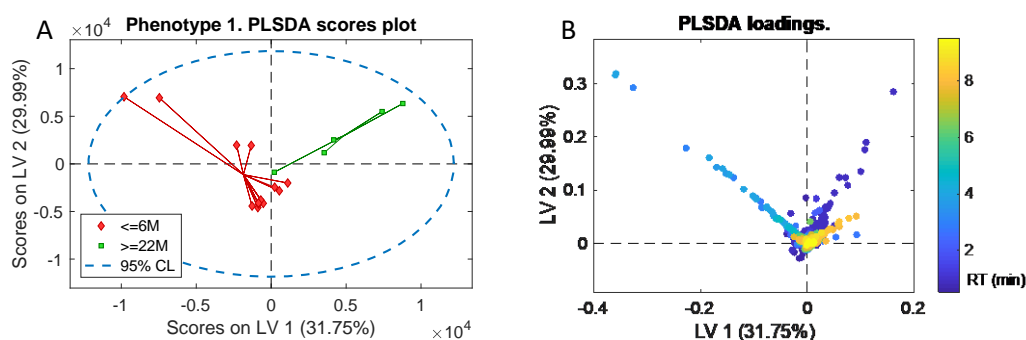
#### 4.4. Análisis de metabolitos

La importancia de la metabolómica reside en detectar los cambios en los metabolitos celulares producidos por una pequeña modificación de la concentración o actividad de una proteína o gen. En el contexto del cáncer es útil para clasificar a los pacientes e identificar nuevos marcadores pronósticos. En primer lugar, se realizó un estudio de la asociación entre un perfil metabolómico concreto y la supervivencia libre de progresión por extremos, considerando las poblaciones de menos o de 6 meses y de más o de 22 meses en muestras A, es decir, antes del tratamiento con Sunitinib. Las variables detectadas solo en las muestras B no se tuvieron en

cuenta. Se realizó un análisis por PCA de 18 pacientes (13 con  $SLP \leq 6$  meses y 5 con  $SLP \geq 22$  meses) que se conoce como Modelo 1. En las siguientes imágenes se muestran los análisis multivariantes de los datos metabolómicos. En la **Figura 10** se observa una separación clara por parte de la variable PC1 entre estas dos poblaciones de pacientes, y además se pueden observar dos poblaciones dentro de la variable PC2 entre la población de pacientes con  $SLP \leq 6$  meses. Con el fin de discernir aún más se realizó un análisis PLS-DA, donde se observa aún más claramente las poblaciones (**Figura 11 A**). En la imagen B de la **Figura 11** se observa una línea de tendencia lineal inversa entre las dos variables latentes por parte de los metabolitos con un tiempo de retención intermedio (alrededor de 4 minutos) y dos líneas de tendencia directas entre las variables latentes por parte de los metabolitos con un tiempo de retención alto (alrededor de 8 minutos) y los metabolitos de un tiempo de retención bajo (menos de 2 minutos).



**Figura 10.** Análisis multivariante PCA de las variables PC1 vs PC2 de las muestras usadas en el Modelo 1: Supervivencia libre de progresión por extremos,  $SLP \leq 6$  meses y  $SLP \geq 22$  meses.



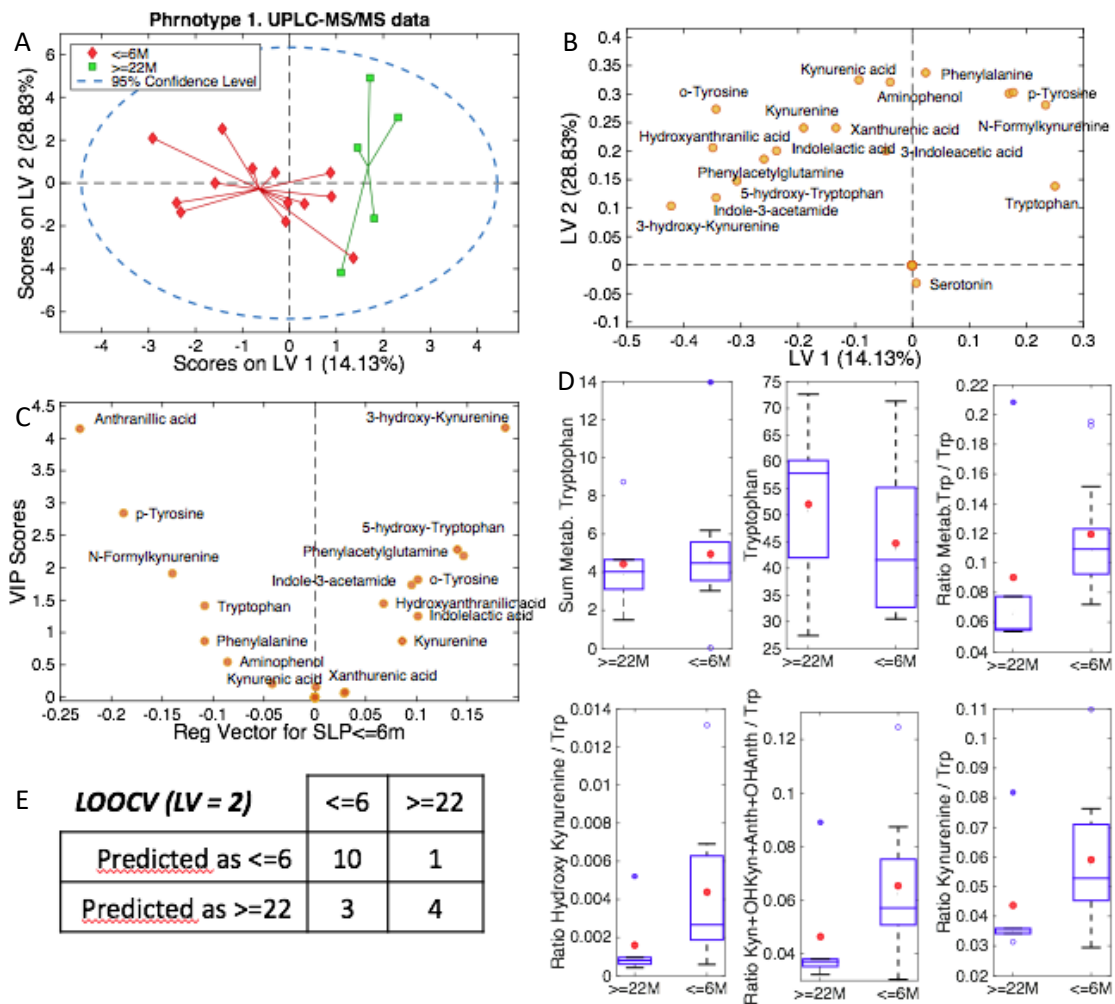
**Figura 11.** Análisis PLSDA de las muestras usadas en el Modelo 1: Supervivencia libre de progresión,  $SLP \leq 6$  meses y  $SLP \geq 22$  meses.

