

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Células mieloides supresoras en hepatocarcinoma y neoplasias
post-trasplante renal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta Chivite Lacaba

DIRIGIDA POR

Estela Natividad Paz Artal
Jordi Cano Ochando

Madrid

© Marta Chivite Lacaba, 2025

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Células mieloides supresoras en
hepatocarcinoma y neoplasias post-trasplante renal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA PRESENTADA POR

Marta Chivite Lacaba

DIRECTORES

Estela Natividad Paz Artal
Jordi Cano Ochando

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



TESIS DOCTORAL

Células mieloides supresoras en
hepatocarcinoma y neoplasias post-trasplante renal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA PRESENTADA POR

Marta Chivite Lacaba

DIRECTORES

Estela Natividad Paz Artal
Jordi Cano Ochando

Madrid, 2025

Esta tesis doctoral, realizada en el Instituto de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre, ha sido financiada por la Asociación Española contra el Cáncer (IDEAS206PAZ), proyectos privados (2023/0089) y el Instituto de Salud Carlos III (PIE13/00045, PI22/00586) con el apoyo del Consejo Regional Europeo Fondos FEDER para el desarrollo.

Marta Chivite Lacaba ha contado con un contrato predoctoral perteneciente a la convocatoria “Ayudas para la formación de doctores del programa nacional de formación de profesorado universitario 2019” del Ministerio de Educación y Formación Profesional (FPU19/06393).

From sprinkler splashes to fireplace ashes
I gave my blood, sweat, and tears for this

I looked around in a blood-soaked gown
And I saw something they can't take away

'Cause there were pages turned with the bridges burned
Everything you lose is a step you take

Take the moment and taste it
You've got no reason to be afraid

You're on your own, kid
Yeah, you can face this

Taylor Swift
You're on Your Own, Kid

*A Mamá, Papá y Moni,
por ser casa*

*A mis Amigas,
por ser salvavidas*

Agradecimientos

Creo que todavía no me creo que esté escribiendo las últimas líneas de esta tesis. Es difícil plasmar en unas pocas líneas lo que esta tesis ha supuesto. Ha sido un camino largo, con curvas y algún que otro tropiezo, a veces frustrante, pero lleno de momentos que le han dado sentido al viaje. Durante estos años he tenido la suerte de estar acompañada por personas que me han apoyado, animado y sostenido cuando más lo necesitaba. Esta tesis es también un pedacito de cada una de ellas.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores. Estela, gracias por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto y tener la certeza de que, a pesar de todos los obstáculos, al final se materializaría. Gracias por transmitirme tu pasión por la inmunología, tus consejos y por empujarme fuera de la zona de confort. Jordi, gracias por tu implicación, aportaciones y ayuda durante el desarrollo de este trabajo.

A Esther, mi tutora, gracias por toda la ayuda para navegar la burocracia.

Desde mi primer día como estudiante hasta hoy son muchas las personas que han contribuido de una forma u otra a este trabajo. Todo lo que sé, y mucho de lo que soy, lo he aprendido en estos años en el laboratorio.

Alberto, gracias por descubrirme el maravilloso mundo de las MDSC y de las células mieloides, este es otro capítulo en la historia que tú empezaste. Gracias por todo lo que me enseñaste cuando llegué al laboratorio como pollito. Tu ética de trabajo y tu pasión por la ciencia hicieron que me enamorara de la investigación.

Rocío, gracias por tu disposición, los consejos y la orientación todos estos años.

Patri y Ceci, se me hace imposible poner en palabras lo que habéis sido para mí estos años. Lo primero, gracias por las risas, que han sido muchas y los momentos inolvidables. Gracias por vuestra generosidad, por aceptarme al 100%, por los consejos y por el apoyo incondicional. Aprender a vuestro lado ha sido un privilegio. Gracias por hacer de la séptima mucho más que un lugar de trabajo. Me habéis enseñado el verdadero significado del compañerismo. Patri, entramos literalmente el mismo día y has sido mi “mama” científica desde entonces. No conozco persona con las ideas más claras, vas a hacer con la vida lo que tú decidas. Gracias por ser mi referente, por enseñarme tanto y tan bien, por todos los consejos profesionales y personales y por dejarnos a tus perros de terapia. Para ti, siempre Martiflor. Ceci, querida, siento que a veces me conoces mejor que yo. Supongo que se lo tenemos que agradecer a las miles de horas compartidas en campana o delante del citómetro. Aunque totalmente opuestas no hay nadie con quien hubiera preferido compartir este viaje. Eres luz, transmites paz y tranquilidad y a la vez eres de las personas más fuertes que conozco. Gracias por sacarme del bucle cuando es necesario, por los abrazos, por la ayuda, y por las anécdotas, aunque algunas no se puedan contar. Sin ti, esta tesis no existiría.

Sara, eres el pegamento del servicio. Gracias por escuchar con atención mis audios eternos en los que divago, por los abrazos y por hacerme sentir escuchada. Eres de las personas más generosas que conozco, prestas atención y estás dispuesta a ayudar a todos, incluso cuando no te toca. Ve a donde te valoren porque vales muchísimo. Creas familia allí donde vas, por favor, no cambies nunca.

María, gracias por toda tu ayuda, el viaje a Alicante y el congreso de Málaga, con anécdotas incluidas. Siempre te estaré agradecida por todas esas tardes en la séptima haciéndonos compañía. Te mereces todo lo bueno que te venga y sé que te va a ir genial allá donde vayas.

Dani, aunque a veces quiera matarte un poco, gracias por tu ternura y generosidad. Gracias por tu disposición a ayudar siempre, por los corrillos en la séptima y por llevarte a la tumba las meteduras de pata.

A mis pollitos, por recordarme las ganas y la ilusión del principio. Aunque ya no siga en el 12, contad conmigo para lo que necesitéis. Carlota, eres un torbellino de energía. Entre piraterías, clases de estadística, horas delante del micro y muchas tardes en la séptima gracias por hacer que me vuelva a enamorar otra vez de la ciencia como al principio. Por favor, nunca pierdas la pasión y dedicación con las que enfrentas cada reto. Ángel, gracias por tus ganas de aprender, tu humildad y tu predisposición a ayudar. Vales muchísimo, no dejes que nadie decida tu camino. Lorena, gracias por haber encajado tan bien con este par de locas que te tocaron de compañeras y gracias por la ayuda eligiendo los colores de esta tesis. Créetelo, porque vales mucho.

A las investigadoras de Inmuno, Marina, Elena, Marta y Celia, por toda la ayuda y las risas. Marina, llevas el buen rollo a cualquier situación. Gracias por tener siempre una palabra de ánimo y un abrazo y gracias por las charlitas en los tiempos de espera en cultivos. Al team celular, Marta López y Celia, gracias por toda vuestra ayuda con la citometría, el sorter y los western y por los trapicheos con los reactivos, me habéis salvado de muchas.

A los resis, en especial a Ángel, Álex, Javi Arroyo y Fran, gracias por vuestra ayuda, de mil formas diferentes, por las tardes de cervezas y por las risas y cotilleos en las comidas. Javi Gil, gracias por ese finde en Salamanca gritando *in the middle of the night*, por las risas y por entenderme tan bien.

A los estudiantes que han pasado por el laboratorio ayudando a este trabajo y dejando grandes anécdotas, entre ellas, ese *flask* inclinado rebelde.

Gracias a todo el personal de Inmuno, técnicos y adjuntos, por su trabajo y disponibilidad. En especial gracias a Esther, por su ayuda con los luminex y por sentarte conmigo a resolver, una y otra vez, mis dudas sobre el HLA.

Gracias a cada uno de los pacientes, que con su colaboración y su sangre han hecho posible este trabajo.

Al personal asistencial del hospital por su implicación para que todo saliera adelante, especialmente gracias a Iago, por tu compromiso y tu ayuda.

Y luego está toda esa gente que lleva a mi lado desde antes de que todo esto empezara, que no entiende muy bien qué es eso de la inmunología, pero que me han acompañado y apoyado todo el camino.

Mis niñas de la RMI, con las que empecé esta aventura en Madrid. Judith, de carreras por el metro a meriendas improvisadas. Gracias por estar a mi lado todos estos años, por las risas, por los consejos y por saber qué tecla tocar siempre. Irene D, eres inspiradora. Gracias por alegrarte de mis logros como si fueran tuyos, por ser *my partner in crime* para comentar cualquier serie, libro o peli, por esas tardes de maratones, porque a pesar de la distancia sigues estando igual de presente. A Irenu, por los paseos por Madrid durante el mir, por haber podido verte convertida en la mejor médico, tus pacientes no saben lo afortunados que son de tenerte. Porque a pesar del caos que es tu vida siempre estás. No conozco persona más positiva que tú, gracias por hacerme creer que todo es posible. A Jimena, Inés, Sara, Dulce, Paula, Eva y Arancha porque a pesar del tiempo y la distancia siempre estáis ahí para unas risas y unas palabras de ánimo.

A esas personitas que me dio biotec. Cuatro años sentados juntos han dado muchos, demasiados momentos y risas, cromosoma californía, el viaje de jubilados al acabar la carrera o miles de horas en la cafetería de agrónomos.

Javi, has sido mi constante en Madrid todos estos años. Gracias por aceptarme caótica, intensa, triste, feliz o agobiada. Gracias por cuidarme y por creer en mí cuando yo no puedo. Gracias por hacerme reír cuando la vida se pone demasiado seria. Sin ti, no estaría escribiendo esto ahora mismo.

Alba, creo que contigo fue un *click* instantáneo, con nadie he encajado como contigo. Tres años viviendo juntas y una pandemia las dos solas dan para mucho. Gracias por las risas que acaban con lágrimas en los ojos, por esas noches antes de un examen, sé en lo que estás pensando, y por los miles de momentos en los últimos 10 años. Por estar siempre a un mensaje de distancia, porque aunque ya no vivamos en la misma ciudad, sigo conociendo cada pequeño detalle de tu día. Gracias por los abrazos, por entenderme con la mirada, por haber crecido juntas y por ser siempre mi brújula. Porque siempre tendré una razón para visitar la ciudad en la que tú estes.

Gonzalo, gracias por los vídeos de belugas o focas, y por hacer que me tome la vida un poco menos en serio aunque solo nos veamos cuando los astros se alinean.

A Nacho, miembro honorífico de biotec, gracias por dejarme ocupar tu piso, las palabras de ánimo y aguantar las charlas de tu hermano y mías.

A Carmela, por hacer del máster un año de risas, aunque nos pillara una pandemia en medio.

A Ana, porque lo que nació como una amistad entre dos estudiantes perdidísimas en el mundo de la ciencia sigue hoy entre meriendas, viajes y planes improvisados. Gracias por seguir a mi lado.

A Ana Sobrino, porque aunque fue breve aquí seguimos. Por los viajes a Santander y las vaquitas. Por haberte visto crecer.

A Dennis, mi barbie abogada. Por las tardes haciendo pulseras, porque no puedo escuchar “*sapphire tears on my face*” sin pensar en esa tarde antes del eras, por los conciertos, los viajes y por las charlas en el pasillo. Eres la persona más constante y capaz que conozco, y tienes unos valores increíbles. Verte conseguir todas tus metas ha sido maravilloso.

A Igor, María y Cris, por cuidarme tanto estos años.

A Silvia, por ser la culpable de que esté hoy aquí escribiendo estas líneas. Gracias por abrirme las puertas al mundo de la biología, por sembrar la semilla y contagiarme tu pasión por ella. Gracias por ser inspiración, el mundo necesita profesoras como tú.

Gracias también a quienes, en medio de sus propias rutinas, siempre han encontrado un momento para preguntar cómo iba todo. A las amigas de mi hermana – Leyre, Élida, Andrea, Sara y Víctor – siempre pendientes, a Cris, a Álvaro, a Menchu, Irache y Paula, por vuestros mensajes de ánimo y a los amigos de mis padres y los vecinos de Tudela y sus “cómo va esa tesis, venga que ya queda menos” en las visitas *express*.

Y por supuesto gracias a mi familia, que sin saber muy bien que era eso que hacía siempre están. A mis tíos – Rafa, Inma, Fernando, Ramón, Paco y Luz – por cuidarme tanto y estar en todas las etapas de mi vida. A Inma, por adoptar el papel de segunda madre en Madrid. A ese pequeño torbellino de energía que llegó de forma inesperada para alegrar la familia, una tarde contigo recarga las pilas. A Concha y Enrique, por ser una constante en mi vida. A Cova porque aunque te fuiste pronto, te pienso siempre. A Marta, por enseñarme cómo ver la vida. A Juani y Sandra, porque la familia no

siempre es de sangre. Gracias por las velas a Santa Ana, las croquetas y el caldito. Por haber llenado mi infancia de alegría, entre manualidades, tardes de piscina y días de reyes. Porque lleváis conmigo toda la vida celebrando cada logro.

A mi hermana, por ser mi fiel aliada. Moni, crecer a tu lado ha sido maravilloso pero haber podido compartir rutina estos últimos años ha sido un regalo inesperado que me ha dado esta tesis. Porque no conozco la vida sin ti, porque llevas 26 años siendo mi compañera de juegos, porque nadie me entiende como tú. Por toda una vida de risas, de caos, porque a tu lado la vida nunca es aburrida. Por cuidarme y acompañarme siempre incondicionalmente. Eres leal como nadie y ojalá nunca pierdas la pasión que te caracteriza.

A Mamá y Papá, Marta y Javier, gracias por haber hecho posible con vuestro esfuerzo que haya llegado hasta aquí. Gracias por todos los sacrificios que habéis hecho por nosotras. Gracias por transmitirnos la curiosidad y la pasión por la lectura y el conocimiento. Gracias por ser los mejores referentes en la vida. Gracias por ser el lugar seguro al que siempre poder volver. Por enseñarme que disfrutar del camino es igual de importante que la meta. Soy lo que soy, gracias a vosotros. Esta tesis es también vuestra.

A Taylor Swift por ser la banda sonora de esta tesis.

A los libros por ser el lugar al que escapar.

Y por último a Madrid, que ha sido casa estos 10 años, por los recuerdos inmortales y toda la gente que me has dado.

Y hay quien te cuida

Y hay quien te quiere

Y hay quien está cuando parece que no hay quien te espere

Y hay una inmensa cantidad de gente que te piensa

Porque aunque no se queden, las cosas del pasado

Nadie podrá quitarte las memorias que has guardado

Las que has vivido siempre quedarán dentro y contigo

Un hogar, Valeria Castro

Índice

Abreviaturas	27
Resumen	33
Abstract	37
Introducción	43
1. Tolerancia Inmunológica: Implicaciones en Cáncer y Trasplante	45
2. MDSC	49
2.1. Definición y Clasificación	49
2.2. Desarrollo de las MDSC	51
2.3. Mecanismos pro-tumorales de las MDSC	55
2.3.1. Mecanismos inmunológicos	55
2.3.2. Mecanismos no inmunológicos	58
2.4. Papel de las MDSC en la progresión tumoral	60
3. Hepatocarcinoma	62
3.1. Epidemiología y etiopatogenia	62
3.2. Sistemas de estadificación y opciones terapéuticas	65
3.3. Sistema inmunitario en el HCC	68
3.3.1. Microambiente tumoral en el HCC	68
3.3.2. MDSC en el HCC	71
4. Trasplante Renal	72
4.1. Enfermedad renal crónica y terapias sustitutivas	72
4.2. Respuesta inmunitaria alogénica en el trasplante renal	74
4.3. Terapia inmunosupresora	79
4.3.1. Terapia de inducción	79
4.3.2. Terapia de mantenimiento	80
4.3.3. Tratamiento del rechazo	81
4.4. Complicaciones en el post-trasplante	83
4.4.1. Eventos cardiovasculares	83
4.4.2. Infecciones	83
4.4.3. Neoplasia de novo	84
4.5. Papel de las MDSC en el trasplante	85
Objetivos	91
Materiales y Métodos	97

1. Pacientes	99
2. Muestras	100
3. Poblaciones mieloides por citometría de flujo	100
4. Ensayo de inmunosupresión <i>in vitro</i>	103
5. Ensayo de activación del complemento por basiliximab	105
6. Fosforilación de STAT5	106
7. Actividad Arginasa-1	106
8. Cuantificación de citoquinas	107
9. Detección de anticuerpos anti-HLA	107
10. Tipaje HLA	108
11. Estadística	108
Resultados	113
CAPÍTULO I: Las eMDSC expresan el receptor de IL-2	115
1.1. Expresión de CD25 (IL2R- α) en eMDSC e impacto de basiliximab	117
1.2. Las eMDSC presentan un receptor funcional de IL-2	120
1.3. Expresión de CD25 (IL2R- α) en eMDSC e impacto de eMDSC CD25 ⁺ en receptores de trasplante hepático	122
CAPÍTULO II: Estudio de las subpoblaciones de MDSC en pacientes con hepatocarcinoma	125
2.1. Características clínicas de los pacientes con HCC	127
2.2. Expansión de MDSC en HCC	130
2.3. Los pacientes con HCC presentan mayor ambiente inmunosupresor	131
2.4. Capacidad inmunosupresora de las MDSC <i>in vitro</i>	133
2.5. Mayor capacidad supresora asociada a M-MDSC	135
2.6. El HCC avanzado se asocia con las subpoblaciones de M-MDSC y eMDSC	136
CAPÍTULO III: Las M-MDSC son un factor de riesgo de aparición de neoplasia en el post-trasplante renal	149
3.1. Descripción de la cohorte de estudio	151
3.2. Expansión de M-MDSC post-trasplante	154
3.3. Las M-MDSC en pacientes sin y con neoplasia en el post-trasplante	155
3.4. Estratificación de los RTR en función de los niveles de M-MDSC	159
3.5. Las M-MDSC altas confieren riesgo de forma independiente para la aparición de neoplasia en receptores renales	160
3.6. Perfil de las M-MDSC en receptores renales con distintos tipos de tumor	165

3.7.	La edad es el único factor de riesgo independiente para la aparición de carcinoma cutáneo basocelular en RTR	168
3.8.	Las M-MDSC elevadas predicen la aparición de carcinoma cutáneo epidermoide en RTR	172
3.9.	Las M-MDSC elevadas son un factor de riesgo independiente para la aparición de tumores profundos en pacientes con trasplante renal	177
3.10.	Las M-MDSC altas protegen del rechazo	184
3.11.	Factores de riesgo asociados a la muerte en receptores renales	190
Discusión		195
1.	Las eMDSC expresan CD25 y presentan un receptor de IL-2 funcional	197
2.	Papel de las MDSC en la progresión tumoral del HCC	199
3.	Las M-MDSC son un factor de riesgo de la aparición de neoplasia en el post-trasplante renal	203
Conclusiones		211
Bibliografía		217
Anexos		257

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema del desarrollo, reclutamiento y diferenciación de las MDSC _____	54
Figura 2. Mecanismos inmunosupresores y pro-tumorales de las MDSC _____	60
Figura 3. Etiopatogenia y factores de riesgo de la carcinogénesis en el hepatocarcinoma _____	64
Figura 4. Microambiente tumoral en el hepatocarcinoma _____	70
Figura 5. Reconocimiento y presentación de aloantígenos _____	75
Figura 6. Respuesta inmunitaria alógena en el trasplante renal _____	78
Figura 7. Dianas celulares de los fármacos inmunosupresores en linfocitos T _____	81
Figura 8. Estrategias terapéuticas dirigidas al rechazo mediado por anticuerpos _____	82
Figura 9. Estrategia de gateo para las poblaciones de MDSC en pacientes con HCC _____	102
Figura 10. Estrategia de gateo para las poblaciones mieloides en RTR _____	103
Figura 11. Esquema del ensayo de inmunosupresión <i>in vitro</i> mediada por MDSC _____	104
Figura 12. Estrategia de gateo para el ensayo de supresión _____	105
Figura 13. Las eMDSC disminuyen sostenidamente en los RTR tratados con basiliximab _____	118
Figura 14. Basiliximab se une a CD25 en las eMDSC _____	119
Figura 15. Expresión del receptor de IL-2 en eMDSC _____	121
Figura 16. Funcionalidad del IL-2R _____	122
Figura 17. Las eMDSC CD25 ⁺ están presentes en RTH y aumentan post-trasplante _____	123
Figura 18. Las MDSC se expanden en pacientes con HCC _____	130
Figura 19. Marcadores solubles de inmunosupresión en los pacientes con HCC _____	131
Figura 20. Caracterización de los pacientes con cáncer hepático en función de las poblaciones mieloides _____	132
Figura 21. MDSC aisladas de pacientes con HCC inhiben la proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ _____	134
Figura 22. Análisis de correlación de la inhibición de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ y las poblaciones y parámetros mieloides _____	136
Figura 23. Relación entre MDSC y actividad Arg-1 y diabetes, hepatitis y cirrosis, en pacientes con HCC _____	137
Figura 24. Niveles de MDSC en pacientes con HCC según el número de nódulos tumorales _____	138
Figura 25. Niveles de MDSC en pacientes con HCC según el estadio TNM _____	140
Figura 26. Niveles de MDSC en pacientes con HCC con altos niveles de alfa-fetoproteína (aFP) _____	141
Figura 27. Correlación entre poblaciones mieloides y variables clínicas y analíticas continuas en pacientes con HCC _____	144
Figura 28. PCA de las poblaciones mieloides y los pacientes con HCC clasificados en función del desenlace clínico (supervivencia o exitus) _____	146
Figura 29. Expansión de las M-MDSC durante el primer año post-trasplante _____	155
Figura 30. Dinámica de las M-MDSC y monocitos durante el primer año post-trasplante en receptores con y sin neoplasia _____	158
Figura 31. <i>Forest plot</i> de los <i>Hazard Ratio</i> (HR) para la aparición de neoplasia en el post-trasplante _____	164
Figura 32. RTR con niveles altos de M-MDSC presentan menor supervivencia libre de malignidad _____	165
Figura 33. Dinámica de las M-MDSC en RTR clasificados en función del tipo de tumor desarrollado post-trasplante _____	167
Figura 34. <i>Forest plot</i> de los <i>Hazard Ratio</i> (HR) para la aparición de carcinoma cutáneo epidermoide en el post-trasplante _____	176
Figura 35. RTR con niveles altos de M-MDSC presentan menor supervivencia libre de malignidad _____	177
Figura 36. <i>Forest plot</i> de los <i>Hazard Ratio</i> (HR) para la aparición de tumores de órganos profundos en el post-trasplante _____	182
Figura 37. RTR con niveles altos de M-MDSC presentan menor supervivencia libre de malignidad _____	183
Figura 38. RTR con niveles altos de M-MDSC presentan mayor supervivencia libre de rechazo _____	189

Índice de Tablas

Tabla 1. Identificación fenotípica de las subpoblaciones de MDSC en humano y ratón de acuerdo con V. Bronte <i>et al.</i> ⁶⁷	50
Tabla 2. Sistema de Estadificación Child-Pugh	65
Tabla 3. TNM para HCC según recomendación de AJCC y UICC. Adaptada de B. Mahul <i>et al.</i> ¹⁹⁵	66
Tabla 4. Estadificación según TNM Adaptada de B. Mahul <i>et al.</i> ¹⁹⁵	66
Tabla 5. Sistema de estadificación BCLC. Adaptada de ¹⁹⁷	67
Tabla 6. Anticuerpos monoclonales de superficie para el análisis de poblaciones mieloides por citometría de flujo	101
Tabla 7. Condiciones experimentales para el ensayo de fosforilación intracelular de STAT5	106
Tabla 8. Características de los pacientes con cáncer hepático	128
Tabla 9. Poblaciones mieloides y características clínicas de los pacientes con HCC	142
Tabla 10. Relación entre inhibición de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ y características clínicas	145
Tabla 11. Características de la cohorte de trasplante renal	152
Tabla 12. Características de los RTR sin y con neoplasia en el post-trasplante	156
Tabla 13. Especificidad, sensibilidad y área bajo la curva (AUC) para los puntos de corte de M-MDSC determinados con curvas ROC	160
Tabla 14. <i>Hazard Ratio</i> (HR) e intervalo de confianza al 95 % para la aparición de neoplasia en el post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes	162
Tabla 15. Clasificación de las neoplasias desarrolladas por los RTR	166
Tabla 16. Características de los RTR con carcinoma cutáneo basocelular	168
Tabla 17. <i>Hazard Ratio</i> (HR) e intervalo de confianza al 95 % para la aparición de carcinoma cutáneo basocelular en el post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes	170
Tabla 18. Características de los RTR con carcinoma cutáneo epidermoide	172
Tabla 19. <i>Hazard Ratio</i> (HR) e intervalo de confianza al 95 % para la aparición de carcinoma cutáneo epidermoide en el post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes	174
Tabla 20. Características de los RTR con tumores no cutáneos en el post-trasplante	178
Tabla 21. <i>Hazard Ratio</i> (HR) e intervalo de confianza al 95 % para la aparición de tumores no cutáneos en el post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes	180
Tabla 22. <i>Hazard Ratio</i> (HR) e intervalo de confianza al 95 % para el desarrollo de anticuerpos anti-HLA en el post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes	184
Tabla 23. <i>Hazard Ratio</i> (HR) e intervalo de confianza al 95 % para el desarrollo de anticuerpos anti-HLA donante-específicos (DSA) post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes	186
Tabla 24. <i>Hazard Ratio</i> (HR) e intervalo de confianza al 95 % para la aparición de eventos de rechazo post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes	188
Tabla 25. <i>Hazard Ratio</i> (HR) e intervalo de confianza al 95 % para los exitus post-trasplante calculados por regresión de Cox univariante y multivariante	191

Abreviaturas

AASLD: Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas, *American Association of for the Study of Liver Disease*

ABMR: Rechazo mediado por anticuerpos, *Antibody-mediated rejection*

Ac: Anticuerpo

ADAM17: Dominio desintegrasa y metaloproteína 17, *disintegrin and metalloproteinase domain 17*

ADCC: Citotoxicidad dependiente de anticuerpos, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*

ADCP: Citotoxicidad celular dependiente de fagocitosis, *Antibody-dependent Cellular Phagocytosis*

ADP: Adenosín Difosfato

aFP: Alfa-fetoproteína

AJCC: Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer, *American Joint Committee on Cancer*

AKT: Proteína quinasa B, *Protein kinase B*

AMP: Adenosín Monofosfato

AP-1: Proteína Activadora 1

APC: Células presentadoras de antígeno, *Antigen-presenting cells*

Arg-1: Arginasa-1

ASC: Transportador de aminoácidos de tipo asc, *asc type amino acid transporter*

ATG: Globulina anti-timocítica, *anti-thymocyte globulin*

ATP: Adenosín Trifosfato

AUC: Área bajo la curva

BAS: Basiliximab

BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*

BCR: Receptor de linfocitos B, *B cell receptor*

BMI: Índice Masa Corporal, *Body Mass Index*

Breg: Linfocitos B reguladores

BSA: Albumina sérica bovina, *Bovine serum albumin*

C/EBP: Proteína potenciadora de unión a CCAAT α , *CCAAT/enhancer-binding protein α*

CAF: Fibroblastos asociados a cáncer, *cancer-associated fibroblasts*

CAR: Receptor de antígeno quimérico, *Chimeric Antigen Receptor*

CAT-2B: Transportador de aminoácidos catiónicos 2B

CCA: Hepatocolangiocarcinoma

CCB: Carcinoma Cutáneo Basocelular

CCE: Carcinoma Cutáneo Epidermoide

CCL: Ligando de la quimioquina (motivo C-C), *chemokine (C-C motif)*

CCNM: Cáncer cutáneo no melanoma

CCR: Receptor de quimioquinas tipo C-C, *C-C chemokine receptor type*

CDC: Citotoxicidad dependiente de complemento

CDK: Ciclina dependiente de quinasa, *Cyclin-dependent kinase*

CFSE: Éster de succinimidil carboxifluoresceína, *carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CMP: Progenitores mieloides comunes, *Common myeloid progenitors*

CMV: Citomegalovirus

ConA: Concanavalina A

CP: Child-Pugh

CS: Controles Sanos

CTL: Linfocitos T citotóxicos, *Cytotoxic T Lymphocyte*

CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

CX3CL1: Ligando 1 de quimioquinas (motivo C-X3-C), *chemokine (C-X3-C motif) ligand 1*

CXCL1: Ligando de quimioquinas CXC tipo 1, *CXC chemokine ligand type 1*

CXCR: Receptor de quimioquinas CXC, *CXC chemokine receptor*

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño o lesión, *Damage-associated molecular patterns*

- DAPI:** 4,6-diamidino-2-fenilindol
- DC:** Células Dendríticas, *Dendritic Cells*
- DO:** Densidad Óptica
- DSA:** Anticuerpos donante específicos, *donor-specific antibodies*
- EASL:** Asociación Europea para el Estudio del Hígado, *European Association for the Study of the Liver*
- ECOG:** *Eastern Cooperative Oncology Group*
- EGF:** Factor de crecimiento epidermoide, *epidermal growth factor*
- EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidermoide, *epidermal growth factor receptor*
- eMDSC:** Células supresoras de estirpe mieloide *early-stage*
- ENTDP2:** Enzima ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 2, *ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2*
- ERC:** Enfermedad Renal Crónica
- ERCA:** Enfermedad Renal Crónica Avanzada
- ERK:** Quinasa regulada por señales extracelulares, *extracellular-signal-regulated kinase*
- FasL:** Fas ligando
- FBS:** Suero bovino fetal, *Fetal bovine serum*
- FcR:** Receptores Fc
- FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos, *fibroblasts growth factor*
- FMO:** *Fluorescence minus one*
- FOXP3:** *Forkhead box P3*
- FPR:** Razón de falsos positivos, *false positive rate*
- FSC-A:** *Forward-scatter area*
- FSC-H:** *Forward-scatter height*
- G-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos, *granulocyte colony-stimulating factor*
- Gal-9:** Galectina-9
- GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- GMP:** Progenitores de granulocitos-macrófagos, *granulocyte-macrophage progenitors*
- H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno
- HCC:** Hepatocarcinoma Celular
- HeSC:** Células madre hematopoyéticas, *hematopoietic stem cells*
- HGF:** Factor de crecimiento de hepatocitos, *hepatocyte growth factor*
- HIF-1:** Factor 1 inducible por hipoxia, *Hypoxia-inducible factor 1*
- HLA:** Antígeno Leucocitario Humano, *human leukocyte antigen*
- HR:** *Hazard Ratio*
- HSC:** Células estrelladas hepáticas, *Hepatic stellate cells*
- IDO:** Indolamina 2,3-dioxigenasa
- IC:** Intervalo de Confianza
- IFN- γ :** Interferón gamma
- Ig:** Inmunoglobulina
- IGF:** Factor de crecimiento insulínico, *insulin-like growth factor*
- IKK:** Quinasa I κ B, *I κ B kinase*
- IL-2R:** Receptor Interleuquina 2
- IL-2R α :** Cadena alfa del Receptor Interleuquina 2
- IL-2R β :** Cadena beta del Receptor Interleuquina 2
- IL-2R γ :** Cadena gamma del Receptor Interleuquina 2
- IL:** Interleuquina
- IMC:** Células Mieloides Inmaduras, *Immature Myeloid Cells*
- IMPDH:** Inosina 5' monofosfato deshidrogenasa, *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*
- iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible, *inducible nitric oxide synthase*
- INR:** Índice Internacional Normalizado
- IQR:** Rango intercuartílico, *Interquartile range*
- IRF:** Factor regulador de interferón, *Interferon regulatory factor*
- IVIG:** Inmunoglobulina Intravenosa

- JAK:** Quinasas Janus, *Janus Kinases*
- JAML:** Molécula de adhesión de unión *like*, *Junction adhesión molecule like*
- K_d:** Constante de disociación
- KC:** Células de Kupffer
- lncRNA:** RNA de cadena larga no codificantes, *long non-coding RNA*
- LOX1:** Receptor de la lipoproteína de baja densidad oxidado tipo lectina 1, *lectin-type oxidized LDL receptor 1*
- LSEC:** Células endoteliales sinusoidales hepáticas, *liver sinusoidal endothelial cells*
- M-CSF:** Factor estimulante de colonias de macrófagos, *macrophage colony-stimulating factor*
- M-MDSC:** Células supresoras de estirpe mieloide monocíticas
- M ϕ :** Macrófagos
- MAC:** Complejo de ataque a membrana, *membrane attack complex*
- MAPK:** Quinasa Activada por Mitógeno, *Mitogen-Activated Protein Kinase*
- MB:** Mieloblastos
- MDP:** Progenitores de macrófagos/células dendríticas, *macrophage/dendritic cell progenitors*
- MDSC:** Células supresoras de estirpe mieloide, *Myeloid-derived Suppressor Cells*
- MELD:** *Model for End-stage Liver Disease*
- MFI:** Intensidad media de fluorescencia, *mean fluorescence intensity*
- MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad, *major histocompatibility complex*
- miRNA:** micro RNA
- MMF:** Micofenolato Mofetilo
- MMP:** Metaloproteínasa de Matriz
- mTOR:** Diana de Rapamicina en Células de Mamífero, *Mammalian Target of Rapamycin*
- NAFLD:** Enfermedad de hígado graso no alcohólico, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*
- NASH:** Esteatohepatitis no-alcohólica, *non-alcoholic steatohepatitis*
- NET:** trampas extracelulares de neutrófilos, *Neutrophil extracellular traps*
- NF- κ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
- NFAT:** Factor activador de linfocitos T activados, *Nuclear factor of activated T-cells*
- NK:** Células *Natural Killer*
- NO:** Óxido Nítrico
- NOX-2:** Isoforma 2 de la NADPH oxidasa, *NADPH oxidase isoform 2*
- Nrf2:** Factor nuclear derivado de eritroide 2, *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
- NSCLC:** Carcinoma de pulmón no microcítico, *Non Small-Cell Lung Cancer*
- O₂⁻:** Anión superóxido
- OH:** Hidroxilo
- ONOO:** Peroxinitrito
- PAMP:** Patrones moleculares asociados a patógenos, *Pathogen-associated molecular patterns*
- PBMC:** Células mononucleares de sangre periférica, *peripheral blood mononuclear cells*
- PBS:** Tampón fosfato salino, *phosphate buffered saline*
- PCA:** Análisis de componentes principales, *Principal Component Analysis*
- PCR-SSP:** PCR de Cebador específico único, *Sequence Specific Primers PCR*
- PD-1:** Proteína de muerte celular programada 1, *Programmed cell death protein 1*
- PD-L1:** Ligando de PD-1
- PDE:** Fosfodiesterasa, *Phosphodiesterase*
- PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas, *platelet-derived growth factor*
- PGE2:** Prostaglandina E2
- PHA:** Fitohemaglutinina
- PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa
- PMN-MDSC:** Células supresoras de estirpe mieloide polimorfonucleares
- PRR:** Receptor de Reconocimiento de Patrones, *Pattern Recognition Receptor*

- pSTAT5:** STAT5 Fosforilado
- PTLD:** Trastorno linfoproliferativo post-trasplante, *Post-transplant Lymphoproliferative Disorder*
- QETA:** Quimioembolización Transarterial
- RAGE:** Receptor para Productos Finales de Glicación Avanzada, *Receptor for advanced glycation end-products*
- RB1:** Retinoblastoma
- REDYT:** Registro Español de Diálisis y Trasplante
- RETA:** Radioembolización Transarterial
- RNS:** Especies reactivas de nitrógeno, *Reactive nitrogen species*
- ROC:** Característica Operativa del Receptor, *Receiver Operating Characteristic*
- ROI:** Intermediarios reactivos de oxígeno, *Reactive oxygen intermediates*
- ROS:** Especies reactivas de oxígeno, *Reactive oxygen species*
- rpm:** Revoluciones por minuto
- RPMI:** Medio Roswell Park Memorial Institute
- RTH:** Receptores de Trasplante Hepático
- RTR:** Receptores de Trasplante Renal
- SCC-A:** *Side-scatter area*
- SDF-1:** Factor 1 derivado del estroma, *stromal cell-derived factor 1*
- SLM:** Supervivencia Libre de Malignidad
- SLR:** Supervivencia Libre de Rechazo
- STAT:** Transductor de señal y activador de la transcripción, *Signal transducer and activator of transcription*
- TAM:** Macrófagos asociados a Tumor, *Tumor-associated Macrophages*
- TAN:** Neutrófilos asociados a Tumor, *Tumor-associated Neutrophils*
- TCR:** Receptor de linfocitos T, *T cell receptor*
- TERT:** Telomerasa Transcriptasa Inversa
- TFG:** Tasa filtrado glomerular
- Tfh:** Linfocitos T foliculares cooperadores, *T follicular helper cells*
- TGF-β:** Factor de crecimiento transformante beta, *transforming growth factor beta*
- Th:** Linfocitos T cooperadores, *T helper cells*
- TIGIT:** Inmunoglobulina de células T y dominio ITIM, *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*
- TIL:** Linfocitos T infiltrantes de tumor, *Tumor-infiltrating lymphocytes*
- TIM-3:** Inmunoglobulina de linfocitos T que contiene dominio de mucina-3, *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*
- TIMP1:** Inhibidor de Metalopeptidasas 1, *Metallopeptidase Inhibitor 1*
- TKI:** Inhibidores de tirosina quinasa
- TLR:** Receptores de tipo toll, *toll-like receptors*
- TME:** Microambiente tumoral, *tumor microenvironment*
- TNC:** Tumores No Cutáneos
- TNF-α:** Factor de necrosis tumoral alfa, *Tumor necrosis factor alpha*
- TNFR-2:** Receptor 2 de TNF-α
- TNM:** Tumor, Nódulo, Metástasis, *Tumor/Node/Metastasis*
- TPR:** Razón de verdaderos positivos, *true positive rate*
- TRAIL:** Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
- Treg:** Linfocitos T reguladores
- TRS:** Terapia renal sustitutiva
- UICC:** Unión Internacional Contra el Cáncer, *Union for International Cancer Control*
- VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular, *vascular endothelial growth factor*
- VHB:** Virus de la Hepatitis B
- VHC:** Virus de la Hepatitis C
- VISTA:** Supresor de Inmunoglobulina de dominio V de la Activación de célula T, *V-domain Ig-containing suppressor of T-cell activation*
- Xc⁻:** Transportador cisteína-glutamato, *cystine-glutamate transporter*
- Zap70:** Proteína asociada a zeta de 70 kDa, *zeta-associated protein 70*

Resumen

Las células supresoras de estirpe mieloide (MDSC) son una población heterogénea de células mieloides inmaduras con capacidad inmunosupresora que se acumulan en condiciones de inflamación crónica no resuelta. Se distinguen tres subpoblaciones de MDSC atendiendo a su densidad, morfología y marcadores fenotípicos: monocíticas o M-MDSC, definidas como $CD33^+CD11b^+CD14^+CD15^-HLA-DR^{-low}$, polimorfonucleares o PMN-MDSC, identificadas como $CD33^+CD14^-CD15^+HLA-DR^-$ y una tercera subpoblación más inmadura denominada *early-stage* o eMDSC y definida como $CD33^+CD11b^+CD14^-CD15^-HLA-DR^-$.