El estudio dirigido se centró en la vía del triptófano debido a la gran cantidad de evidencias que asocian el metabolismo del triptófano con la producción de metabolitos inmunosupresores. La principal vía por la que se metaboliza el triptófano es la vía de la quinurenina, la cual está íntimamente relacionada con el sistema inmune innato y adaptativo al inhibir la proliferación de linfocitos T, promover la activación de Tregs y desregulación de las células NK. El catabolismo del triptófano empieza con la enzimaIDO-1 que transforma el triptófano en formilquinurenina.IDO-1 es la enzima que se encuentra sobreexpresada en el CCR, hallándose tanto en las células tumorales como en las células inmunes [52, 53]. El INF- $\gamma$  eleva a su vez los niveles deIDO-1.

Los niveles de triptófano son relativamente superiores en la población con SLP por extremos superior o igual a 22 meses con respecto a la de menos o igual a 6 meses. Es decir, el triptófano se encuentra elevado en los pacientes de buen pronóstico. Esto concuerda con el hecho de que el catabolismo del triptófano favorece la inmunosupresión. Al contrario ocurre con los metabolitos derivados del triptófano, que se encuentran elevados en el subgrupo de pacientes con una SLP menor o igual a 6 meses en comparación con el subgrupo poblacional de pacientes

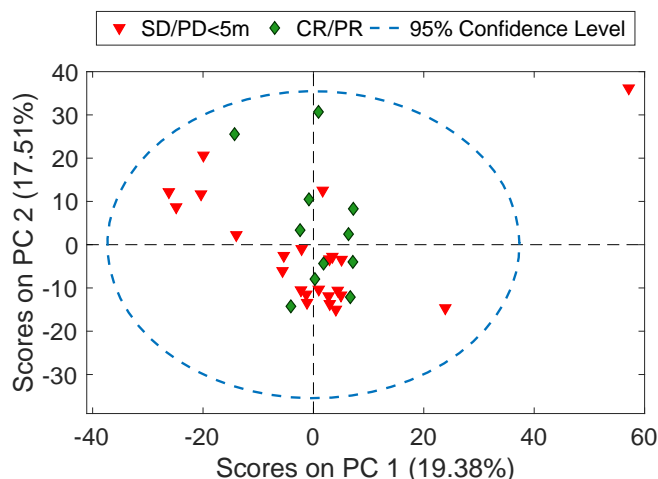


con una SLP mayor o igual a 22 meses (**Figura 12**). Al igual que ocurría en el análisis no dirigido, se encontró una discriminación similar entre los dos subgrupos de pacientes, 10 de 13 pacientes fueron clasificados de forma precisa en el subgrupo de  $SLP \leq 6$  meses y 4 de 5 lo fueron en el subgrupo de  $SLP \geq 22$  meses.



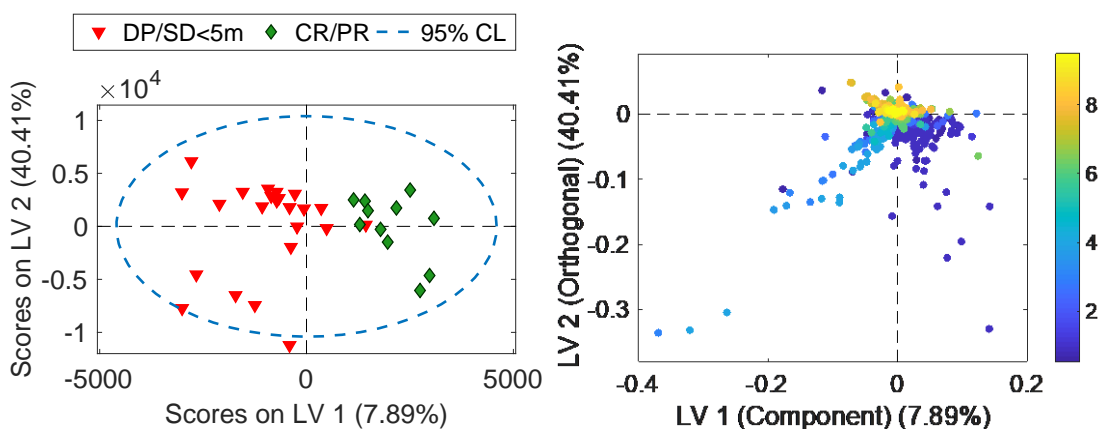
**Figura 12.** Evaluación de las diferencias entre los subgrupos de pacientes con  $SLP \leq 6$  meses y  $SLP \geq 22$  meses antes del tratamiento al realizar un estudio dirigido a la ruta del triptófano. A) Análisis PLS-DA de las muestras usadas en el modelo 1. B) Separación de los metabolitos de la vía del triptófano estudiados por medio de un PLS-DA. C) Separación de los metabolitos de la vía del triptófano. C) información en modo de VIP score de los variables, a mayor VIP score más importantes es dicha variable en el modelo PLS-DA. D) Gráficos caja de las concentraciones de metabolitos de la vía del triptófano en los dos grupos de fenotipos extremos por SLP. E) Resultados de los metabolitos predichos por el modelo PLS-DA como un tipo de extremo y la realidad.