Gracias a un amplio repertorio de mecanismos inmunosupresores, las MDSC juegan un papel fundamental en la evasión tumoral del sistema inmunitario impidiendo, sobre todo, la función de linfocitos T pero también la de linfocitos B, células Natural *Killer* y células dendríticas a la vez que favorecen poblaciones supresoras como linfocitos T reguladores o macrófagos tolerogénicos. En hepatocarcinoma (HCC), la presencia de MDSC se ha asociado con una mayor progresión tumoral, peor pronóstico y resistencia a tratamientos. Por tanto, una caracterización detallada de las subpoblaciones de MDSC en HCC y su relación con la progresión de la enfermedad podría ofrecer herramientas diagnósticas y terapéuticas relevantes.

Por el contrario, en el contexto del trasplante renal las MDSC surgen como una población potencialmente beneficiosa que favorece un ambiente tolerogénico evitando así el rechazo inmunológico. Sin embargo, uno de los principales factores de mortalidad en pacientes trasplantados es el desarrollo de neoplasias, íntimamente relacionado con la inmunosupresión. En estudios previos, las M-MDSC han emergido como un posible factor de riesgo para la aparición de cáncer en fases tempranas del post-trasplante.

En este contexto, los objetivos de la presente Tesis Doctoral fueron:

1. Evaluar la presencia y funcionalidad de CD25 en la población de eMDSC.
2. Analizar el papel de las MDSC circulantes en pacientes con hepatocarcinoma.
3. Evaluar el papel de las M-MDSC como factor de riesgo de aparición de neoplasia en el post-trasplante renal tardío.

En cuanto al primer objetivo, la significativa reducción de eMDSC en pacientes tratados con basiliximab, anticuerpo monoclonal dirigido frente a CD25, permitió identificar una nueva población de eMDSC que expresa la cadena α del receptor de IL-2 o CD25. El bloqueo de esta molécula por basiliximab media la depleción de las eMDSC por un mecanismo no dependiente de la activación del complemento. Además, se demostró que las eMDSC, a diferencia de los monocitos, M-MDSC o PMN-MDSC, presentaban las tres cadenas (α , β y γ) del receptor completo de IL-2, y que este es funcional. En receptores de trasplante hepático con HCC, se observaron niveles elevados de eMDSC CD25⁺, los cuales aumentaban en el post-trasplante.

En relación con el segundo objetivo, los pacientes con HCC mostraron un entorno inmunosupresor más marcado que los controles sanos y los pacientes con hepatocolangiocarcinoma. Este ambiente inmunosupresor estaba caracterizado por expansión de las tres poblaciones de MDSC: M-MDSC, PMN-MDSC y eMDSC, junto con la nueva población eMDSC CD25⁺, y por la presencia de factores solubles inmunosupresores, como la actividad arginasa-1 y la IL-10 circulantes. Las MDSC mostraron capacidad supresora de la proliferación linfocitaria *in vitro*, siendo las M-MDSC la subpoblación más relacionada con la inmunosupresión mientras que las eMDSC CD25⁺ correlacionaban con mayor proliferación linfocitaria. Asimismo, los pacientes con HCC avanzado – con mayor número de nódulos, mayor estadio TNM o mayores niveles séricos de alfa-fetoproteína – presentaban mayores proporciones de M-MDSC, eMDSC y eMDSC CD25⁺. Además, el número de nódulos correlacionó directamente con la supresión linfocitaria dependiente de MDSC.

Finalmente, en cuanto al tercer objetivo, se evaluó la asociación entre variables clínicas y niveles de M-MDSC con la aparición de neoplasias hasta 9 años después del trasplante renal. La edad y niveles elevados de M-MDSC en el periodo peritrasplante surgieron como los únicos factores de riesgo independientes de aparición de neoplasia. Al estratificar según el tipo de tumor, las M-MDSC, junto con la edad, también resultaron un factor de riesgo independiente de aparición de carcinoma cutáneo epidermoide o tumores profundos, pero no se asociaron a la aparición de carcinoma cutáneo basocelular. Las M-MDSC se comportaron como un factor protector frente a episodios de rechazo.

En resumen, las MDSC constituyen una población clave en el microambiente tumoral del HCC con predominio de las M-MDSC y eMDSC. Desde el punto de vista funcional, las M-MDSC mostraron una potente capacidad inmunosupresora y las M-MDSC y eMDSC se asociaron con una mayor progresión tumoral. Se identificó por primera vez la subpoblación eMDSC CD25⁺ que presenta un receptor de IL-2 completo y funcional. Cabe pensar que la eliminación de esta población mieloide, sobre todo las M-MDSC, mejoraría la supervivencia de los pacientes con HCC. En el ámbito del trasplante renal, las M-MDSC se posicionaron como un biomarcador predictivo de aparición de neoplasias y eventos de rechazo en el post-trasplante. Este marcador precoz permitiría identificar pacientes en riesgo de aparición de cáncer en el post-trasplante estableciendo un seguimiento más estrecho y minimizando la inmunosupresión.

Abstract

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are a heterogeneous population of immature myeloid cells with immunosuppressive capacity that accumulate under conditions of unresolved chronic inflammation. Three main MDSC subsets are distinguished based on their density, morphology, and phenotypic markers: monocytic MDSC (M-MDSC), defined as CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-low}; polymorphonuclear MDSC (PMN-MDSC), identified as CD33⁺CD14⁻CD15⁺HLA-DR⁻; and a more immature subset known as early-stage MDSC (eMDSC), defined as CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁻HLA-DR⁻.

Thanks to a wide range of immunosuppressive mechanisms, MDSC play a key role in tumor immune evasion, mainly by inhibiting T cell function, but also affecting B cells, Natural Killer cells, and dendritic cells, while simultaneously promoting suppressive populations such as regulatory T cells and tolerogenic macrophages. In hepatocellular carcinoma (HCC), the presence of MDSC has been associated with increased tumor progression, poor prognosis, and resistance to treatment. Therefore, detailed characterization of MDSC subsets in HCC and their role in disease progression could provide valuable diagnostic and therapeutic tools.

Conversely, in the context of renal transplantation, MDSC appear as a potentially beneficial population that promotes a tolerogenic environment, thereby helping to prevent immune rejection. However, malignancy is one of the main causes of mortality among transplant recipients, closely related to immunosuppressive therapy. Previous studies have identified M-MDSC as a potential risk factor for early post-transplant cancer development.

In this context, the objectives of this Doctoral Thesis were:

1. To evaluate the presence and functionality of CD25 in the eMDSC population.
2. To analyze the role of circulating MDSC in patients with hepatocellular carcinoma.
3. To assess the role of M-MDSC as a risk factor for the development of late post-transplant malignancies.

Abstract

Regarding the first objective, the significant reduction of eMDSC in patients treated with basiliximab, a monoclonal antibody targeting CD25, led to the identification of a novel eMDSC population expressing CD25, the α -chain of the IL-2 receptor. CD25 blockade by basiliximab mediated depletion of eMDSC through a mechanism independent of complement activation. Furthermore, it was shown that eMDSC, unlike monocytes, M-MDSC, or PMN-MDSC, express all three subunits (α , β , and γ) of the complete IL-2 receptor, which was functional. In liver transplant recipients with HCC, elevated levels of CD25⁺ eMDSC were observed, which further increased after transplantation.

Regarding the second objective, HCC patients displayed a more pronounced immunosuppressive environment compared to healthy controls and patients with cholangiocarcinoma. This immunosuppressive environment was characterized by the expansion of all three MDSC subsets: M-MDSC, PMN-MDSC, and eMDSC, along with the newly identified CD25⁺ eMDSC, and increased levels of soluble immunosuppressive factors such as circulating arginase-1 activity and IL-10. MDSC demonstrated suppressive capacity of lymphocyte proliferation *in vitro*, with M-MDSC being the subset most strongly associated with immunosuppression, while CD25⁺ eMDSC correlated with higher lymphocyte proliferation. In addition, patients with advanced HCC, defined by a higher number of tumor nodules, advanced TNM stage, or elevated serum alpha-fetoprotein levels, showed increased proportions of M-MDSC, eMDSC, and CD25⁺ eMDSC. The number of nodules correlated directly with MDSC-dependent suppression of lymphocyte proliferation.

Finally, regarding the third objective, the association between clinical variables, M-MDSC levels, and the development of malignancies up to 9 years post-renal transplantation was evaluated. Age and elevated M-MDSC levels during the peritransplant period emerged as the only independent risk factors for the development of cancer. When stratifying by tumor type, M-MDSC, along with age, were also found to be independent risk factors for the development of squamous cell carcinoma and non-cutaneous tumors, but not for basal cell carcinoma. M-MDSC acted as a protective factor against rejection episodes.

Collectively, MDSC represent a key population in the tumor microenvironment of HCC, mainly composed of M-MDSC and eMDSC. Functionally, M-MDSC exhibited strong immunosuppressive capacity, and both M-MDSC and eMDSC were associated with greater tumor progression. For the first time, the CD25⁺ eMDSC subset was identified, characterized by the presence of a complete and functional IL-2 receptor. It is reasonable to consider that targeting

and eliminating this myeloid population, particularly M-MDSC, could improve the survival of patients with HCC. In the context of renal transplantation, M-MDSC emerged as a predictive biomarker for the development of post-transplant malignancies and rejection episodes. This early biomarker could help identify patients at risk of post-transplant cancer, allowing for closer monitoring and minimization of immunosuppressive therapy.





Introducción

1. Tolerancia Inmunológica: Implicaciones en Cáncer y Trasplante

Distinguir entre lo propio y lo ajeno es quizás la principal propiedad del sistema inmunitario. El sistema inmunitario es capaz de reconocer, responder y eliminar una amplia variedad de antígenos externos, sin embargo, gracias a mecanismos de tolerancia inmunológica no ataca a lo propio. Defectos en la tolerancia a lo propio o en el reconocimiento de lo ajeno se relacionan con enfermedades autoinmunes o inmunodeficiencias, respectivamente. Por el contrario, las células tumorales aprovechan la tolerancia para impedir el reconocimiento inmunitario favoreciendo la supervivencia del tumor. En el trasplante, en cambio, el rechazo ocurre porque el injerto es identificado como extraño y desencadena una respuesta inmunitaria.

La defensa frente a patógenos y otros agentes extraños está mediada por respuestas secuenciales y coordinadas, denominadas inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad innata actúa como primera línea de defensa mediante barreras físicas, células fagocíticas – neutrófilos, macrófagos y células dendríticas (DC, *Dendritic Cells*) –, células *Natural Killer* (NK) y proteínas plasmáticas¹. Además de contener la infección inicial, esta respuesta influye en la activación y perfil de la inmunidad adaptativa^{2,3}. La inmunidad adaptativa, mediada por linfocitos T y B y altamente específica, orquesta respuestas gracias a un amplio repertorio de receptores antigénicos generado por procesos de reordenamiento somático. Los linfocitos T se activan por el reconocimiento del antígeno presentado en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*), o antígeno leucocitario humano (HLA, *human leukocyte antigen*), de forma que los linfocitos T CD8⁺ reconocen péptidos presentados por MHC de clase I y los linfocitos T CD4⁺ por MHC de clase II^{4,5}. La respuesta adaptativa se caracteriza por: i) ser altamente específica y diversa gracias a la selección clonal y la hipermutación somática; ii) tener memoria; iii) no reaccionar frente a lo propio (tolerancia); y iv) ser sistémica^{6,7}. La tolerancia inmunológica no consiste en una ausencia de respuesta, sino que se trata de un estado activo antígeno-específico que genera memoria⁸⁻¹⁰. El principal mecanismo para la tolerancia tiene lugar durante la maduración celular en el timo, donde los timocitos dobles positivos, CD4⁺CD8⁺, sufren una selección basada en la afinidad del receptor de linfocitos T (TCR, *T cell receptor*) de forma que aquellos que reconocen antígenos con alta afinidad mueren por apoptosis en un proceso conocido como selección negativa, que constituye el mecanismo esencial de tolerancia central¹¹. Algunos de estos clones autorreactivos no son eliminados sino que se

diferencian a linfocitos T reguladores (Treg) que migran a tejidos periféricos contribuyendo a mantener la tolerancia inmunológica¹². Los linfocitos Treg son una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ cuya principal función es suprimir la respuesta inmune. Estas células se caracterizan por la alta expresión de la cadena alfa del receptor de la interleuquina (IL)-2 (IL-2R α) (CD25) y del factor de transcripción *forkhead box P3* (FOXP3), ambos esenciales para su desarrollo, mantenimiento y función, y regulados por la presencia de IL-2^{13,14}.

En la periferia, mecanismos complementarios como anergia, supresión y delección clonal, aseguran la tolerancia periférica. La ausencia de co-estimulación durante el reconocimiento del antígeno induce un estado de anergia en los linfocitos T^{15,16}. Adicionalmente, el sistema inmunitario cuenta con moléculas co-inhibidoras que regulan negativamente la activación de los linfocitos T. Entre las más relevantes se encuentran el Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), que compite con CD28 por los ligandos B7, y la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1, *Programmed cell death protein 1*), cuya expresión se incrementa tras la estimulación antigénica sostenida como mecanismo regulatorio^{17,18}.

En los años 50 se estableció que una de las funciones fisiológicas del sistema inmunitario era reconocer y destruir clones de células transformadas o tumorales. A este fenómeno se le denominó inmunovigilancia^{17,19}. En la actualidad la relación entre tumor y sistema inmune se explica mejor por el concepto de la inmuoedición, proceso por el cual el sistema inmunitario es capaz tanto de contener como de promover el crecimiento tumoral, en tres fases sucesivas: i) eliminación, las células tumorales son reconocidas y eliminadas; ii) equilibrio, con crecimiento tumoral limitado pero que debido a la presión selectiva, junto con la inestabilidad genética, provoca la supervivencia de clones tumorales resistentes a la eliminación; y iii) escape, con crecimiento tumoral incontrolado y reclutamiento de múltiples poblaciones inmunosupresoras – linfocitos Treg, células mieloides supresoras, macrófagos anti-inflamatorios, DC tolerogénicas – al microambiente tumoral (TME, *tumor microenvironment*). Así, durante las tres fases, la inmunogenicidad tumoral se edita y se adquieren mecanismos inmunosupresores que favorecen la progresión tumoral^{20,21}. Las células tumorales, junto con las células mieloides supresoras y los linfocitos Treg, inducen la expresión de CTLA-4 y PD-1 impidiendo la función anti-tumoral de los linfocitos T en el tumor y producen citoquinas anti-inflamatorias y moléculas pro-tumorales²². Además, las células tumorales reducen tanto la expresión de antígenos inmunogénicos como la de MHC de clase I para no ser detectadas por los linfocitos T CD8⁺ ^{23,24}.

Actualmente, las estrategias de inmunoterapia anti-tumoral buscan contrarrestar estos mecanismos de evasión. En la práctica clínica, el tratamiento más consolidado es el uso de inhibidores de *checkpoints* inmunológicos, como los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4, como ipilimumab, los dirigidos contra PD-1, por ejemplo, pembrolizumab y nivolumab, o contra otros reguladores inmunitarios negativos²⁵. La transferencia adoptiva de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL, *Tumor-infiltrating lymphocytes*) fue una estrategia pionera, aunque con resultados modestos debido a la capacidad del tumor de esconder o mutar los antígenos reconocidos²⁶. Para superar estas limitaciones, se desarrollaron linfocitos T modificados genéticamente, primero mediante la ingeniería de su TCR y posteriormente mediante la incorporación de receptores quiméricos de antígeno (CAR, *Chimeric Antigen Receptor*), dando lugar a los linfocitos CAR-T²⁵. Las vacunas terapéuticas contra el cáncer, diseñadas para inducir inmunidad específica frente a células tumorales, aunque con potencial terapéutico no han acabado de establecerse como una opción clínica²⁷.

En su mayoría, las estrategias se centran en restaurar la funcionalidad de los linfocitos T, sin embargo, son muchas las poblaciones mieloides que también favorecen la evasión inmune. Estrategias dirigidas a potenciar las poblaciones mieloides inflamatorias o eliminar aquellas células inmunosupresoras podrían representar un avance significativo en la eficacia terapéutica. En este sentido, se ha observado que los anticuerpos frente al ligando de PD-1 (PD-L1) pueden restaurar la función anti-tumoral de las DC asociando mejoría clínica y mayor supervivencia²⁸. En el caso de los linfocitos Treg, los anticuerpos dirigidos frente a CTLA-4 o el receptor de quimioquinas C-C tipo 4 (CCR4, *C-C chemokine receptor type 4*) han demostrado deplecionar linfocitos Treg eficientemente²⁹. Asimismo, múltiples estudios preclínicos indican que la depleción o inhibición de las poblaciones mieloides supresoras podría tener beneficio clínico. Las principales dianas son el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*) junto con el ligando de la quimioquina (motivo C-C) tipo 2 (CCL2, *chemokine (C-C motif) ligand 2*) y el receptor de quimioquinas CCR2, responsables del reclutamiento de las células mieloides al TME³⁰⁻³³. Sin embargo, a pesar de los múltiples ensayos clínicos evaluando el bloqueo de M-CSF, no se ha reportado eficacia clínica³³. La inhibición del eje CCL2/CCR2, aunque menos estudiado, ha resultado más prometedor con respuesta parcial en combinación con quimioterapia en adenocarcinoma de páncreas^{33,34} aunque otros ensayos clínicos no pudieron objetivar respuesta anti-tumoral^{35,36}.

Por el contrario, en el trasplante, el rechazo del injerto podría prevenirse mediante la inducción de tolerancia a aloantígenos del donante. Lograr tolerancia en este contexto permitiría una inhibición inmunitaria aloespecífica, es decir, específica para los antígenos del injerto, en contraposición a la inmunosupresión generalizada inducida por los fármacos inmunosupresores empleados – globulina anti-timocítica, anticuerpos monoclonales contra el receptor de IL-2 como basiliximab, o inhibidores de calcineurina como tacrolimus o de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, *mammalian Target of Rapamycin*) como sirolimus, entre otros – los cuales llevan asociado un aumento del riesgo de infecciones y neoplasias³⁷. Las principales estrategias tolerogénicas implican la inhibición de la co-estimulación, la inducción de quimerismo mixto o la infusión de células supresoras:

(a) La inhibición de la co-estimulación de los linfocitos T busca imitar mecanismos de la tolerancia periférica de forma que los aloantígenos presentados por células presentadoras de antígeno (APC, *Antigen-presenting cells*) en ausencia de co-estimulación generen tolerancia donante-específica. Se han evaluado múltiples dianas terapéuticas, con especial interés en los ejes CD28-B7, CD40-CD154 y OX40 y su ligando OX40L. Aunque se ha observado que el bloqueo combinado de estos ejes prolonga la supervivencia del injerto en ratones o primates no humanos³⁸⁻⁴², muchos fármacos no han superado los ensayos clínicos. En la práctica clínica, el único agente aprobado hasta la fecha es Belatacept – proteína de fusión CTLA-4 con inmunoglobulina G1 (IgG1) que se une a CD80/CD86 –, aunque su uso está limitado al trasplante renal^{43,44}.

(b) El quimerismo mixto consiste en establecer una coexistencia estable de células hematopoyéticas del donante y del receptor mediante el trasplante combinado de progenitores hematopoyéticos y el órgano sólido, junto con un acondicionamiento no mieloablativo. Esta situación favorece la delección clonal y la anergia de linfocitos T alorreactivos, permitiendo la aceptación del injerto sin inmunosupresión crónica. Hasta el momento, ha sido posible establecer tolerancia a injertos renales trasplantados en trasplantes HLA incompatibles con protocolos basados en el quimerismo en un número muy reducido de pacientes⁴⁵⁻⁴⁹. Aunque prometedor, su aplicación clínica enfrenta desafíos como la optimización del acondicionamiento y la prevención de complicaciones hematológicas⁵⁰.

(c) La infusión de poblaciones celulares inmunorreguladoras también se ha postulado como estrategia para inducir tolerancia. Estudios preclínicos en modelos animales con infusión de linfocitos Treg⁵¹, DC tolerogénicas derivadas de monocitos del donante^{52,53} o células mieloides

supresoras⁵⁴ han demostrado que la transferencia de estas células prolonga la supervivencia del injerto significativamente incluso en presencia de dosis reducidas o ausencia de inmunosupresión. Sin embargo, esta estrategia es difícil de llevar a la práctica clínica al no tratarse de un producto ya preparado para infundir. A pesar de esto, estudios con linfocitos Treg en trasplante cardíaco pediátrico⁵⁵, trasplante hepático⁵⁶ o renal⁵⁷, o DC tolerogénicas y células mesenquimales en trasplante hepático⁵⁸ han resultado ser seguros y han reportado supervivencia del injerto a corto plazo.

A pesar de los avances en inmunoterapia y trasplante, persisten desafíos clave en la comprensión y manipulación de la tolerancia inmunológica. En cáncer, es crucial definir con mayor precisión los mecanismos de evasión inmune y desarrollar estrategias más efectivas para bloquearlos. En trasplante, el reto continúa siendo inducir una tolerancia específica y duradera que permita la aceptación del injerto sin necesidad de inmunosupresión crónica. En este escenario, las células supresoras mieloides surgen como un elemento común, con un papel favorecedor en la evasión inmune de los tumores, y por su potencial inducción de la tolerancia al injerto. Es imprescindible comprender mejor estas células, mediante investigación básica y clínica, para postular nuevos tratamientos anti-oncológicos y de tolerancia de los trasplantes.

2. MDSC

2.1. Definición y Clasificación

En la década de 1960 se encontraron células mieloides en ratones portadores de tumores que inducían una reacción leucemoide e infiltraban el tumor, asociándose a mayor tamaño tumoral⁵⁹. Posteriormente se identificaron células mieloides anormales con capacidad de inhibir la producción de anticuerpos, así como la proliferación y citotoxicidad de linfocitos T. Estas células se definieron como células supresoras naturales, células veto – células inmunitarias con propiedades inmunomoduladoras – o células nulas, según el estudio, ya que no presentaban marcadores fenotípicos de linfocitos T, B, células NK o macrófagos^{60,61}. A finales de los 90, se identificaron por primera vez marcadores de superficie que, aunque no exclusivos de estas células, permitieron la caracterización inicial de poblaciones mieloides con actividad inmunosupresora: CD34 y CD14 en humanos^{62,63}, y Gr-1 junto con CD11b en ratón⁶⁴. Como resultado de diversos estudios que demostraron la presencia de células mieloides con fenotipos atípicos y capacidad supresora en la circulación de pacientes oncológicos, en el año 2000 estas

células pasaron a denominarse células mieloides inmaduras o células mieloides supresoras⁶⁵. En 2007, un grupo de expertos, encabezado por Dmitry Gabrilovich propuso el término “*Myeloid-derived Suppressor Cells*” (MDSC), haciendo referencia tanto al origen y estado inmaduro de las células como a su función inmunosupresora⁶⁶. Desde entonces, este término ha sido el aceptado por la comunidad científica para referirse a esta población mioide.

Las MDSC se definen como una población heterogénea de células mieloides inmaduras con capacidad inmunosupresora, principalmente frente a los linfocitos T, que se acumulan en condiciones de inflamación crónica no resuelta. Aunque presentes en diferentes patologías, el conocimiento de las MDSC proviene principalmente del estudio de su papel en cáncer.

Debido a la heterogeneidad dentro de la población de MDSC y su similitud con otras poblaciones mieloides como monocitos, macrófagos y neutrófilos, V. Bronte *et al.* propusieron una estandarización para la identificación y clasificación de las MDSC⁶⁷. Fenotípicamente las MDSC se identifican como células mieloides CD33⁺ CD11b⁺ con baja o nula expresión de HLA de clase II (HLA-DR), en humanos, y como Gr-1⁺ CD11b⁺, en ratón. Se dividen en tres subpoblaciones: monocíticas (M-MDSC), polimorfonucleares (PMN-MDSC) y una tercera subpoblación más inmadura definida como “*early-stage*” MDSC (eMDSC) (**Tabla 1**). A pesar de las diferencias, las tres poblaciones de MDSC se han asociado a progresión tumoral, metástasis y resistencia a tratamiento⁶⁸⁻⁷⁰, si bien en función de la enfermedad y tipo de tumor se observa predominio de una u otra subpoblación de MDSC.

Tabla 1. Identificación fenotípica de las subpoblaciones de MDSC en humano y ratón de acuerdo con V. Bronte *et al.*⁶⁷

Subpoblación	Fenotipo en humano	Fenotipo en ratón
MDSC totales	CD33 ⁺ CD11b ⁺ HLA-DR ^{-/low}	Gr-1 ⁺ CD11b ⁺
M-MDSC	CD14 ⁺ CD15 ⁻ HLA-DR ^{-/low}	CD11b ⁺ Ly6C ^{hi} Ly6G ⁻
PMN-MDSC	CD14 ⁻ CD15 ⁺ /CD66b ⁺	CD11b ⁺ Ly6C ^{lo} Ly6G ⁺
eMDSC	Lin ⁻ (CD3/14/15/19/56) CD33 ⁺ HLA-DR ^{-/low}	No definido

Las M-MDSC, fenotípicamente similares a los monocitos, se identifican como CD14⁺, en humanos, y Ly6C^{hi}, en ratón (**Tabla 1**). Su baja o nula expresión de HLA-DR las diferencia de monocitos, macrófagos y DC.

Las PMN-MDSC, parecidas a los neutrófilos, se identifican como CD15⁺ o CD66b⁺, en humanos, y Ly6G⁺, en ratón (**Tabla 1**). Aunque los neutrófilos y las PMN-MDSC comparten marcadores, pueden distinguirse por su morfología de forma que las PMN-MDSC, que son menos complejas, pueden aislarse en gradiente de baja densidad (1,077 g/mL) mientras que la

purificación de neutrófilos requiere gradiente de mayor densidad (1,2 g/mL). El receptor de la lipoproteína de baja densidad oxidado tipo lectina 1 (LOX1, *lectin-type oxidized LDL receptor 1*) se ha definido como un marcador específico de PMN-MDSC circulantes e infiltrantes de tumor⁷¹⁻⁷³.

Las eMDSC carecen de marcadores monocíticos o granulocíticos al ser células en un estadio más indiferenciado que las otras subpoblaciones. En ratón la población equivalente no ha sido establecida por el momento, aunque W. Zhang *et al.* identificaron la subpoblación de CD11b⁺ Gr-1⁻ F4/80⁻ MHCII⁻ como la población precursora de Gr-1⁺ CD11b⁺ en un modelo de cáncer de mama⁷⁴. Se trata de una población poco abundante en sangre periférica y muy poco estudiada hasta el momento por lo que la información disponible es a veces contradictoria.

Según las recomendaciones de V. Bronte *et al.*, la correcta identificación de las MDSC requiere la validación funcional de su capacidad inmunosupresora. Aunque estas células pueden suprimir diversas poblaciones inmunitarias, el criterio más empleado es su capacidad para inhibir linfocitos T en ensayos *in vitro*. Esta función puede evaluarse cuantificando la inhibición de la proliferación o la reducción en la producción de interferón gamma (IFN- γ) de linfocitos T estimulados con estímulos policlonales, como anti-CD3/anti-CD28, fitohemaglutinina (PHA) o concanavalina A (ConA)⁶⁷.

A pesar de la relativa similitud fenotípica, se ha comprobado que M-MDSC y PMN-MDSC aisladas de bazo y tumores de un modelo de ratón de cáncer de mama tienen una firma génica que las distingue de monocitos y neutrófilos⁷⁵. La búsqueda de nuevos marcadores continúa y recientemente se ha identificado que CD84 o la molécula de adhesión de unión *like* (JAML, *junction adhesion molecule like*) podrían ser buenos candidatos para la identificación tanto de M-MDSC como PMN-MDSC⁷⁵⁻⁷⁷.

2.2. Desarrollo de las MDSC

La inflamación aguda conlleva la movilización rápida de monocitos y neutrófilos provenientes de la médula ósea. Las células mieloides se activan en respuesta a patrones moleculares asociados a daño o lesión (DAMP, *damage-associated molecular patterns*) y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) reconocidos por receptores de tipo toll (TLR, *toll-like receptors*). Con la activación, se aumenta la capacidad fagocítica, el estallido respiratorio, la producción de citoquinas proinflamatorias, la

formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET, *Neutrophil extracellular traps*) y la expresión de HLA de clase II y de moléculas co-estimuladoras. Se trata de una activación corta que termina al eliminar la amenaza^{78,79}.

Sin embargo, en condiciones de inflamación crónica, debido a procesos tumorales, enfermedades autoinmunes, daño tisular o infecciones crónicas, hay una estimulación persistente del compartimento mieloide debido a la presencia continuada de factores inflamatorios. Aunque las señales inflamatorias varían con la patología subyacente, en general, se trata de señales débiles pero mantenidas en forma de factores de crecimiento – factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*) y M-CSF – u otros mediadores inflamatorios⁷⁰.

El desarrollo de las MDSC se ha definido como un proceso con dos fases, una primera fase donde tiene lugar la expansión de células mieloides inmaduras (IMC, *immature myeloid cells*) seguida de una fase de activación patológica:

(a) En la primera fase, factores provenientes del tumor o del estroma de la medula ósea – incluyendo GM-CSF, G-CSF, M-CSF, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) y ácidos grasos poliinsaturados^{80,81} – median la expansión de las IMC vía el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3, *signal transducer and activator of transcription*), la proteína potenciadora de unión a CCAAT α (C/EBP α , *CCAAT/enhancer-binding protein α*) y el factor regulador de interferón 8 (IRF8, *Interferon regulatory factor 8*)⁸² (**Figura 1**).

(b) La fase de activación de las IMC para dar lugar a las MDSC está promovida por citoquinas inflamatorias – IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13 y factor de necrosis tumoral α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*) – así como la prostaglandina E2 (PGE2) y las proteínas de enlace a calcio S100A8 y S100A9. Estos factores señalizan a través de STAT1, STAT6 y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B, *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)⁸² (**Figura 1**).

Más recientemente, incorporando información sobre el patrón migratorio de las MDSC, N. Karin propuso un modelo dividido en cuatro etapas en el que a las dos primeras ya descritas se unirían una fase III de reclutamiento de las MDSC al tumor y una fase IV de retención de las MDSC en el tumor⁸³. Estas dos fases estarían mediadas fundamentalmente por quimioquinas y

explicarían por qué el perfil de MDSC difiere entre tumores ya que las M-MDSC son reclutadas vía el ligando 1 de la quimioquina (motivo C-X3-C) (CX3CL1, *chemokine (C-X3-C motif) ligand 1*) y CCL26⁸⁴ mientras que las PMN-MDSC se reclutan por los receptores de quimioquinas CXC tipo 1 y 2 (CXCR1/2, CXC chemokine receptor type 1/2)⁸⁵ (**Figura 1**).

Este proceso da lugar a células mieloides morfológicamente inmaduras con baja capacidad fagocítica, mayor capacidad de producción de óxido nítrico (NO) y radicales libres, alta expresión de arginasa-1 (Arg-1) y citoquinas con perfil anti-inflamatorio.

Por último, además de la generación de MDSC por la mielopoyesis de emergencia, se ha postulado una generación de MDSC en tejidos periféricos, como el bazo, a la que han denominado mielopoyesis extramedular⁸⁶. Asimismo, se ha observado que las eMDSC son precursoras de las M-MDSC⁸⁷, que los monocitos pueden reprogramarse a M-MDSC vía STAT3⁸⁸ y que las M-MDSC pueden diferenciarse a PMN-MDSC mediante el silenciamiento del gen del retinoblastoma (RB1). La diferenciación de las MDSC a otros tipos celulares tiene lugar en tejidos periféricos o en el tumor y sería muy dependiente del TME. Las M-MDSC pueden diferenciarse a macrófagos asociados a tumor (TAM, *tumor-associated macrophages*) en condiciones de hipoxia⁸⁹, y las PMN-MDSC reclutadas en el tumor podrían diferenciarse a neutrófilos asociados a tumores inmunosupresores (TAN, *tumor-associated neutrophils*)⁹⁰.

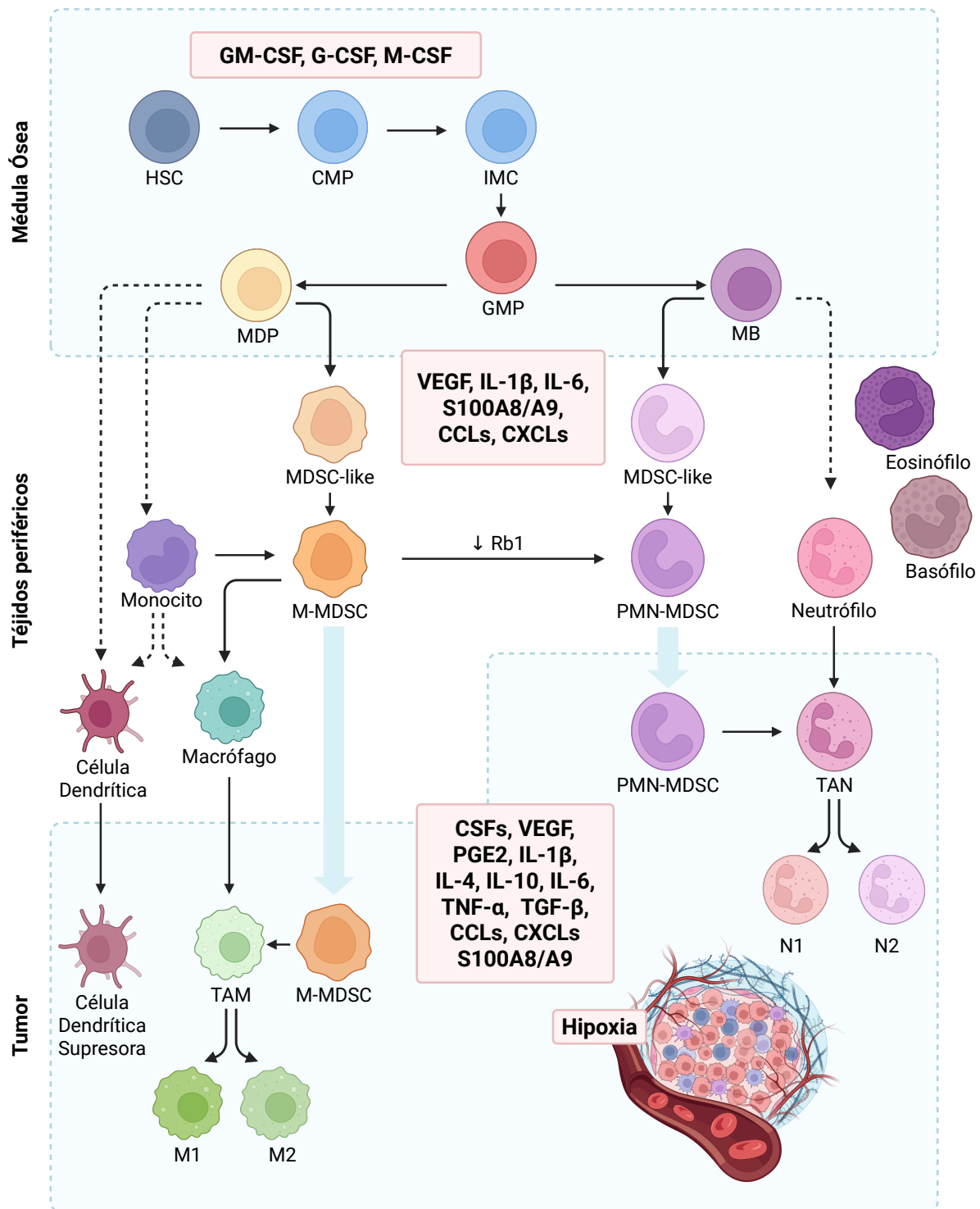


Figura 1. Esquema del desarrollo, reclutamiento y diferenciación de las MDSC. En la médula ósea, los progenitores mieloides comunes (CMP, *common myeloid progenitors*) derivados de las células madre hematopoyéticas (HSC, *hematopoietic stem cells*) dan lugar a la expansión de los progenitores de granulocitos-macrófagos (GMP, *granulocyte-macrophage progenitors*). Los GMP se diferencian posteriormente en progenitores de macrófagos/células dendríticas (MDP, *macrophage/dendritic cell progenitors*) y mieloblastos (MB). Este proceso de mielopoyesis está regulado por factores de crecimiento como GM-CSF, G-CSF, M-CSF, entre otros. En condiciones fisiológicas normales (indicado con línea punteada), los MDP proliferan y se diferencian a monocitos, macrófagos y DC. Por su parte, los MB se

diferencian a granulocitos, incluyendo basófilos, eosinófilos y neutrófilos. En condiciones de inflamación crónica (indicado con línea continua), la población de IMC se activa de forma patológica y se expande. Posteriormente, se diferencia en M-MDSC y PMN-MDSC en presencia de factores derivados del tumor como VEGF, IL-6 e IL-1 β , entre otros. En etapas tempranas del tumor, las células con características bioquímicas similares a las MDSC no presentan actividad supresora y se denominan células tipo MDSC (*MDSC-like cells*). Las MDSC también pueden originarse parcialmente por reprogramación de monocitos y células polimorfonucleares ya diferenciadas. Las M-MDSC pueden diferenciarse en PMN-MDSC mediante el silenciamiento transcripcional del gen *RBI*. Las MDSC son reclutadas a tejidos periféricos y el TME bajo la quimiotaxis de diversos factores como CCL2, CXCL y S100A8/A9, entre otros. En el TME, las M-MDSC pueden diferenciarse a TAM, los cuales pueden adquirir fenotipos M1 o M2. Los TAN se clasifican en subtipos inhibidores del tumor N1 y promotores del tumor N2. Creada en Biorender.com y adaptada de K.Li *et al.*⁶⁹.

2.3. Mecanismos pro-tumorales de las MDSC

Son múltiples los mecanismos – inmunológicos y no inmunológicos – que las MDSC emplean para inhibir el sistema inmunitario y favorecer la progresión tumoral. De nuevo, cabe destacar que el conocimiento de las MDSC proviene del campo del cáncer por lo que los mecanismos se han estudiado mayoritariamente en relación con la inmunidad anti-tumoral y la metástasis.