El modelo 2 se basa en determinar una correlación entre el perfil metabolómico y el tipo de respuesta ya sea completa (CR) o parcial (PR) o si la enfermedad se estabiliza ( $SD < 5$  meses) o sigue progresando (PD). Para ello se analizaron muestras de plasma de 34 pacientes de los que 23 mostraban tanto CR o PR, y 11 con  $SD < 5$  o PD. El primer análisis multivariante que se realizó fue un PCA de los datos obtenidos con el estudio no dirigido, con el fin de ver la estructura de los datos y las relaciones entre ellos, así como las muestras que se salen de los grupos obtenidos (**Figura 13**). En este análisis por PCA no se observa una clara separación por parte de esa variable tanto PC1 como PC2.



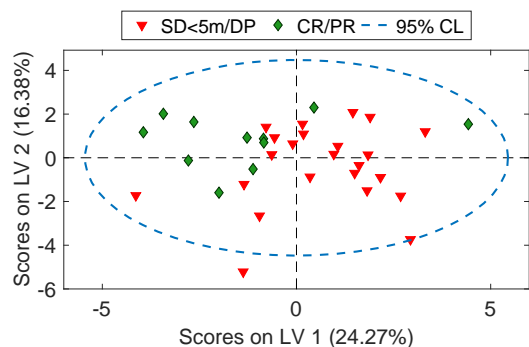
**Figura 13.** Análisis multivariante PCA de las variables PC1 vs PC2 de las muestras usadas en el Modelo 2: Respuesta completa (CR) o parcial (PR) frente a la enfermedad estable (SD<5m) o progresiva (PD).

En la **Figura 14** se puede observar el análisis PLSDA ortogonal (o-PLSDA) teniendo en cuenta variables latentes. En este análisis se ve una separación clara por la variable latente 1 entre los dos grupos. El grupo de muestras con DP/SD<5m se puede separar en dos subgrupos más de pacientes por la variable latente 2. En cuanto al gráfico B, se pueden ver dos líneas de tendencia entre metabolitos y las dos variables latentes. En el primer caso, se observa una línea de tendencia directa entre los metabolitos con un tiempo de retención intermedio de alrededor de 4 minutos. En el segundo caso, encontramos dos líneas de tendencia inversa entre los metabolitos con un tiempo de retención alto (alrededor de 8 minutos) y los que tienen un tiempo de retención bajo (menos de 2 minutos).



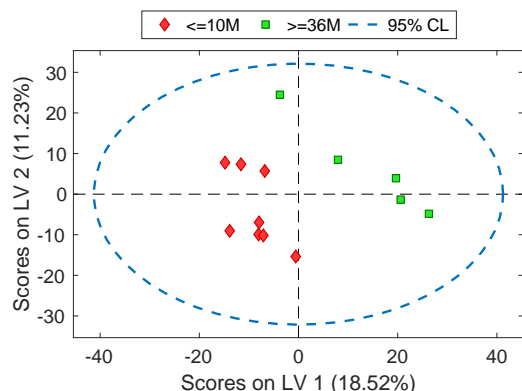
**Figura 14.** Análisis o-PLSDA de las muestras usadas en el modelo 2: Respuesta completa (CR) o parcial (PR) frente a la enfermedad estable (SD<5m) o progresiva (PD).

Se realizó el análisis multivariante PLSDA de los datos obtenidos por medio de un estudio metabolómico dirigido a la ruta del triptófano (**Figura 15**). Desgraciadamente los datos no son muy significativos para poder diferenciar y clasificar totalmente entre grupos ya que solo 17 de 23 y 6 de 11 muestras pudieron ser clasificadas como SD<5/DP o CR/PR, respectivamente.



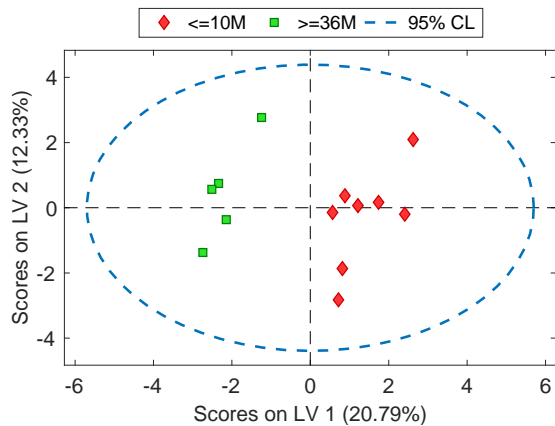
**Figura 15.** Análisis PLSDA de las muestras de pacientes del Modelo 2 obtenidas por medio del estudio UPLC-MS/MS dirigido a la ruta del triptófano: Respuesta completa (CR) o parcial (PR) frente a la enfermedad estable (SD<5m) o progresiva (PD).