2.3.1. Mecanismos inmunológicos

Las MDSC juegan un papel en la evasión tumoral del sistema inmunitario impidiendo, sobre todo, la función efectora de los linfocitos T. Para ello, uno de los mecanismos principales es la expresión de *checkpoint* inhibidores. Así, las MDSC expresan PD-L1, cuya interacción con PD-1 en linfocitos T induce un estado de anergia. Además, se ha reportado la expresión de CTLA-4, cuyo bloqueo, en estudios de pacientes con melanoma metastático, se ha relacionado con disminución de la actividad de la molécula inmunosupresora Arg-1⁹¹. Las MDSC también expresan PD-L3, el Supresor de Inmunoglobulina de dominio V de la Activación de célula T (VISTA, *V-domain Ig-containing suppressor of T-cell activation*), galectina-9 (Gal-9) y CD155. La expresión de VISTA en pacientes con leucemia mieloide aguda se ha asociado a expresión de PD-1 en linfocitos T⁹². La unión de Gal-9 a la Inmunoglobulina de linfocitos T que contiene dominio de mucina-3 (TIM-3, *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) induce la expansión de MDSC y supresión de linfocitos T⁹³. La interacción entre CD155, reconocido por la Inmunoglobulina de células T y dominio ITIM (TIGIT, *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*), también está implicada en el agotamiento de los TIL⁹⁴. El bloqueo de estos

checkpoint inhibidores en modelos animales se asocia a disminución de la capacidad inmunosupresora de las MDSC^{95,96} (**Figura 2**).

Las MDSC deplecionan aminoácidos esenciales – arginina, cisteína y triptófano – para el metabolismo de los linfocitos T. Múltiples factores del TME – el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1, *Hypoxia-inducible factor 1*), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , *transforming growth factor beta*), IL-4, IL-10 e IFN- γ –inducen la expresión del transportador de aminoácidos catiónicos 2B (CAT-2B) y Arg-1. La L-arginina extracelular es importada por CAT-2B y degradada por Arg-1^{97,98}. La deficiencia de L-arginina provoca pérdida de la cadena CD3 ζ e inhibición de la proliferación de los linfocitos T⁹⁹. Además, Arg-1 puede liberarse al medio extracelular contribuyendo al consumo de L-arginina¹⁰⁰. Las MDSC también toman cistina del medio extracelular, metabolizándola a cisteína, que no puede ser transportada al exterior, privando de este aminoácido a los linfocitos T¹⁰¹. La eliminación del triptófano, degradado por la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), provoca autofagia, parada del ciclo celular y muerte de los linfocitos T¹⁰² (**Figura 2**).

Sumado a esto, las MDSC secretan especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y de nitrógeno (RNS, *reactive nitrogen species*). La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*) cataliza la conversión de L-arginina en L-citrulina y NO, que interfiere en la señalización del IL-2R y provoca la nitración del TCR^{103,104}. La isoforma 2 de la NADPH oxidasa (NOX-2, *NADPH oxidase isoform 2*) es la enzima responsable de la producción de ROS, anión superóxido (O₂⁻), hidroxilo (OH⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en MDSC. La producción de ROS contribuye al estrés oxidativo y cataliza la nitración de moléculas TCR/CD8 impidiendo la interacción con moléculas de MHC¹⁰⁵. Además, O₂⁻ se combina con NO para producir RNS, como el peroxinitrito (ONOO⁻), responsable de la nitración y nitrosilación de las moléculas TCR/CD8^{106,107} y de la modificación post-traducciona de CCL2, reduciendo la afinidad por CCR2 de forma que se compromete el reclutamiento de los TIL¹⁰⁸ (**Figura 2**).

Los altos niveles de Adenosín Trifosfato (ATP) generados a consecuencia de la hipoxia en el TME son degradados gracias a CD39, que cataliza la conversión de ATP a Adenosín Difosfato (ADP) y/o Adenosín Monofosfato (AMP), y CD73, que convierte AMP en adenosina. Las moléculas de adenosina son reconocidas por receptores de adenosina – A2AR, A2BR, A1R, A3R – mediando la inmunosupresión de linfocitos T, células NK y DC. Estos receptores no solo están presentes en MDSC sino en células tumorales y linfocitos Treg creándose una retroalimentación

positiva que aumenta la capacidad inmunosupresora de las MDSC a la vez que impide la función de células anti-tumorales¹⁰⁹⁻¹¹² (**Figura 2**).

Las MDSC impiden el reclutamiento de linfocitos T mediante la expresión del dominio desintegrasa y metaloproteinasa 17 (ADAM17, *disintegrin and metalloproteinase domain 17*) que escinde el ectodominio de la L-selectina (CD62L) en los linfocitos T *naïve* inhibiendo su migración a ganglios linfáticos regionales o al tumor¹¹³. El NO producido por las MDSC también disminuye la expresión de CD44 y CD162 en linfocitos T, dificultando su extravasación¹¹⁴, y de E-selectina en los vasos sanguíneos tumorales, impidiendo el tráfico de linfocitos T al tumor¹¹⁵ (**Figura 2**).

Las MDSC también suprimen mediante producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β . Las MDSC son una de las principales fuentes de IL-10 en el tumor y su bloqueo se ha asociado a mayor actividad de los linfocitos T, menor progresión tumoral y mayor eficacia terapéutica^{116,117}. Este mecanismo también se ha documentado en el contexto de infección¹¹⁸⁻¹²¹ (**Figura 2**).

Aunque menos estudiado, las MDSC inhiben a las células NK vía TGF- β 1, NO o interacción con el receptor NKp30¹²²⁻¹²⁴. En relación con las DC, las PMN-MDSC son capaces de bloquear la presentación cruzada¹²⁵ y las M-MDSC inhiben su maduración en pacientes con melanoma¹²⁶. Las MDSC impiden tanto la diferenciación como la función de los linfocitos B mediante modulación de la señalización de STAT5¹²⁷. En un modelo de ratón de cáncer de mama, las MDSC aumentaban la expresión de PD-L1 y favorecían la diferenciación a linfocitos B reguladores (Breg), que a su vez contribuyen a la inmunosupresión de los linfocitos T¹²⁸ (**Figura 2**).

Por otro lado, las MDSC también favorecer otras células supresoras. Las MDSC atraen – mediante expresión de ligandos de CCR5¹³⁰ – e inducen la proliferación y diferenciación de linfocitos Treg gracias a la interacción célula-célula así como por múltiples factores como IL-10, TGF- β , Arg-1 e IDO^{131,132}. Las interacciones entre macrófagos y MDSC generan una respuesta pro-tumoral, mediada por el aumento de la producción de IL-10 por parte de las MDSC y disminución de IL-12 en los macrófagos¹³³. Los mediadores S100A8/A9, secretados tanto por las células tumorales como por las MDSC, median la acumulación de MDSC en el TME y la polarización a macrófagos pro-tumorales M2¹³⁴ (**Figura 2**).

2.3.2. Mecanismos no inmunológicos

Además de la modulación de la respuesta inmunitaria anti-tumoral, las MDSC también contribuyen a la formación del nicho pre-metastásico. Inducen la angiogénesis, así como la invasión tumoral secretando directamente VEGF y la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) al TME¹³⁴. En un modelo de ratón de cáncer colorrectal se observaron altos niveles del ligando de quimioquinas CXC tipo 1 (CXCL1, *CXC chemokine ligand 1*) en el hígado pre-metastásico, favoreciendo el reclutamiento de MDSC CXCR2⁺ para formar el nicho pre-metastásico y a su vez promover metástasis hepática. El TGF- β es otro factor importante en la generación de metástasis, promoviendo fibrosis vía el inhibidor de metalopeptidasas 1 (TIMP1, *metallopeptidase inhibitor 1*)¹³⁵. Los mediadores S100A8/A9, secretados primero por las células tumorales y luego por las MDSC, reclutan MDSC al nicho pre-metastásico y órganos linfoides secundarios. Adicionalmente, se ha observado que las MDSC favorecen el mantenimiento de la potencialidad de las células madre tumorales en pacientes con carcinoma ovárico al reprimir el gen *CTBP2* en las células tumorales¹³⁶. Además, en especímenes de cáncer de mama las MDSC correlacionaron con la presencia de células madre tumorales¹³⁷ (**Figura 2**).

M-MDSC y PMN-MDSC, aunque solapantes en muchos casos, presentan particularidades. En general, se considera que las M-MDSC tienen mayor capacidad supresora, mediada por Arg-1, NO, IL-10 y TGF- β , inhibiendo tanto respuestas antígeno-específicas como no específicas. Las PMN-MDSC median la inmunosupresión gracias a altos niveles de ROS y RNS requiriendo proximidad a la célula diana^{81,138,139}. En relación con las eMDSC, algunos estudios indican que al ser una fracción más inmadura tienen mayor capacidad inhibitoria^{74,102}, sin embargo, otros reportan que su capacidad inmunosupresora es inferior o inexistente¹⁴⁰. Estas eMDSC, en glioblastoma, aumentaban su metabolismo adaptándose al ambiente hipóxico del TME permitiendo su función y proliferación. Asimismo, las eMDSC parecen crear una simbiosis con las células tumorales de glioblastoma en la que estas favorecen la acumulación y proliferación de las eMDSC y las eMDSC a su vez mantienen el crecimiento y potencialidad de las células madre tumorales⁸⁷.

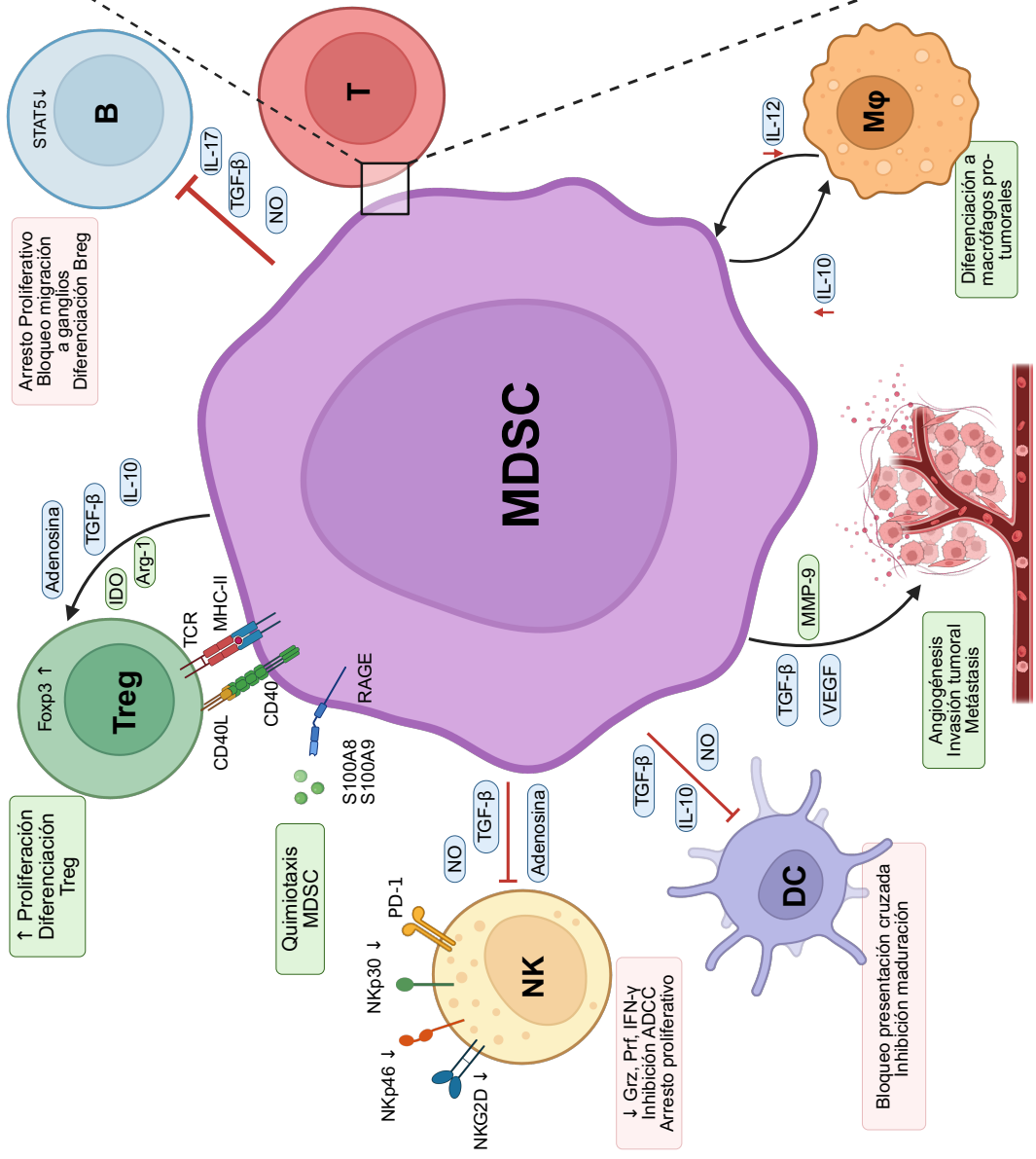
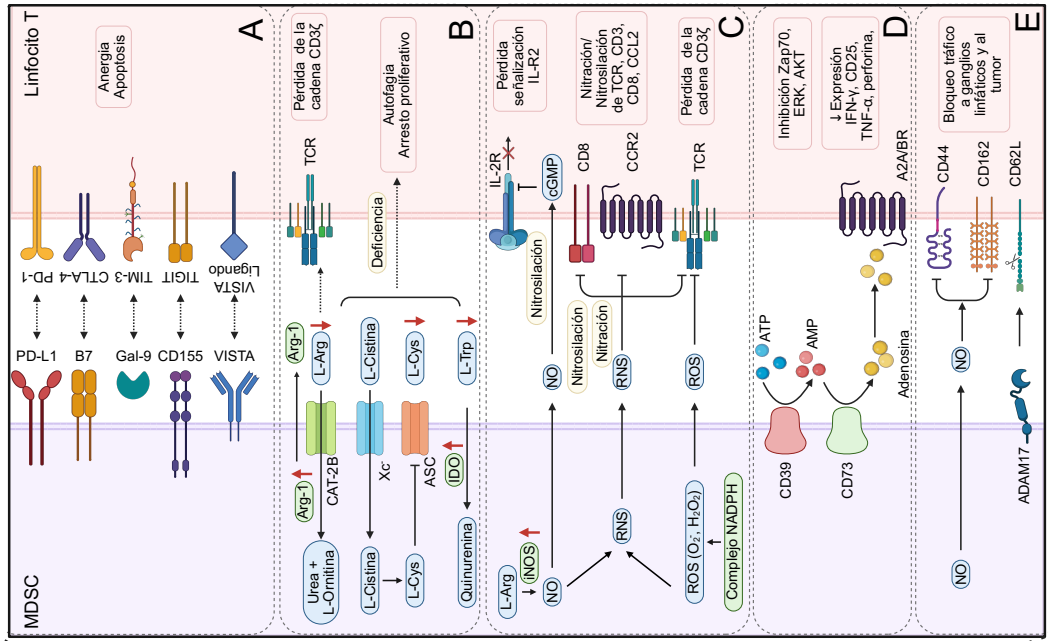


Figura 2. Mecanismos inmunosupresores y pro-tumorales de las MDSC. Las MDSC suprimen la actividad de los linfocitos T a través de diferentes mecanismos: expresión de moléculas co-inhibidoras, depleción de aminoácidos esenciales para la biología de los linfocitos T, producción de NO, ROS y RNS, generación de adenosina y bloqueo del tráfico de los linfocitos a ganglios y al tumor por modificación de receptores. Las MDSC inducen la diferenciación y expansión de los linfocitos Treg mediante la producción de IDO, Arg-1, adenosina y citoquinas como TGF- β e IL-10. Las moléculas S100A8 y S100A9 median la quimiotaxis de MDSC y otras células mieloides. Este efecto está mediado en parte por la activación de RAGE. Las MDSC inhiben la función de las células NK, las DC y los linfocitos B mediante adenosina, NO, TGF- β , IL-10 e IL-17. Las MDSC inducen macrófagos (M ϕ) en el TME mediante aumento de IL-10. Las MDSC participan en la angiogénesis, invasión tumoral y metástasis vía MMP-9, VEGF y TGF- β . Akt, Proteína quinasa B, *Protein kinase B*; ASC, Transportador de aminoácidos de tipo asc, *asc type amino acid transporter*; ERK, Quinasa regulada por señales extracelulares, *extracellular-signal-regulated kinase*; RAGE, Receptor para Productos Finales de Glicación Avanzada, *receptor for advanced glycation end-products*; Xc⁻, Transportador cisteína-glutamato, *cystine-glutamate transporter*; Zap70, Proteína asociada a zeta de 70 kDa, *zeta-associated protein 70*. Creada en Biorender.com y adaptada de K. Li *et al.* y D. Gabrilovich *et al.*^{69,129}.

2.4. Papel de las MDSC en la progresión tumoral

Son múltiples los estudios que han reportado la asociación inversa entre la cantidad de MDSC circulantes y la supervivencia de los pacientes, en cáncer pancreático¹⁴¹, carcinoma de células escamosas de esófago¹⁴¹, hepatocarcinoma¹⁴²⁻¹⁴⁴, cáncer gástrico¹⁴¹, cáncer colorrectal¹⁴⁵, cáncer de mama¹⁴⁵, melanoma¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, cáncer de vejiga¹⁴⁹, cáncer de próstata¹⁵⁰ y carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC, *Non Small-Cell Lung Cancer*)^{151,152}. No obstante, persiste la controversia respecto a qué subpoblación de MDSC, M-MDSC o PMN-MDSC, tiene mayor relevancia clínica. Algunos estudios observan que mayores niveles circulantes de M-MDSC se asocian a peor pronóstico^{146-148,150,153-156} mientras que otros encuentran la misma asociación para la población de PMN-MDSC^{150,157,158}. Las eMDSC, mucho menos estudiadas, se han asociado a peor pronóstico y menor supervivencia global en cáncer de mama^{159,160}, linfoma no Hodgkin¹⁶¹ y glioblastoma⁸⁷. En pacientes con carcinoma renal de células claras, el tratamiento con sunitinib y temsirolimus redujo los niveles de eMDSC¹⁶². Estas diferencias podrían deberse a una polarización hacia una población concreta de MDSC en función del contexto tumoral. Todos los estudios coinciden en asociar altos niveles circulantes de MDSC con menor supervivencia. Sin embargo, hasta el momento, no se han establecido puntos de corte comunes y son necesarios estudios con mayor tamaño muestral.

Las MDSC se han propuesto como biomarcador de respuesta a inmunoterapia. Niveles elevados de M-MDSC se han asociado con menor supervivencia general y peor respuesta a ipilimumab

en pacientes con melanoma avanzado^{147,163} y en cáncer de próstata resistente a la castración¹⁵⁰. Igualmente, en pacientes con melanoma tratados con nivolumab o pembrolizumab, las M-MDSC correlacionaban inversamente con el beneficio clínico y los pacientes con peor supervivencia general presentaban mayores niveles de esta población^{164,165}. Estos resultados también se encontraron en NSCLC metastásico, donde altos niveles de M-MDSC afectaban negativamente a la eficacia de los anti-PD-1¹⁶⁶. Menores niveles de MDSC totales se asociaron con mejor pronóstico en pacientes con NSCLC y cáncer de próstata tratados con atezolizumab o durvalumab, ambos anti-PD-L1^{167,168}. Adicionalmente, en linfoma B refractario tratado con CAR-T, altos niveles de M-MDSC, IL-6 y ferritina se asociaron a ausencia de respuesta¹⁶⁹ y el aumento de PMN-MDSC se asoció a recaídas y no respuesta en pacientes con neuroblastoma tratados con CAR-T¹⁷⁰. Hasta la fecha, no se han descrito asociaciones clínicas relevantes para la subpoblación de eMDSC.