El último modelo a considerar es el modelo 3, que se centra en la supervivencia global (SG) por extremos considerando dos grupos poblacionales: los que sobreviven 10 meses o menos y los que sobreviven 36 meses o más. El objetivo es asociar la supervivencia con un perfil metabólico concreto en las muestras A (antes del tratamiento con Sunitinib) de los pacientes. Para ello tendremos en cuenta 13 pacientes, 8 con una  $SG \leq 10$  meses y 5 con una  $SG \geq 36$  meses. En primer lugar, se realizó un análisis multivariante PCA no supervisado de las muestras para obtener una visión global de la relación entre ellas. No se observó nada significativo, por ello nos centraremos en el análisis por medio de PLSDA (**Figura 16**). Debido al bajo número de muestras, establecer una separación correcta es difícil.



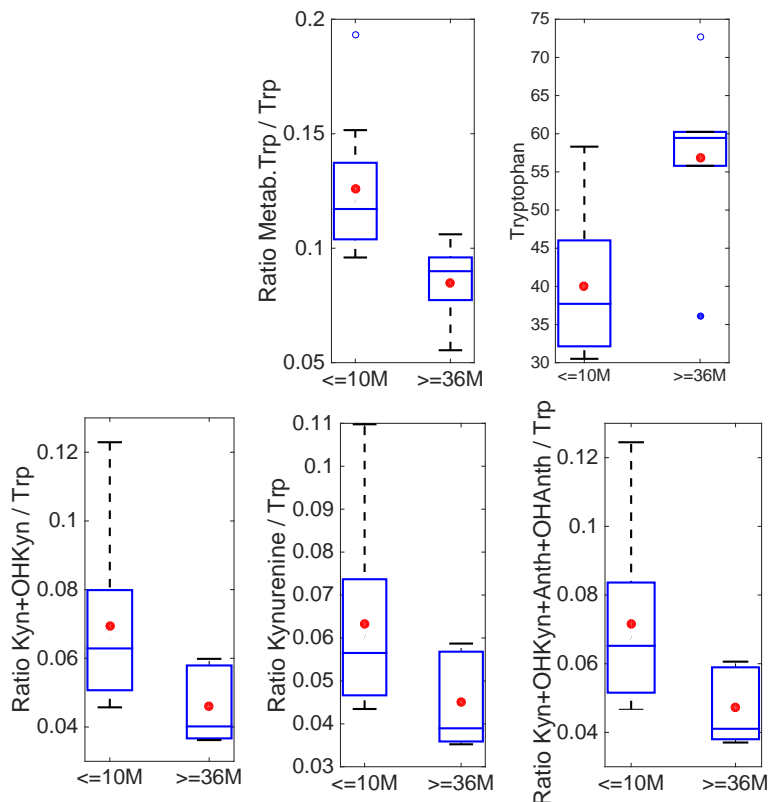
**Figura 16.** Análisis PLSDA de las muestras usadas en el modelo 3: ( $SG \leq 10$  m y  $SG \geq 36$  m)

El análisis dirigido a la vía del triptófano aportó más información que el no dirigido en el modelo 3. En este caso las 8 muestras del grupo poblacional que poseían una supervivencia global por extremos menor o igual a 10 meses se separaron perfectamente de las 5 muestras de supervivencia global mayor o igual a 36 meses. Las poblaciones o grupos se separaron por medio de la variante latente 1 tal y como se observa en la **Figura 17**.



**Figura 17.** Análisis PLSDA de las muestras usadas en el modelo 3 ( $SG \leq 10$  m y  $SG \geq 36$  m) usando los datos obtenidos mediante el análisis dirigido a la vía del triptófano.

En cuanto al resultado obtenido del estudio dirigido a la vía del triptófano (**Figura 18**), los niveles de triptófano son relativamente superiores en la población con una SG de mayor o igual a 36 meses con respecto a la menor o igual a 10 meses, es decir, el triptófano se encuentra elevado en los pacientes de buen pronóstico. Esto se evidencia más cuando lo que se compara es la ratio entre el triptófano y sus metabolitos. Estas observaciones concuerdan con el hecho de que el catabolismo del triptófano está directamente implicado en la inmunosupresión. Si nos fijamos en los metabolitos derivados del triptófano, estos se encuentran elevados en el subgrupo de pacientes con una SG menor o igual a 10 meses en comparación con el subgrupo poblacional de pacientes con una SG mayor o igual 36 meses.



**Figura 18.** Diagramas de las concentraciones de los metabolitos de la vía del triptófano encontradas en las muestras usadas en el modelo 3 ( $SG \leq 10$  m y  $SG \geq 36$  m) por medio del estudio dirigido a la vía del triptófano.

Por último, determinados metabolitos fueron asociados con la supervivencia libre de progresión y por la supervivencia libre de progresión por extremos. Se encontraron los siguientes metabolitos: Bilirrubina, dimetilheptano carnitina, aminohipurato, acetilglucosa, prolina-treonina, desoxiglucosa y la niacinamida. Para ver el posible efecto de estos metabolitos, se realizó una búsqueda en HMDB. La bilirrubina es un pigmento amarillo que se encuentra en la bilis y se forma debido a la degradación de la hemoglobina. Elevados niveles de este pigmento se han visto asociados con gran cantidad de patologías. Una parte de la bilirrubina se excreta por la orina por lo que si los riñones no funcionan correctamente debido al CCR se puede producir una acumulación de dicho metabolito. La dimetil heptano carnitina es una acilcarnitina que está muy relacionada con la producción energética. Las acilcarnitinas en contraste con la carnitina libre, se elimina por la orina por lo que los niveles elevados pueden deberse a una mala función renal por el CCR. El aminohipurato se usa como medida diagnóstica del plasma filtrado por los riñones ya que se suele eliminar todo por la orina. En niveles elevados se satura la filtración y se acumula. La prolina-treonina es un dipéptido que se produce por una rotura incompleta en el catabolismo o en la digestión. Los dipéptidos suelen ser intermediarios de vida corta con funciones fisiológicas o efectos en la señalización celular. En este caso, la prolina-treonina no tiene efectos conocidos. La desoxiglucosa es un análogo de la glucosa que inhibe la glicólisis al competir con la glucosa y por ello tiene una función prometedoras como molécula anticancerígena [63]. Por último, encontramos la niacinamida o vitamina B3.