Por sus múltiples mecanismos inmunosupresores, su participación en la angiogénesis, crecimiento tumoral y metástasis, así como su más que constatada relevancia clínica, se ha postulado que terapias dirigidas a la eliminación de las MDSC mejorarían la supervivencia de los pacientes. Actualmente se están evaluando clínicamente múltiples estrategias terapéuticas, con el objetivo de: i) inhibir la expansión y el reclutamiento con VEGF, S100A8, IL-1 β y el eje CCL2/CCR2 como dianas terapéuticas; ii) promover la diferenciación a células mieloides maduras mediante la inhibición de STAT3 o la estimulación de TLR7; iii) inhibir la función de las MDSC con inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (PDE5, *Phosphodiesterase 5*) que disminuyen Arg-1 e iNOS o el factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2, *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) que atenúa el estrés oxidativo; iv) inhibir el metabolismo de las MDSC; o v) deplecionar las MDSC con agonistas del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) o gemtuzumab, anticuerpo monoclonal anti-CD33^{69,171}. Estas estrategias buscan eliminar las MDSC en su totalidad, no centrándose en una subpoblación concreta. Esto es posible debido a las similitudes biológicas que comparten las tres subpoblaciones. Dado que las eMDSC representan la población más inmadura, y que una proporción considerable de las M-MDSC y PMN-MDSC podría derivar de ellas, es razonable pensar que su depleción podría traducirse en una reducción indirecta de las otras subpoblaciones. No obstante, debe considerarse que tanto las M-MDSC como las PMN-MDSC también pueden originarse a partir de monocitos o neutrófilos desdiferenciados.

3. Hepatocarcinoma

3.1. Epidemiología y etiopatogenia

El carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma (HCC) es el tumor maligno generado en los hepatocitos. Se trata de la causa más frecuente de cáncer hepático, con un 90 % de los casos, y la principal causa de muerte de las personas con cirrosis hepática¹⁷². A nivel mundial, es el sexto cáncer más común y la tercera causa de muerte por cáncer con más de 750.000 muertes al año¹⁷³.

La incidencia de HCC es muy variable dependiendo de la localización geográfica, por la diferente exposición a virus de la hepatitis, el sexo y la edad. Las regiones con mayor incidencia son el este de Asia y el Norte de África donde se reportan el 78 % de los casos¹⁷³. La incidencia de HCC aumenta con la edad, alcanzando el máximo en torno a 70 años, y es más frecuente en hombres¹⁷⁴. Esta incidencia está además en aumento en Europa, seguramente relacionado con el aumento de esperanza de vida en países desarrollados.

En España, de acuerdo con la Sociedad Española de Oncología Médica, en 2024 el HCC representó el 2 % de los casos de cáncer con una incidencia estimada de 6856 casos, 5334 en hombres y 1522 en mujeres, una supervivencia a cinco años del 17 % y una mortalidad estimada del 8,4 % suponiendo la quinta causa de muerte por cáncer en hombres¹⁷⁵.

Los factores de riesgo también dependen de la zona geográfica, aunque en general los principales son las infecciones crónicas por el virus de la hepatitis B (VHB) o C (VHC), la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) o esteatohepatitis no alcohólica (NASH, *non-alcoholic steatohepatitis*) y la hepatopatía alcohólica¹⁷⁶. Otros factores de riesgo menos prevalentes que provocan cirrosis son la colangitis biliar primaria, la hemocromatosis hereditaria o la deficiencia de α 1-antitripsina¹⁷⁶.

El VHB supone el 60 % de los casos de hepatocarcinoma en Asia y África, pero solo el 20 % en países occidentales. Se trata de un virus de DNA que puede integrarse en el genoma induciendo mutagénesis llevando a la activación de oncogenes¹⁷⁷. Además, la exposición a la aflatoxina B1, presente en África, puede aumentar el riesgo de HCC al actuar sinérgicamente con el VHB¹⁷⁸. La hepatitis C crónica es la principal causa en Norteamérica, Europa y Japón. El uso de antivirales para reducir la carga viral ha reducido el riesgo de HCC significativamente¹⁷⁹.

En los últimos años, han disminuido los HCC por hepatitis viral crónica y aumentado los relacionados con alcohol y enfermedades metabólicas¹⁸⁰. El alcohol se ha asociado a mecanismos pro-tumorigénicos y su consumo continuado puede aumentar el riesgo de aparición de HCC en relación con otras etiologías como la infección por VHB¹⁸¹. La NASH, estado anterior al HCC en pacientes con diabetes u obesidad, ha aumentado significativamente en los últimos años suponiendo hasta el 20 % de los casos de HCC en Occidente¹⁸² y con previsión de que continúe aumentando.

Aunque la patogenia del HCC varía en función de la etiología, en general, su iniciación se relaciona con lesiones hepáticas repetidas, debido a ciclos de necrosis y regeneración, provocando inflamación que da lugar a fibrosis, y después cirrosis hepática. En este contexto, los hepatocitos adquieren inestabilidad genómica, acumulando mutaciones somáticas y alteraciones epigenéticas que promueven su transformación maligna (**Figura 3**).

Entre las mutaciones más frecuentes en HCC destacan las del promotor de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), el gen supresor tumoral *TP53* y el gen *CTNNB1*, que codifica para β -catenina. La activación aberrante de TERT, presente en el 90 % de los casos, es crítica para la progresión tumoral contribuyendo a la evasión de la senescencia celular y la apoptosis¹⁸³. Las alteraciones en *TP53*, con frecuencia variable entre el 15 % y el 40 % según la etiología, se han asociado con exposición a aflatoxina B1¹⁸⁴ y hepatitis viral crónica¹⁸⁵. Las mutaciones de ganancia de función de *CTNNB1* y pérdida de función de *AXIN1* provocan una activación desregulada de la vía Wnt/ β -catenina, clave en proliferación y reparación celular, facilitando el crecimiento e invasión tumoral¹⁸⁶.

La desregulación epigenética, incluyendo cambios en metilación del DNA, modificaciones de histonas y alteraciones en RNA no codificantes, microRNA (miRNA) y RNA de cadena larga no codificantes (lncRNA, *long non-coding RNA*), desempeña un papel crucial en la carcinogénesis. Estos cambios afectan genes involucrados en el ciclo celular, proliferación, metástasis y rutas de señalización como Ras/Raf/ERK, Wnt/ β -catenina y fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT/mTOR¹⁸⁷⁻¹⁹⁰.

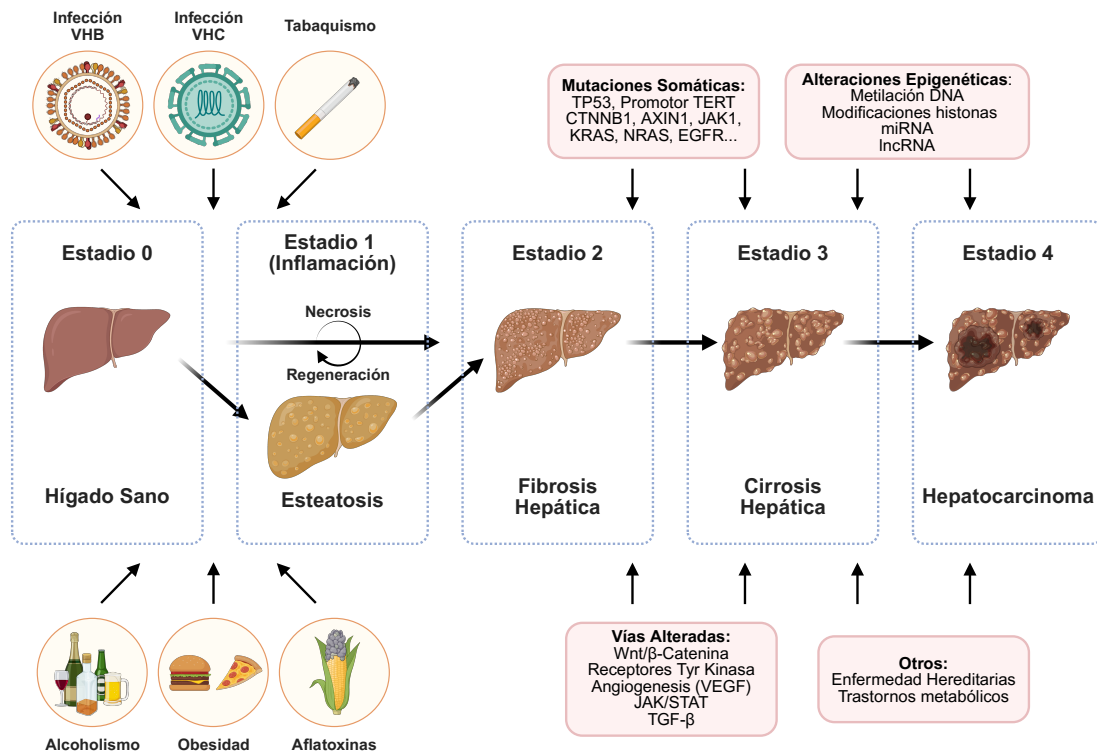


Figura 3. Etiopatogenia y factores de riesgo de la carcinogénesis en el hepatocarcinoma. La exposición crónica y continua a lesiones hepáticas provocadas por factores ambientales, como la hepatitis viral, el consumo excesivo de alcohol, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), y la exposición a toxinas, daña repetidamente a los hepatocitos e induce un estado inflamatorio persistente que, con el tiempo, puede desembocar en cirrosis hepática. En esta etapa, el hígado se vuelve más susceptible a inestabilidades genómicas. Por ello, es más probable que los hepatocitos acumulen mutaciones somáticas, alteraciones epigenéticas y reordenamientos génicos, lo cual puede desencadenar en cambios metabólicos y disfunciones en diversas vías moleculares. Estas alteraciones favorecen la progresión tumoral y la metástasis. EGFR, Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico; JAK, Quinasas Janus;. Creada en Biorender.com y adaptada de D. Tumen *et al.*¹⁹¹.

Todas estas modificaciones van a desregular múltiples vías de señalización, incluyendo principalmente: i) las rutas de señalización de factores de crecimiento como el factor de crecimiento insulínico (IGF, *insulin-like growth factor*), epidermoide (EGF, *epidermal growth factor*), de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*), derivado de plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factor*) o de hepatocitos (HGF, *hepatocyte growth factor*); ii) rutas de diferenciación celular como Wnt/ β -catenina; iii) angiogénesis, con VEGF o FGF implicados; iv) rutas de señalización a partir de receptores tirosina quinasas como Ras/Raf/ERK y P13K/AKT/mTOR; y v) rutas de inmunidad anti-tumoral.

3.2. Sistemas de estadificación y opciones terapéuticas

Son muchos los sistemas de clasificación propuestos para establecer la gravedad de la enfermedad, el pronóstico y el tratamiento, no obstante, ninguno de ellos ha sido adoptado universalmente. Aunque con diferencias entre ellos, la mayoría tienen en cuenta la extensión del tumor, la función hepática y el estado general.

La **Tabla 2** muestra el sistema Child-Pugh (CP), que se emplea para evaluar el pronóstico de la cirrosis y la necesidad de un trasplante hepático. Actualmente utiliza cinco criterios, cada uno de los cuáles se puntúa entre 1 y 3 para, con la suma, calcular las clases A (enfermedad bien compensada, 5 – 6 puntos), B (compromiso funcional significativo, 7 – 9 puntos); y C, (enfermedad descompensada, 10 – 15 puntos), con supervivencias al año de 100 %, 80 % y 45 %, respectivamente¹⁹². A pesar de ser el sistema más utilizado para clasificar la función hepática actualmente se prefieren otros, ya que Child-Pugh se basa en variables subjetivas o continuas que dan lugar a clasificaciones ambiguas¹⁹³.

Tabla 2. Sistema de Estadificación Child-Pugh

	1 punto	2 puntos	3 puntos
Bilirrubina total (µmol/L/mg/dL)	< 34 / <2	34 / 50 (2 – 3)	> 50 / > 3
Albúmina sérica (g/L)	> 35	28 – 35	< 28
INR	< 1,70	1,71 – 2,30	> 2,30
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada a Grave
Encefalopatía hepática	Ausente	Grado I-II (suprimida con medicación)	Grado III-IV (refractaria)

Las escalas MELD (*Model for End-stage Liver Disease*) y su variante MELD-Na, miden también la progresión de la enfermedad hepática crónica y se utilizan como sistema de priorización en lista de espera de trasplante hepático, teniendo en cuenta el Índice Internacional Normalizado (INR), la creatinina sérica, la bilirrubina total, la etiología de la cirrosis y los niveles séricos de sodio¹⁹⁴.

Desde el punto de vista oncológico, el sistema *Tumor/Node/Metastasis* (TNM) – elaborado por el AJCC, *American Joint Committee on Cancer*; y la UICC, *Union for International Cancer Control* – tiene en cuenta el número de tumores primarios (T), la afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis distante (M) (**Tabla 3**)¹⁹⁵. La combinación de T, N y

M dan el estadio de HCC (**Tabla 4**). La principal desventaja de esta clasificación es que solo tiene en cuenta características del tumor y no la función hepática ni la enfermedad de base.

Tabla 3. TNM para HCC según recomendación de AJCC y UICC. Adaptada de B. Mahul *et al.*¹⁹⁵

Tumor Primario (T)	
TX	El tumor primario no se puede evaluar
T0	No hay evidencia de tumor primario
T1a	Tumor solitario menor de 2 cm con o sin invasión vascular
T1b	Tumor solitario mayor de 2 cm sin invasión vascular
T2	Tumor solitario mayor de 2 cm con invasión vascular o múltiples tumores con uno mayor de 5 cm en su diámetro mayor
T3	Múltiples tumores con un nódulo mayor de 5 cm de diámetro mayor
T4	Tumor único o múltiples tumores de cualquier tamaño pero que comprometen una vena portal o hepática mayor o tumores con invasión directa en los órganos adyacentes, diferentes de la vesícula biliar o con perforación del peritoneo visceral
Ganglios Linfáticos Regionales (N)	
NX	No puede determinarse
N0	No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis a cualquier número de ganglios linfáticos regionales
Metástasis a distancia (M)	
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

Tabla 4. Estadificación según TNM. Adaptada de B. Mahul *et al.*¹⁹⁵

Estadio IA	T1a	N0	M0
Estadio IB	T1b	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio IIIA	T3	N0	M0
Estadio IIIB	T4	N0	M0
Estadio IVA	Cualquier T	N1	M0
Estadio IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1

El sistema BCLC (*Barcelona Clinic Liver Cancer*) agrupa tanto las características del tumor como la función hepática de forma que es considerado el sistema de elección por la AASLD, (*American Association of for the Study of Liver Disease*) y la EASL (*European Association for the Study of the Liver*)¹⁹⁶ (**Tabla 5**). Esta clasificación se utiliza también para tomar decisiones de tratamiento, ya que asocia cada uno de los cinco estadios a una opción terapéutica de primera línea. El sistema BCLC tiene en cuenta: i) el tamaño y localización del tumor primario; ii) la función hepática en función del sistema CP; y iii) el estado funcional del paciente de acuerdo con la escala ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) que clasifica a los pacientes en cinco niveles según su estado funcional determinando su calidad de vida y pronóstico¹⁹⁷.

Tabla 5. Sistema de estadificación BCLC. Adaptada de ¹⁹⁷.

	Carga Tumoral	Función hepática	ECOG
Estadio muy precoz (0)	Tumor solitario ≤ 2 cm	CP A	0
Estadio precoz (A)	Tumor solitario > 2 cm o tres lesiones < 3 cm	CP A	0
Estadio intermedio (B)	Tumor multinodular	CP A-B	0
Estadio avanzado (C)	Invasión portal o diseminación extrahepática	CP A-B	1-2
Estadio terminal (D)	Cualquier tumor	CP C	3-4

ECOG, *Eastern Cooperative Oncology Group*.

El tratamiento del hepatocarcinoma requiere de un abordaje multidisciplinar. La elección del tratamiento depende del estadio y de la enfermedad hepática, agrupándose en tres grupos: i) tratamientos con intención curativa; ii) tratamientos neoadyuvantes para controlar el crecimiento tumoral en un paciente en lista de espera de trasplante hepático o para reducir la masa tumoral antes de la cirugía; y iii) tratamientos paliativos.

Los tratamientos quirúrgicos, resección o trasplante hepáticos, son los principales tratamientos curativos en pacientes con HCC en estadio precoz. La resección quirúrgica es el tratamiento de elección para pacientes sin cirrosis hepática o pacientes con cirrosis que tras la cirugía pueden presentar remanente hepático adecuado y estadio A de BCLC¹⁹⁸. Esta selección de pacientes ha hecho que la supervivencia aumente significativamente con baja mortalidad perioperatoria¹⁹⁹, sin embargo, la recurrencia del HCC sigue siendo una complicación habitual con tasas del 70 % tras 5 años²⁰⁰. El trasplante hepático permite retirar también lesiones indetectables a la vez que ataja el problema de la función hepática. Se trata del tratamiento que mejor supervivencia, superior al 70 %, y menor recurrencia de HCC, entre el 10 % y el 15 %, proporciona. No obstante, es un tratamiento limitado debido a la disponibilidad de órganos¹⁷⁴. Con el objetivo de seleccionar los mejores candidatos para trasplante, se emplean los criterios de Milán²⁰¹ – tumor solitario ≤ 5 cm o hasta tres nódulos ≤ 3 cm en ausencia de invasión vascular o metástasis – y los criterios de San Francisco²⁰² – tumor solitario $\leq 6,5$ cm o tres o menos nódulos con la mayor lesión $\leq 4,5$ cm y un diámetro total ≤ 8 cm – que han permitido mejorar los resultados del trasplante¹⁷⁴.

La ablación – tratamiento mínimamente invasivo que destruye tejido tumoral selectivamente – se emplea en pacientes con HCC en estadios precoces, BCLC 0 y BCLC A, con tumores pequeños y localizados. La ablación induce necrosis tumoral como consecuencia de un cambio de temperatura – provocado por radiofrecuencia, microondas, laser o crioblación –, o la

inyección de etanol²⁰³. Aunque la ablación por radiofrecuencia es la modalidad más común, la ablación por microondas es ya la técnica estándar en algunos centros debido a su mejor control térmico y mejores resultados²⁰⁴. Al igual que la resección quirúrgica, presenta altas tasas de recurrencia, alcanzando el 80 % a los 5 años²⁰⁵.

Los tratamientos transarteriales se valen de la anatomía vascular del hígado, de forma que se dirigen a la arteria hepática, responsable de la irrigación del tumor pero no del tejido hepático sano irrigado a través de la vena porta. Esta intervención consiste en la cateterización selectiva de la arteria hepática para inyectar un agente terapéutico en función del cual se distinguen diferentes modalidades: i) embolización transarterial sin quimio o radioterapia; ii) quimioembolización transarterial (QETA) con la inyección de fármacos quimioterapéuticos; y iii) radioembolización transarterial (RETA) con administración de microesferas de Itrio-90. Este tratamiento se emplea en pacientes con estadio intermedio, BCLC B, o como tratamiento puente en pacientes en lista de espera, pero está contraindicado en pacientes con mala función hepática²⁰⁶.