## 5. Conclusiones

Tras realizar un estudio global de proteínas, metabolitos y células inmunosupresoras de las muestras de pacientes con carcinoma de células renales metastásico con el fin de encontrar biomarcadores de pronóstico, se encontraron algunos biomarcadores que deberán ser validados en una segunda cohorte de pacientes. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que algunas proteínas están asociadas con peor pronóstico del paciente ya sea por su correlación con SLP, SLP por extremos, SG, SG por extremos y por respuesta. Estas proteínas son la IL-6, angiopoyetina-2, VEGF y S100A9. La IL-6 y el VEGF son de gran interés ya que se han visto asociadas a gran cantidad de variables como es el SLP, SLP por extremos y SG y SG por extremos, así como a respuesta en el caso de VEGF. Además, se ha visto una correlación positiva entre estas dos proteínas. Destacar que tal y como se observa en la curva de Kaplan-Meier de la IL-6, un pequeño cambio en los niveles de dicha proteína con respecto a los niveles normales supone un gran cambio en la supervivencia libre de progresión. Niveles elevados de IL-6 también se correlacionan con unos niveles elevados de Mo-MDSCs ya que la IL-6 es una de las citoquinas que estimula la formación de las MDSCs.

En cuanto a los cambios con el tiempo (antes y después del tratamiento con Sunitinib) se ha observado un descenso de los niveles de IL-8 con el tiempo asociado a los pacientes que responden al tratamiento y, por lo tanto, tienen un mejor pronóstico. Por ello, encontrar unos menores niveles de IL-8 durante el tratamiento con Sunitinib es una buena señal de pronóstico.

No se observaron correlaciones significativas entre las diferentes poblaciones de células inmunosupresoras y la SLP, SG o respuesta ni SLP por extremos o SG por extremos. Esto se achaca al poco número de células obtenidas debido a la congelación de la muestra y la poca cantidad de pacientes.

A pesar de ser una cohorte con un N bajo, se ha visto una clara asociación entre los pacientes con supervivencia libre de progresión inferior o igual a 6 meses y la mayor concentración de metabolitos relacionados con la degradación del triptófano como la quinurenina, la hidroxiquinurenina, el ácido antranílico, o el ácido hidroxiantranílico. Lo mismo ocurre con los pacientes con un pronóstico malo, es decir, con una supervivencia global menor a 10 meses. Tal y como se comentó anteriormente esto es interesante por la implicación de los metabolitos del catabolismo del triptófano en la inmunosupresión. Además, el análisis metabolómico ha podido

separar diferentes conjuntos de pacientes según su pronóstico por medio de dos técnicas multivariantes.

En cuanto a la perspectiva futura es necesario un nuevo estudio con una N más elevada para corroborar los datos obtenidos. Es importante estudiar las poblaciones de células inmunosupresoras en sangre sin congelar, con el fin de eliminar la gran cantidad de suciedad que poseían las muestras congeladas. De esa forma sería posible poder ver claramente las poblaciones que andábamos buscando y que la bibliografía remarca de gran interés. Además, será interesante corroborar el microambiente tumoral y las células infiltradas en el tumor, así como las mutaciones concretas mediante el estudio de muestras tumorales.

## 6. Referencias Bibliográficas

1. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, et al (2017) Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Prim* 3: . doi: 10.1038/nrdp.2017.9
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet]. In: Lyon, Fr. Int. Agency Res. Cancer.
3. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, et al (2011) The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 60:615–621 . doi: 10.1016/j.eururo.2011.06.049
4. Hakimi AA, Reznik E, Lee C-H, et al (2016) An Integrated Metabolic Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell* 29:104–116 . doi: 10.1016/j.ccell.2015.12.004
5. Kapitsinou PP, Haase VH (2008) The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ* 15:650–659 . doi: 10.1038/sj.cdd.4402313
6. Ricketts CJ, Linehan WM (2018) Multi-regional Sequencing Elucidates the Evolution of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell*
7. Turajlic S, Larkin J, Swanton C (2015) SnapShot: Renal Cell Carcinoma. *Cell* 163:1556–1556e1 . doi: 10.1016/j.cell.2015.11.026
8. Hsieh JJ, Chen D, Wang PI, et al (2017) Genomic Biomarkers of a Randomized Trial Comparing First-line Everolimus and Sunitinib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 71:405–414 . doi: 10.1016/j.eururo.2016.10.007
9. Network TCGAR, Medicine A working group: BC of, Creighton CJ, et al (2013) Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 499:43–49 . doi: 10.1038/nature12222
10. Faivre S, Demetri G, Sargent W, Raymond E (2007) Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6:734–745
11. Gill DM, Hahn AW, Hale P, Maughan BL (2018) Overview of Current and Future First-Line Systemic Therapy for Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 19: . doi: 10.1007/s11864-018-0517-1
12. Chow LQM, Eckhardt SG (2007) Sunitinib: From Rational Design to Clinical Efficacy. *J Clin Oncol* 25:884–896 . doi: 10.1200/JCO.2006.06.3602
13. Lane BR, Derweesh IH, Kim HL, et al (2015) Presurgical sunitinib reduces tumor size and may facilitate partial nephrectomy in patients with renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 33:112.e15-21 . doi: 10.1016/j.urolonc.2014.11.009
14. Powles T, Blank C, Chowdhury S, et al (2011) The outcome of patients treated with sunitinib prior to planned nephrectomy in metastatic clear cell renal cancer. *Eur Urol* 60:448–454 . doi: 10.1016/j.eururo.2011.05.028
15. Thomas A a, Rini BI, Lane BR, et al (2009) Response of the primary tumor to neoadjuvant sunitinib in patients with advanced renal cell carcinoma. *J Urol* 181:518–523; discussion 523 . doi:

10.1016/j.juro.2008.10.001

16. Czarnecka AM, Szczylik C, Rini B (2014) The use of sunitinib in renal cell carcinoma: Where are we now? *Expert Rev Anticancer Ther* 14:983–999 . doi: 10.1586/14737140.2014.941815
17. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al (2007) Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 356:115–124 . doi: 10.1056/NEJMoa065044
18. Najjar YG, Rayman P, Jia X, et al (2017) Myeloid-derived suppressor cell subset accumulation in renal cell carcinoma parenchyma is associated with intratumoral expression of IL1b, IL8, CXCL5, and Mip-1 $\alpha$ . *Clin Cancer Res* 23:2346–2355 . doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1823
19. Ostrand-Rosenberg S (2010) Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 59:1593–600 . doi: 10.1007/s00262-010-0855-8
20. Angelo LS, Kurzrock R (2007) Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res* 13:2825–30 . doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2416
21. Strimbu K, Tavel JA (2011) What are Biomarkers. *NIH-PA* 5:463–466 . doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177.What
22. Rini BI, Michaelson MD, Rosenberg JE, et al (2008) Antitumor activity and biomarker analysis of sunitinib in patients with bevacizumab-refractory metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 26:3743–3748 . doi: 10.1200/JCO.2007.15.5416
23. Harmon CS, Figlin RA, Hutson TE, et al (2011) Circulating protein biomarkers of sunitinib (SU) and interferon-alpha (IFN-alpha) efficacy in treatment (Tx)-naive patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *J Clin Oncol* 29:
24. Motzer RJ, Hutson TE, Hudes GR, et al (2014) Investigation of novel circulating proteins, germ line single-nucleotide polymorphisms, and molecular tumor markers as potential efficacy biomarkers of first-line sunitinib therapy for advanced renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 74:739–750 . doi: 10.1007/s00280-014-2539-0
25. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH (2005) Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J. Cell. Mol. Med.* 9:777–794
26. Weis SM, Cheresh DA (2005) Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 437:497–504
27. Polimeno M, Napolitano M, Costantini S, et al (2013) Regulatory T cells, interleukin (IL)-6, IL-8, Vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL10, CXCL11, epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte growth factor (HGF) as surrogate markers of host immunity in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int* 112:686–696 . doi: 10.1111/bju.12068
28. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, et al (2009) Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res* 69:1553–1560 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1921
29. Bessho H, Wong B, Huang D, et al (2015) Effect of Ang-2-VEGF-A Bispecific Antibody in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Invest* 33:378–386 . doi: 10.3109/07357907.2015.1047505
30. Wu FTH, Man S, Xu P, et al (2016) Efficacy of cotargeting angiopoietin-2 and the VEGF pathway in the adjuvant postsurgical setting for early breast, colorectal, and renal cancers. *Cancer Res* 76:6988–7000 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0888
31. Wehler TC, Graf C, Altherr K, et al (2011) SDF1 $\beta$  expression in renal cell carcinoma correlates with grading and infiltration by CD8+T-cells. *Anticancer Res* 31:2797–2803
32. Leroy X, Aubert S, Zini L, et al (2010) Vascular endocan (ESM-1) is markedly overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Histopathology* 56:180–187 . doi: 10.1111/j.1365-2559.2009.03458.x

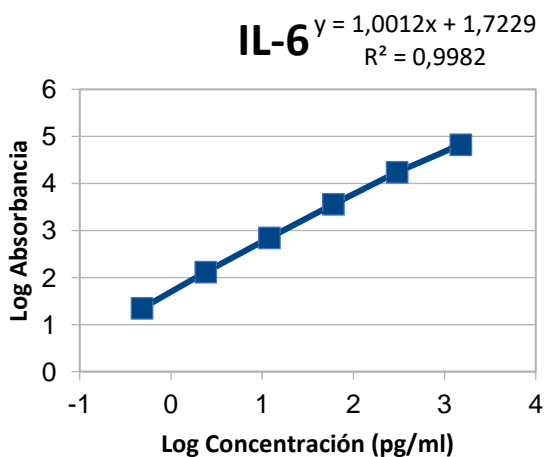
33. Rennel E, Mellberg S, Dimberg A, et al (2007) Endocan is a VEGF-A and PI3K regulated gene with increased expression in human renal cancer. *Exp Cell Res* 313:1285–1294 . doi: 10.1016/j.yexcr.2007.01.021
34. Mansell A, Jenkins BJ (2013) Dangerous liaisons between interleukin-6 cytokine and toll-like receptor families: A potent combination in inflammation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 24:249–256 . doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.03.007
35. Kamińska K, Czarnecka AM, Escudier B, et al (2015) Interleukin-6 as an emerging regulator of renal cell cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 33:476–485
36. Liang-kuan B, Nan Z, Cheng L, et al (2014) Kidney cancer cells secrete IL-8 to activate Akt and promote migration of mesenchymal stem cells. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 32:607–612 . doi: 10.1016/j.urolonc.2013.10.018
37. Diekstra MHM, Liu X, Swen JJ, et al (2015) Association of single nucleotide polymorphisms in IL8 and IL13 with sunitinib-induced toxicity in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Clin Pharmacol* 71:1477–1484 . doi: 10.1007/s00228-015-1935-7
38. Morris KT, Khan H, Ahmad A, et al (2014) G-CSF and G-CSFR are highly expressed in human gastric and colon cancers and promote carcinoma cell proliferation and migration. *Br J Cancer* 110:1211–1220 . doi: 10.1038/bjc.2013.822
39. Quandt D, Jasinski-Bergner S, Müller U, et al (2014) Synergistic effects of IL-4 and TNF $\alpha$  on the induction of B7-H1 in renal cell carcinoma cells inhibiting allogeneic T cell proliferation. *J Transl Med* 12: . doi: 10.1186/1479-5876-12-151
40. Ho M-Y, Tang S-J, Chuang M-J, et al (2012) TNF- $\alpha$  induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a GSK3 $\beta$ -dependent mechanism. *Mol Cancer Res* 10:1109–19 . doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0160
41. Yang FQ, Liu M, Yang FP, et al (2014) Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) media la eliminación de MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) en el cáncer de células renales. *Actas Urol Esp* 38:172–178 . doi: 10.1016/j.acuro.2013.09.015
42. Di Carlo A (2012) Matrix metalloproteinase-2 and -9 in the sera and in the urine of human oncocyoma and renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 28:1051–1056 . doi: 10.3892/or.2012.1864
43. Lu G, Dong Y, Zhang Q, et al (2015) miRNA-221 promotes proliferation , migration and invasion by targeting TIMP2 in renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 8:5224–5229
44. Caldwell RB, Toque HA, Narayanan SP, Caldwell RW (2015) Arginase: An old enzyme with new tricks. *Trends Pharmacol Sci* 36:395–405 . doi: 10.1016/j.tips.2015.03.006
45. Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, et al (2003) L-Arginine Consumption by Macrophages Modulates the Expression of CD3 Chain in T Lymphocytes. *J Immunol* 171:1232–1239 . doi: 10.4049/jimmunol.171.3.1232
46. Wang L, Bhatta A, Toque HA, et al (2015) Arginase inhibition enhances angiogenesis in endothelial cells exposed to hypoxia. *Microvasc Res* 98:1–8 . doi: 10.1016/j.mvr.2014.11.002
47. Markowitz J, Carson WE (2013) Review of S100A9 biology and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1835:100–109
48. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB (2015) S100 proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 15:96–109
49. Zhang L, Jiang H, Xu G, et al (2015) Proteins S100A8 and S100A9 are potential biomarkers for renal cell carcinoma in the early stages: Results from a proteomic study integrated with bioinformatics analysis. *Mol Med Rep* 11:4093–4100 . doi: 10.3892/mmr.2015.3321
50. Creighton C, Morgan M, Gunaratne P, et al (2013) Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 499:43–49 . doi: 10.1038/nature12222



51. Kaelin WG, McKnight SL (2013) Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell* 153:56–69
52. Wettersten HI, Hakimi AA, Morin D, et al (2015) Grade-dependent metabolic reprogramming in kidney cancer revealed by combined proteomics and metabolomics analysis. *Cancer Res* 75:2541–2552 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1703
53. Trott JF, Kim J, Aboud OA, et al (2016) Inhibiting tryptophan metabolism enhances interferon therapy in kidney cancer. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.11658
54. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, et al (2009) Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 58:49–59 . doi: 10.1007/s00262-008-0523-4
55. Bronte V, Brandau S, Chen SH, et al (2016) Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.* 7
56. Fay AP, De Velasco G, Ho TH, et al (2016) Whole-exome sequencing in two extreme phenotypes of response to VEGF-targeted therapies in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw* 14:820–824 . doi: 10.6004/jnccn.2016.0086
57. Flörcken A, Takvorian A, Singh A, et al (2015) Myeloid-derived suppressor cells in human peripheral blood: Optimized quantification in healthy donors and patients with metastatic renal cell carcinoma. *Immunol Lett* 168:260–267 . doi: 10.1016/j.imlet.2015.10.001
58. Kotsakis A, Harasymczuk M, Schilling B, et al (2012) Myeloid-derived suppressor cell measurements in fresh and cryopreserved blood samples. *J Immunol Methods* 381:14–22 . doi: 10.1016/j.jim.2012.04.004
59. Afzali B, Lombardi G (2013) Regulatory T cells in renal cell carcinoma: Additional fuel to the bonfire of debate. *BJU Int.* 112:538–539
60. Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y (2015) Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 5:15179 . doi: 10.1038/srep15179
61. Yu N, Li XX, Song W, et al (2012) CD4+CD25+CD127low/- T cells: A more specific treg population in human peripheral blood. *Inflammation* 35:1773–1780 . doi: 10.1007/s10753-012-9496-8
62. Żabińska M, Krajewska M, Kościelska-Kasprzak K, et al (2016) CD4+CD25+CD127- and CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cell Subsets in Mediating Autoimmune Reactivity in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 64:399–407 . doi: 10.1007/s00005-016-0399-5
63. Raez LE, Papadopoulos K, Ricart AD, et al (2013) A phase i dose-escalation trial of 2-deoxy-d-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 71:523–530 . doi: 10.1007/s00280-012-2045-1