En pacientes con estadios avanzados o no aptos para los tratamientos localizados la alternativa es el tratamiento sistémico. La primera línea de tratamiento es la combinación de los anticuerpos monoclonales atezolizumab (anti-PD-L1) y bevacizumab (anti-VEGF)²⁰⁷ o durvalumab (anti-PD-L1) combinado con tremelimumab (anti-CTLA4)²⁰⁸. Si el paciente no es apto, por función hepática comprometida, la alternativa son los inhibidores de tirosina quinasa (TKI), sorafenib y lenvatinib o inhibidores de los receptores de factores de crecimiento como VEGF y PDGF^{209,210}. En segunda línea de tratamiento se incluyen los TKI regorafenib y cabozantinib y el anticuerpo monoclonal anti-receptor 2 de VEGF ramucirumab²¹¹.

3.3. Sistema inmunitario en el HCC

3.3.1. Microambiente tumoral en el HCC

El microambiente tumoral es un ecosistema complejo y dinámico entorno al tumor compuesto de células tumorales junto con células inmunitarias, fibroblastos, células endoteliales y matriz extracelular, que juega un papel crítico en la aparición, progresión y respuesta al tratamiento del HCC. La composición del TME varía entre pacientes con HCC. Recientemente X. Gao *et al.* identificaron cuatro subclases de HCC basadas en la composición del TME: i) C1 o desierto inmunológico, con mejor pronóstico y sin infiltrado inmunitario; ii) C2 o inmunogénico, con

infiltrado de macrófagos, linfocitos T y B; iii) C3 o inmunidad innata, con predominio de macrófagos M2 y mal pronóstico clínico; y iv) C4 o mesenquimal, con fibroblastos asociándose a progresión tumoral²¹².

El componente celular no inmunitario incluye fibroblastos asociados a cáncer (CAF, *cancer-associated fibroblasts*), células estrelladas hepáticas (HSC, *hepatic stellate cells*) y células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC, *liver sinusoidal endothelial cells*). Los CAF secretan proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento como EGF y PDGF, y citoquinas inmunomoduladoras, promoviendo inflamación tumoral y angiogénesis. Además, a través de la sobreexpresión de IL-6 y HGF, mantienen la potencialidad de las células madre tumorales, facilitando su proliferación y metástasis^{213,214}. Las HSC contribuyen al depósito de colágeno y fibrosis hepática, creando un entorno propicio para la progresión tumoral²¹⁵⁻²¹⁸, mientras que las LSEC – que en condiciones fisiológicas actúan como barrera entre los hepatocitos y la circulación sistémica – sufren un proceso de capilarización que altera la comunicación con otras células hepáticas favoreciendo la progresión tumoral, la evasión inmune y la angiogénesis^{219,220} (**Figura 4**).

En cuanto al componente inmunitario, los TAM son una de las poblaciones más influyentes en este contexto. En HCC, los macrófagos M2, con función inmunosupresora, producen factores angiogénicos – VEGF, EGF y PDGF – así como MMP responsables de la remodelación de la matriz asociándose con peor pronóstico y progresión tumoral²²¹. Asimismo, vía producción de IL-10, TGF- β y CCL20, favorecen la infiltración de linfocitos Treg²²² y mediante la expresión de PD-L1 en las células de Kupffer (KC), macrófagos residentes de hígado, inhiben la función de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos²²³. Los TAM contribuyen a la resistencia a sorafenib, lo que sugiere que su eliminación podría potenciar la eficacia terapéutica de este fármaco^{224,225}. De igual forma, los neutrófilos polarizados hacia el fenotipo N2 y las DC infiltrantes favorecen la progresión mediante la producción de NET y la liberación de TGF- β , MMP-9 y catepsina G, por parte de los neutrófilos^{221,226}, y la inducción de tolerancia vía expresión de PD-L1 por parte de las DC²²⁷ (**Figura 4**).

En HCC, las células NK y los linfocitos T citotóxicos (CTL, *Cytolytic T Lymphocyte*) – responsables de la inmunovigilancia y la eliminación de células tumorales – están disminuidos numéricamente y funcionalmente con menor producción de perforina, granzima e IFN- γ así como agotamiento celular. Esta disminución se asocia al aumento de MDSC, TAM y linfocitos Treg que median la inmunosupresión^{122,228,229}. Este desequilibrio en las poblaciones linfocitarias

afecta a la progresión tumoral objetivándose que bajos niveles de linfocitos Treg y Th17 y la presencia de CTL se asocian a mejor supervivencia global y menor recurrencia en HCC^{230,231}. Son muchos los mecanismos inmunosupresores de los linfocitos Treg, capaces de suprimir la proliferación, activación y función de células NK, CTL, linfocitos T cooperadores de tipo 1 (Th1, *T helper cell 1*) y B, reclutar MDSC y TAM, así como activar CAF y HSC promoviendo el crecimiento y metástasis tumoral²³². En cuanto a los linfocitos B, mientras que algunos estudios asocian un aumento de linfocitos B CD19⁺ con un estadio tumoral avanzado y mayor evasión inmune, otros sugieren que la subpoblación CD20⁺ podría mejorar el pronóstico. Los linfocitos Breg contribuyen a la inmunosupresión de CTL y a la progresión promoviendo la angiogénesis y la polarización a macrófagos M2^{233,234} (Figura 4).

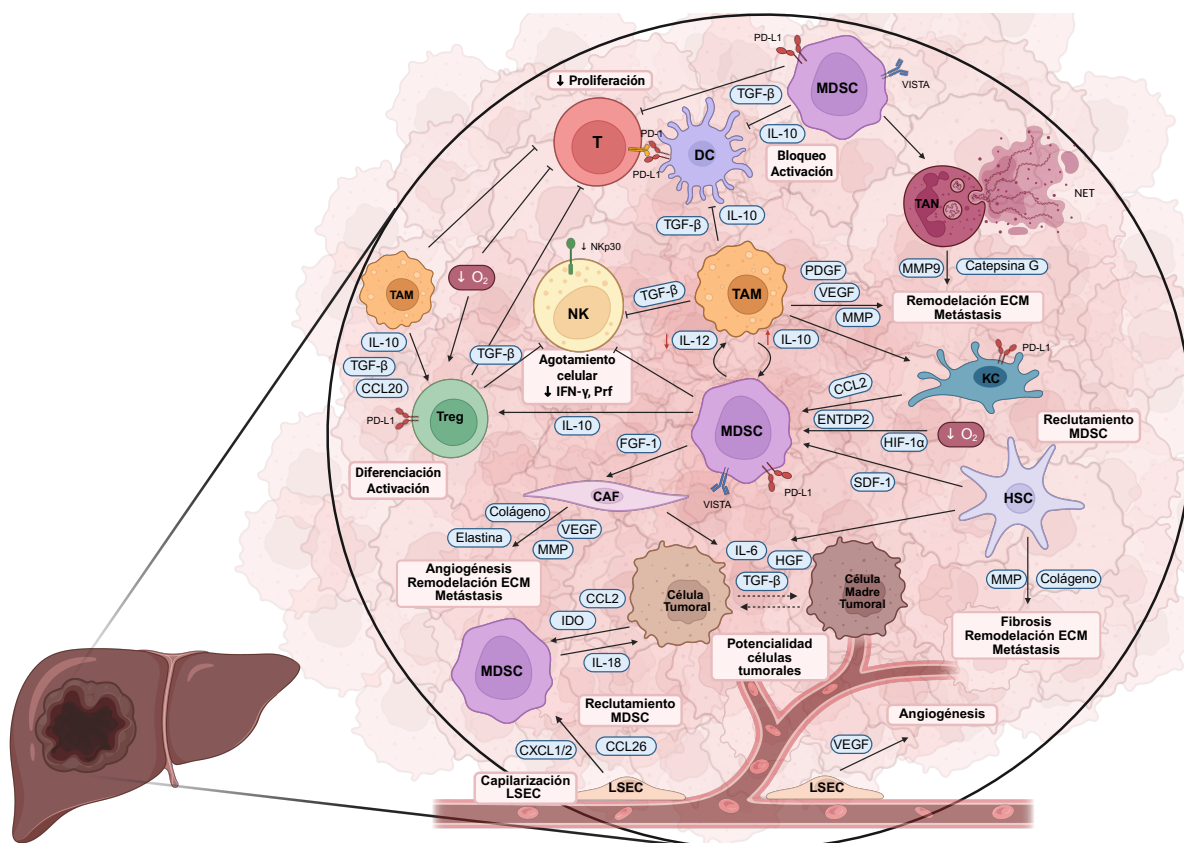


Figura 4. Microambiente tumoral en el hepatocarcinoma. Los CAF median procesos de angiogénesis, remodelación de la matriz extracelular (ECM), metástasis y potencialidad de las células madre tumorales. Las HSC contribuyen al depósito de colágeno y fibrosis y secretan factores que favorecen la potencialidad de las células madre tumorales. Las LSEC favorecen la progresión tumoral, la angiogénesis y el reclutamiento de MDSC. Los TAM producen factores angiogénicos y MMP responsables de la remodelación de la ECM, median la infiltración de linfocitos Treg, la expresión de PD-L1 en células de Kupffer (KC) y la inhibición de linfocitos T CD8⁺ y DC. Los TAN liberan NET, TGF-β, MMP-9 y cathepsina G. Las MDSC son reclutadas al TME vía eje CXCL1/CXCR2 y CCL26/CX3CR1, por HIF-1 α en zonas hipóxicas o SDF-1 producido por las HSC. Las MDSC median la inhibición de linfocitos T, DC y células NK a la vez que activan linfocitos Treg, TAM, TAN y CAF. Creada en Biorender.com.

3.3.2. MDSC en el HCC

Las MDSC son un componente importante en el microambiente del HCC. En modelos ortotópicos de HCC en ratón, se ha observado que los ejes CXCL1/CXCR2 y CCL26/CX3CR1 son las principales vías para su reclutamiento y retención^{235,236}. HIF-1 α facilita su acumulación en áreas hipóxicas del tumor a través de la sobreexpresión de la enzima ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 2 (ENTDP2, *ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2*) siendo la presencia de esta enzima un indicador de mal pronóstico en pacientes con HCC^{237,238}. En modelos de ratón, las HSC también pueden reclutar MDSC a través del factor 1 derivado del estroma (*SDF-1, stromal cell-derived factor 1*) o CXCL12 y la señalización de IL-6^{239,240}. Además de los múltiples mecanismos inmunosupresores desplegados por las MDSC que se han mencionado anteriormente, las MDSC inhiben la activación de DC²⁴¹, median la activación de CAF – gracias a la producción de FGF-1²⁴² – y se asocian a menor infiltración de TIL²⁴³ (**Figura 4**).

En pacientes con HCC la información es bastante limitada. Las MDSC se describieron por primera vez en una cohorte de 111 pacientes con HCC como una población celular CD14⁺ HLA-DR^{-low}, que se acumula tanto en la sangre periférica como en el microambiente tumoral y se asocia a progresión tumoral²⁴⁴. En este trabajo, las MDSC CD14⁺ HLA-DR^{-low}, aisladas de la sangre de pacientes con HCC, mostraban una potente capacidad supresora con alta producción de Arg-1 y capacidad de expansión de linfocitos Treg²⁴⁴. Posteriormente, B. Hoechst *et al.* reportaron que las MDSC de pacientes con HCC también median la inhibición de células NK autólogas vía el receptor NKp30¹²².

En pacientes con HCC avanzado e inoperable, las MDSC circulantes, identificadas como células CD33⁺ CD11b⁺ CD14⁻ HLA-DR⁻, correlacionaban con los niveles de linfocitos Treg circulantes²⁴⁵. Asimismo, en pacientes con HCC sin tratamiento previo, se encontraron niveles elevados de MDSC circulantes Lin^{-low} CD33⁺ HLA-DR⁻, que se asociaron con estadio clínico más avanzado, esplenomegalia y niveles elevados de moléculas supresoras, como MMP-13, NOS-2 y Arg-1²⁴⁶. Esta acumulación de MDSC también se asoció con peor pronóstico en términos de supervivencia general y supervivencia libre de recurrencia en HCC, según se demostró en un metaanálisis en el que se incluyeron estudios que definían las MDSC como células CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR^{-low} o CD14⁺ HLA-DR^{-low} ²⁴⁷.

Las MDSC, además de ser un biomarcador pronóstico, también se han identificado como posibles indicadores de respuesta a tratamiento. La radioterapia disminuía las M-MDSC y las M-MDSC post-tratamiento eran un factor pronóstico independiente¹⁴⁴. En un estudio prospectivo observacional con 39 pacientes con HCC no reseccable tratados con RETA con Itrio-90, las M-MDSC se asociaban a peor supervivencia global²⁴⁸. De igual manera, se ha reportado que las M-MDSC favorecen la recurrencia tumoral tras el trasplante hepático vía CXCL10/TLR4/MMP-14 en un estudio que incluyó 331 pacientes con HCC²⁴⁹.

De acuerdo con la literatura, las M-MDSC parecen ser la subpoblación predominante en los pacientes con HCC, sin embargo, los estudios en modelos animales indican que las PMN-MDSC son las más implicadas en metástasis²⁵⁰⁻²⁵². En cuanto a las eMDSC, Y. Yue *et al.* reportaron que esta población no estaba aumentada en pacientes con HCC en comparación con controles sanos o pacientes con cirrosis ni se asociaba a ninguna característica clínica²⁵³. Por el contrario, S. Kalathil *et al.* definen las MDSC totales como CD33⁺ CD11b⁺ CD14⁻ HLA-DR⁻, fenotipo compatible con las eMDSC, y describen que están aumentadas en pacientes con HCC avanzado e inoperable²⁴⁵. La información en humanos es todavía limitada y no se conocen bien la importancia y distribución de las poblaciones de MDSC en HCC.

4. Trasplante Renal

4.1. Enfermedad renal crónica y terapias sustitutivas

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como la reducción progresiva e irreversible de la función renal mantenida durante al menos tres meses. El diagnóstico de la ERC se basa en una tasa de filtrado glomerular (TFG) inferior a 60 mL/min/1,73m², una ratio albumina/creatinina – albuminuria – superior a 30 mg/g cada 24h o la presencia de otros marcadores de daño renal como hematuria persistente, anomalías estructurales detectadas por imagen, anormalidades histológicas o historial de trasplantes previos^{254,255}. Globalmente, la ERC presenta una prevalencia en torno al 10 % en población adulta²⁵⁶. En España, la prevalencia es del 15,1 % aumentando hasta el 37 % en sujetos mayores de 65 años²⁵⁷. De acuerdo con el Registro Español de Diálisis y Trasplante (REDYT), la causa más frecuente de ERC es la diabetes *mellitus*, seguida de miscelánea y etiologías no filiadas y la enfermedad glomerular, con incidencias del 21,8 %, 21,6 % y 13,5 %, respectivamente²⁵⁸.

La progresión a insuficiencia renal tiene lugar cuando la TFG desciende por debajo de 15 mL/min/1,73m². En este estadio de la enfermedad, la función renal no es suficiente para mantener la supervivencia del paciente necesitando terapia renal sustitutiva (TRS)²⁵⁹. Actualmente, los tratamientos sustitutivos incluyen la diálisis, y, como terapia óptima, el trasplante renal.

La diálisis es el proceso mediante el cual se eliminan los productos de desecho, que no pueden ser filtrados por el riñón, gracias a la difusión de solutos y la ultrafiltración a través de una membrana semipermeable. La diálisis puede ser de dos tipos: la hemodiálisis – procedimiento extracorpóreo en el que la sangre del paciente se extrae a través de un acceso vascular hasta un dializador, donde tiene lugar la ultrafiltración, tras lo cual retorna al paciente – y la diálisis peritoneal – modalidad en la que se utiliza el peritoneo como membrana para la filtración y se introduce el líquido de diálisis a través de un catéter en el abdomen. La hemodiálisis continúa siendo la TRS más frecuente, aunque la diálisis peritoneal ha aumentado en los últimos años ya que permite una mayor autonomía del paciente y se asocia a mayor supervivencia en comparación con la hemodiálisis. No obstante, el trasplante renal es la TRS de elección puesto que proporciona la mayor supervivencia y calidad de vida a los pacientes, así como un mejor coste-eficiencia²⁶⁰⁻²⁶².

El trasplante renal está indicado para aquellos pacientes con enfermedad renal crónica avanzada (ERCA) sin importar la causa. Sin embargo, existen contraindicaciones absolutas – neoplasia activa, enfermedad crónica con esperanza de vida inferior a un año, consumo activo de drogas o alcohol, psicosis no controlada – y relativas – infección activa (excepto VHC), no adherencia al tratamiento demostrada, enfermedad coronaria, vascular periférica severa o cerebrovascular, hepatitis activa, infección VIH con carga viral no controlada e hiperparatiroidismo severo. Aunque la edad del receptor no es *per se* una contraindicación, muchas de las contraindicaciones relativas aparecen más frecuentemente en pacientes de edad avanzada^{263,264}.

Los injertos renales trasplantados pueden provenir de un donante cadáver o de un donante vivo (10,3 % de los donantes). El donante vivo, a pesar de ser el menos habitual, es el que ofrece mejor supervivencia tanto del paciente como del injerto²⁶⁵. Los donantes cadáver, según la causa del fallecimiento, se clasifican en donante cadáver en muerte encefálica y donante en asistolia suponiendo, respectivamente, el 51,5 % y el 37 % de los donantes en España en el 2022²⁵⁸. Los injertos procedentes de donantes en asistolia entrañan mayor riesgo ya que presentan mayor retraso de la función renal, suelen requerir sesiones de diálisis en las primeras semanas post-

trasplante, y tienen mayor probabilidad de disfunción primaria del injerto. Otros factores que influyen en la supervivencia del injerto incluyen la compatibilidad donante-receptor, el tiempo de isquemia fría – enfriamiento de un tejido u órgano como consecuencia de la reducción o interrupción del flujo sanguíneo –, la terapia inmunosupresora, y haber recibido diálisis previa al trasplante, influyendo negativamente en la supervivencia haber recibido hemodiálisis en comparación con diálisis peritoneal²⁶⁶⁻²⁶⁸.

4.2. Respuesta inmunitaria alogénica en el trasplante renal

Hoy en día, el trasplante alogénico – procedente de un donante genéticamente no idéntico – es posible gracias al desarrollo tanto de las técnicas quirúrgicas y de preservación de órganos como a los avances en inmunología que han optimizado la selección de los donantes más inmunológicamente compatibles e identificado dianas clave para los tratamientos inmunosupresores.

En individuos inmunocompetentes, el trasplante entre individuos no genéticamente idénticos conduce al alorreconocimiento – identificación de células y tejidos no propios – del injerto por parte de los linfocitos T y B gracias al TCR y al receptor de linfocitos B (BCR, *B cell receptor*)²⁶⁹. La respuesta inmunitaria adaptativa frente al órgano trasplantado se dirige fundamentalmente frente a antígenos codificados por genes polimórficos que difieren entre individuos de una misma especie. El sistema polimórfico más importante son las moléculas del MHC o HLA. Se trata de un conjunto de genes altamente polimórfico dividido en dos clases, I y II, diferenciándose entre ellas en su estructura, patrón de expresión y procesamiento de los antígenos. Las moléculas HLA de clase I se expresan en todas las células nucleadas y plaquetas mientras que las de clase II solo en APC, linfocitos B y células tímicas epiteliales^{1,270}.