## 7. Anexos

### Información suplementaria

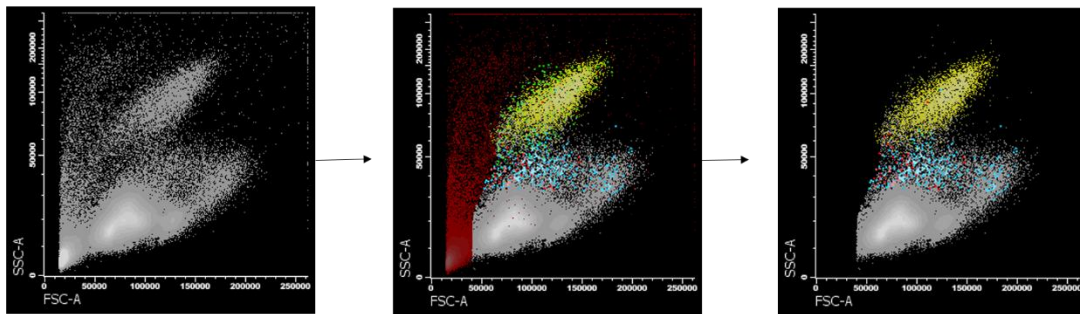


**Figura suplementaria 1.** Representación de la concentración en pg/ml de los estándares frente a su absorbancia con el fin de obtener la línea de tendencia lineal y su ecuación para calcular el valor de concentración correspondiente a cada muestra.

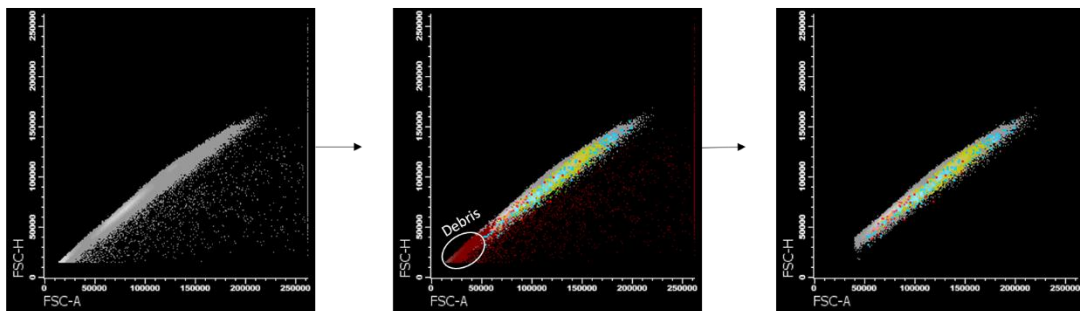
<b>Unstained</b>	NA	NA	SPN
<b>FITC</b>	Genérico	CD8	SPN (Linfocito T)
<b>PE</b>	Genérico	CD4	SPN (Linfocito T)
<b>PerCPCy5.5</b>	Marcaje específico	HLADR Lote 7199819	SPN (Linfocitos o Linaje mieloide)
<b>APC</b>	Genérico	CD3	SPN (Linfocitos T)
<b>APCH7</b>	Marcaje específico	CD14 lote 6340599	SPN (Linaje mieloide)
<b>PECy7</b>	Marcaje específico	CD16 lote 5357540	SPN (Linfocitos NK)

**Tabla suplementaria 1.** Set Up de los marcadores utilizados para calibrar el equipo con el fin de disminuir el error experimental al poder solaparse espectros. Los fluorocromos en tándem incluyen el lote ya que si este varía debe volver a realizarse el set up debido a posibles variaciones en su producción. Finalmente, el CD16 no se usó, pero se realizó la calibración del PECy7 con ese marcador.

A) Eliminación del debris

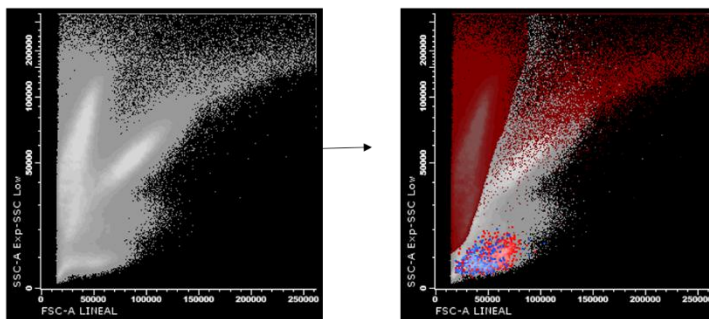


B) Eliminación de dobletes

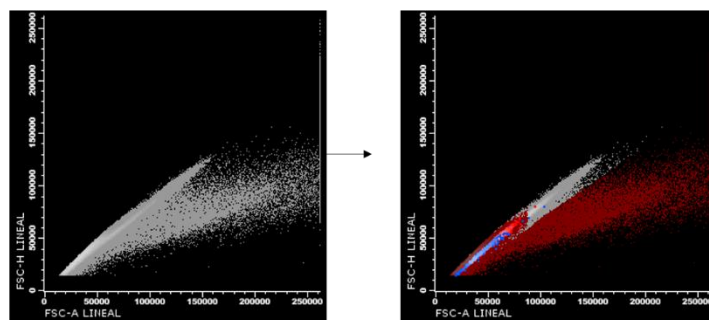


**Figura suplementaria 2.** Representación de los pasos iniciales de limpieza de las muestras de citometría mediante gráficos dot plot. Son las muestras de MDSCs. A) Eliminación del debris o suciedad formado sobre todo por células muertas que tienen un tamaño pequeño y en su gran mayoría una baja complejidad. B) Eliminación de los dobletes que se encuentran fuera de la linealidad en el gráfico.

A) Eliminación del debris



B) Eliminación de dobletes



**Figura suplementaria 3.** Representación mediante gráficos dot plot de los pasos iniciales de limpieza de las muestras de Tregs obtenidas mediante la técnica de citometría. A) Eliminación del debris o suciedad formado sobre todo por células muertas con un tamaño pequeño. B) Eliminación de los dobletes que en esta muestra se encuentran en gran cantidad.