El reconocimiento de los aloantígenos puede tener lugar por tres vías: directa, indirecta y semidirecta. En la vía directa, las APC del donante presentan péptidos en moléculas de clase I y clase II a los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ del receptor, respectivamente (**Figura 5A**). En la vía indirecta, las moléculas HLA del donante son capturadas y procesadas por APC del receptor y reconocidas por linfocitos T CD4⁺ del receptor. Algunos antígenos del injerto pueden ser presentados a los linfocitos T CD8⁺ a través del HLA de clase I mediante presentación cruzada – fenómeno mediante el cual las DC fagocitan proteínas derivadas del injerto que se liberan en el citosol y son procesadas por el proteosoma presentándose en moléculas HLA de clase I²⁷¹ (**Figura 5B**). En la vía semi-directa o *cross-dressing*, las DC del receptor adquieren complejos

HLA-péptido alogénico procedentes de células del donante, a través de exosomas, trogocitosis o nanotúbulos, y son reconocidos por linfocitos T del receptor²⁷²; por el momento, este proceso se ha demostrado en modelos animales y en el contexto del trasplante hepático clínico^{273,274} (Figura 5C).

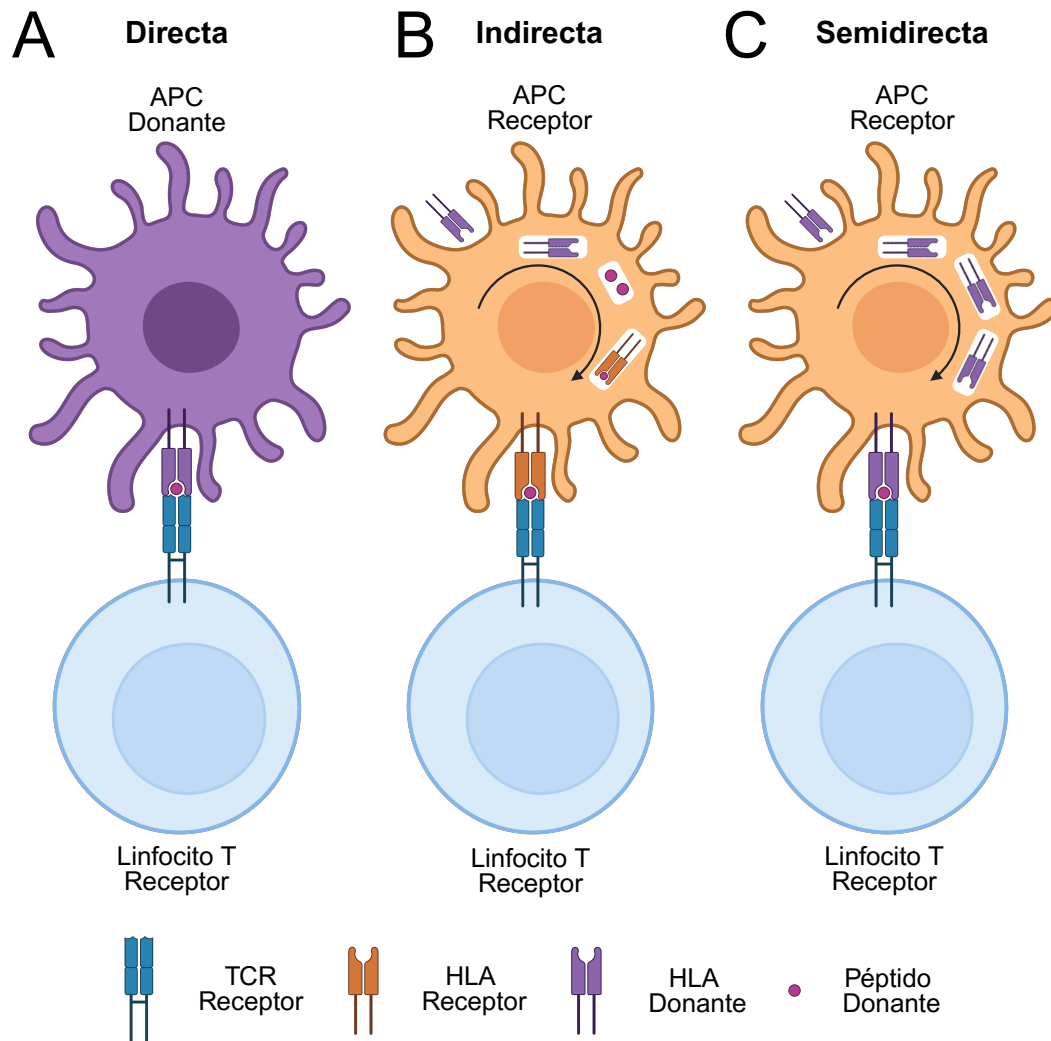


Figura 5. Reconocimiento y presentación de aloantígenos. (A) Presentación Directa (B) Indirecta y (C) Semidirecta. Creada en Biorender.com y adaptada de J. Callemeyn *et al.*²⁷⁵.

Tras el reconocimiento por cualquiera de las vías descritas, los linfocitos T se activan y diferencian llevando a cabo sus funciones efectoras responsables del rechazo celular. Los linfocitos T CD4⁺ se diferencian a linfocitos Th, células efectoras productoras de citoquinas que median la respuesta inmunológica, a linfocitos T foliculares cooperadores (Tfh, *T follicular helper cells*) o a linfocitos Treg. Los linfocitos Th1 y Th17 secretan IFN- γ e IL-17, respectivamente, generando un ambiente pro-inflamatorio y reclutando monocitos y

macrófagos²⁷⁶. En el caso de la subpoblación Th2, puede desencadenar también rechazo humoral o promover la migración de eosinófilos gracias a la producción de IL-4, IL-5 e IL-13. Aunque es poco habitual, algunos rechazos tienen perfil Th2²⁷⁷. Los linfocitos Tfh cooperan con los linfocitos B facilitando la producción de anticuerpos. En el contexto del trasplante, los linfocitos Tfh se han asociado al rechazo mediado por anticuerpos^{278,279}. Los linfocitos Treg son mediadores esenciales en la tolerancia periférica y favorecen la supervivencia del injerto suprimiendo la respuesta inmunitaria mediante producción de citoquinas anti-inflamatorias, supresión directa de células efectoras y modulación de la diferenciación y función de DC²⁸⁰ (**Figura 6**).

Los linfocitos T CD8⁺ se diferencian a CTL que migran al injerto, donde tiene lugar la lisis celular principalmente por la liberación de perforina y granzima B – provocando la apoptosis de la célula diana – o por la unión de Fas ligando (FasL) a Fas en la célula diana^{271,281}. En cuanto a la migración, en el contexto del rechazo, las quimioquinas relevantes son CXCL9, CXCL10 y CXCL11²⁸².

El compartimento B, responsable de la producción de anticuerpos donante-específicos (DSA, *donor-specific antibodies*), media el rechazo humoral. Para la generación de aloanticuerpos de alta afinidad se requiere cooperación con linfocitos Th activados mediante presentación indirecta, es decir, activados mediante interacción con una DC del receptor²⁸³. Las principales dianas antigénicas son las moléculas HLA, tanto clase I como II, y los antígenos del sistema de grupo sanguíneo ABO²⁸⁴. Estos anticuerpos anti-HLA DSA – generados pre-trasplante, en trasplantes previos, transfusiones o embarazados, o *de novo* tras el trasplante – son altamente deletéreos para la supervivencia del injerto²⁸⁵ provocando lesiones vasculares en el órgano debido a la activación del complemento, así como mecanismos independientes del mismo. La activación de la cascada del complemento lleva a la activación de células endoteliales y a la formación del complejo de ataque a membrana (MAC, *membrane attack complex*) provocando la pérdida de la integridad de la vasculatura. Las anafilotoxinas C3a y C5a aumentan la permeabilidad de los capilares sanguíneos e inducen la quimiotaxis de células innatas. Por otra parte, la unión de los anticuerpos a receptores Fc (FcR) presentes en neutrófilos, macrófagos y células NK desencadena la liberación de citoquinas inflamatorias, en el caso de los macrófagos, y de perforina y granzima B, por parte de las células NK^{276,286} (**Figura 6**).

En el contexto del trasplante, la inmunidad innata también participa en la respuesta inmunitaria alogénica, aunque su rol es menos conocido. Células NK, monocitos y neutrófilos tienen además

un papel dual en lo que al rechazo se refiere. Tras el trasplante, los DAMP, liberados como consecuencia del daño de isquemia-reperfusión, se unen a receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptor*) provocando la activación de células innatas que serán responsables de la activación del compartimento adaptativo y de otras funciones efectoras²⁷⁶.

Las células NK contribuyen a la respuesta frente al injerto mediante cuatro mecanismos: i) activación directa por la unión a ligandos activadores; ii) reconocimiento de pérdida de lo propio, *missing-self recognition*, debido a la ausencia de moléculas MHC propias en el injerto, lo que se ha asociado con inflamación microvascular y rechazo crónico vascular incluso en ausencia de DSA^{287,288}; iii) citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) tras la unión a CD16 (FcγRIIIA); y iv) ambiente inflamatorio por la presencia de citoquinas como IL-12, IL-15 e IL-18, secretadas por DC²⁸⁹. En determinados modelos se ha observado que las células NK también pueden inducir tolerancia mediante la eliminación de APC alogénicas²⁹⁰, producción de IL-10 y activación de Treg²⁹¹ y supresión de linfocitos T efectoras²⁹² (**Figura 6**).

Uno de los principales mediadores tempranos en las respuestas inmunitarias al injerto son los neutrófilos, implicados en la lesión de isquemia-reperfusión y en el retraso de la función renal, en el rechazo humoral²⁹³ y en el inicio del rechazo celular agudo actuando como APC²⁹⁴ o estimulando DC²⁹⁵. Además de la función pro-inflamatoria de los neutrófilos, también están implicados en la reparación tisular²⁹⁶ y en la resolución de la inflamación, mediante apoptosis controlada²⁹⁷, liberación de pequeñas vesículas extracelulares²⁹⁸ e inhibición de la activación de linfocitos T gracias a la liberación de elastasa y catepsina G que inactivan IL-2 e IL-6²⁹⁹.

En cuanto a las células dendríticas, además de ser las células especializadas en la presentación antigénica, y por tanto involucradas en diferentes mecanismos de rechazo, también pueden mediar funciones tolerogénicas: inhibición del compartimento T³⁰⁰, liberación de mediadores anti-inflamatorios como IDO, IL-10, TGF-β o NO³⁰¹ y diferenciación de Breg y Treg^{302,303}.

Los macrófagos suponen entorno al 60 % de las células encontradas en el órgano rechazado y participan tanto en el rechazo celular como humoral³⁰⁴. En función de los factores y citoquinas presentes, pueden diferenciarse en sentidos opuestos. Los macrófagos clásicos o M1 surgen en respuesta a DAMP y citoquinas pro-inflamatorias como IFN-γ o TNF-α³⁰⁵. Participan en la respuesta pro-inflamatoria mediante: i) reclutamiento linfocitario, por medio de la expresión de

CXCL9, CXCL10 y CXCL16; ii) producción de altos niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23, que inducen la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ a Th1 o Th17, y de iNOS2 e intermediarios reactivos de oxígeno (ROI, *reactive oxygen intermediates*); y iii) *up-regulación* de CD40, CD80, CD86 y MHC-II para facilitar la presentación antigénica^{306,307}. Por el contrario, los macrófagos polarizados hacia M2 son los responsables de la reparación tisular y la tolerancia del injerto. Aunque hay varias subpoblaciones de macrófagos M2, todas ellas secretan grandes cantidades de IL-10 junto con Arg-1, TGF- β y factores pro-fibróticos³⁰⁸ (**Figura 6**).

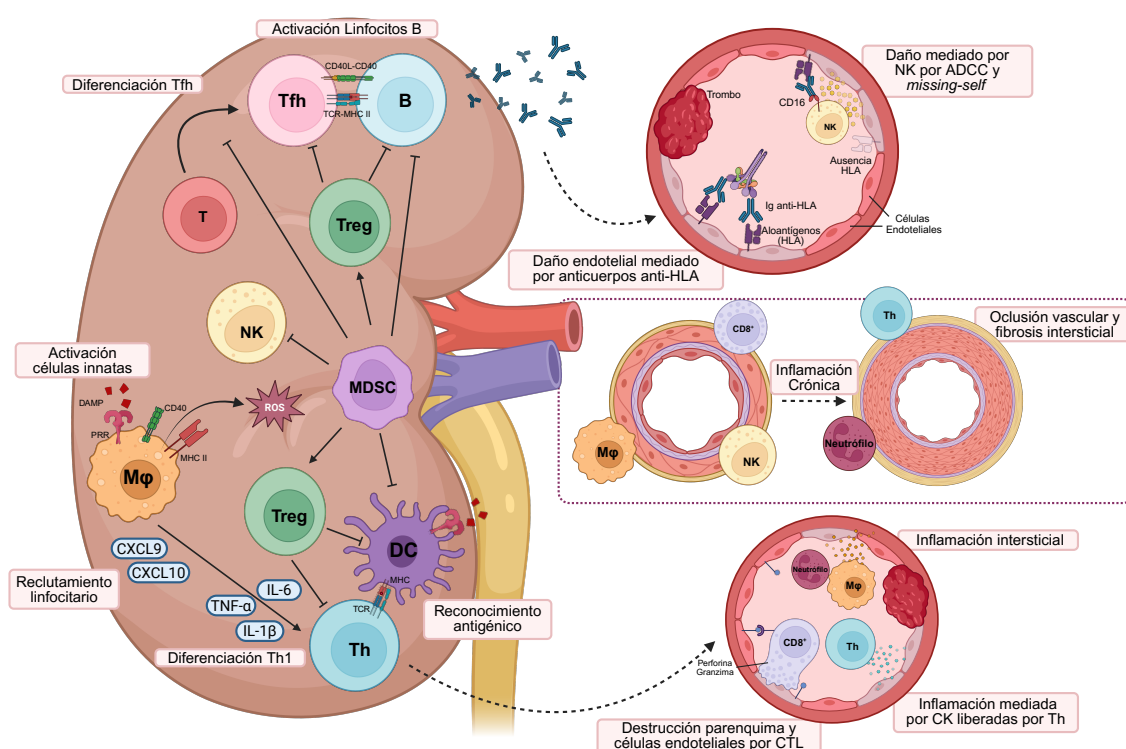


Figura 6. Respuesta inmunitaria alógena en el trasplante renal. Los linfocitos T CD4⁺ se diferencian a linfocitos Th, Tfh y linfocitos Treg. Los linfocitos Th se activan al reconocer aloantígenos presentados por las DC. Los linfocitos T CD8⁺ reconocen aloantígenos en el endotelio mediando la muerte de las células del parénquima y los linfocitos Th liberan citoquinas que provocan inflamación. Los linfocitos Tfh median la cooperación con los linfocitos B que secretan anticuerpos donante-específicos que median el rechazo humoral. La unión de los anticuerpos a su diana provoca la activación del complemento que lleva a la formación del complejo de ataque a la membrana. Las células NK son activadas tanto por los anticuerpos que se unen a CD16 como por la ausencia de moléculas de HLA. Las células innatas se activan por reconocimiento de DAMP. Los macrófagos (Mφ) secretan múltiples mediadores inflamatorios y median el reclutamiento linfocitario al injerto, así como la diferenciación a Th1. Cuando la inflamación se cronifica, el daño a los vasos sanguíneos lleva a la proliferación de las células del músculo liso resultando en oclusión vascular y fibrosis intersticial. Las MDSC median la supresión de las poblaciones inflamatorias y favorecen la diferenciación de linfocitos Treg. Creada en Biorender.com.

4.3. Terapia inmunosupresora

La terapia inmunosupresora tiene como principales dianas diferentes mecanismos relacionados con la función de los linfocitos T ya que estos se consideran necesarios para la aparición de rechazo, sobre todo en los primeros momentos tras el trasplante. La estrategia se divide en tres etapas: inducción, mantenimiento y tratamiento del rechazo.

4.3.1. Terapia de inducción

La terapia de inducción se administra pre-trasplante y en el post-trasplante inmediato con el objetivo de generar una inmunosupresión intensa, pero de corta duración, para que el órgano pueda implantarse sin complicaciones reduciendo el riesgo de rechazo agudo. La elección del tratamiento depende del riesgo inmunológico de acuerdo con las guías KDIGO³⁰⁹. Los principales fármacos empleados son anticuerpos, bien bloqueantes o deplecionantes.

En el centro de realización de este estudio, el Hospital Universitario 12 de Octubre, los más empleados son: i) globulina anti-timocítica (ATG, *anti-thymocyte globulin*) – anticuerpo policlonal dirigido frente a múltiples antígenos de superficie que media la inmunosupresión gracias a la inactivación y depleción principalmente de los linfocitos T^{310,311} – empleado en pacientes de alto riesgo inmunológico por trasplantes previos, hiperinmunizados, con presencia de múltiples anticuerpos anti-HLA preformados, en receptores jóvenes, tiempos de isquemia fría prolongados o episodios de rechazo previos³⁰⁹; ii) basiliximab – anticuerpo monoclonal quimérico con especificidad para IL-2R α , o CD25, que bloquea la proliferación y diferenciación de los linfocitos T – usado en pacientes con menor riesgo inmunológico³¹². Aquellos pacientes que presentan DSA en el momento del trasplante con frecuencia requieren de protocolos de desensibilización, que combina plasmaféresis, inmunoglobulina intravenosa (IVIg) y rituximab³¹³.

A pesar del corto periodo de tiempo en el que se administran estos anticuerpos sus efectos pueden perdurar hasta años post-trasplante³¹⁴. Además, no solo deplecionan poblaciones celulares importantes en la respuesta de rechazo sino también poblaciones reguladoras que median la tolerancia del injerto³¹⁵. Por ello, en aquellos pacientes en los que es posible prescindir de ella no se administra terapia de inducción. Se trata de casos en los que hay compatibilidad HLA y los órganos provienen de donantes vivos.

4.3.2. Terapia de mantenimiento

La terapia de mantenimiento es un tratamiento crónico que evita la respuesta inmunitaria frente al injerto. Los fármacos utilizados en esta etapa se clasifican en: i) inhibidores de la calcineurina; ii) corticoides; iii) antimetabolitos; iv) inhibidores de mTOR; y v) bloqueantes de la co-estimulación. Lo más utilizado es una combinación de fármacos que varía en función del centro trasplantador. Aunque se requiere una inmunosupresión mantenida, los niveles se suelen disminuir con el tiempo para evitar efectos secundarios asociados a la misma, como infecciones o aparición de cáncer³¹⁶. En nuestro centro la terapia estándar es la triple terapia, que combina tacrolimus, micofenolato mofetilo (MMF) y corticoides.

El tacrolimus o FK-506 se une a la inmunofilina FKBP12 formando un complejo que inhibe la calcineurina, enzima responsable de la transcripción de la IL-2 y otras citoquinas esenciales para la co-estimulación y diferenciación de los linfocitos T³¹⁷. Se prefiere con respecto a la ciclosporina ya que ha demostrado más eficacia en evitar el rechazo agudo^{318,319}. Debido a la neuro y nefrotoxicidad es necesario controlar regularmente su concentración plasmática y que se mantenga en rango terapéutico, en el caso de nuestro centro 8-12 ng/mL³²⁰ (**Figura 7**).

El micofenolato es un agente antimetabolito que bloquea la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina al inhibir la enzima inosina 5' monofosfato deshidrogenasa (IMPDH, *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*) de forma que se impide la proliferación tanto de linfocitos T como B³²¹. Se prefiere a la azatioprina por la asociación con mejor supervivencia del injerto y menor tasa de rechazo³²² (**Figura 7**).

La prednisona, corticoesteroide empleado en nuestro centro, es un anti-inflamatorio no específico que interfiere en múltiples pasos de la respuesta inmunitaria como la presentación antigénica, la producción de citoquinas y la proliferación linfocitaria. Este fármaco no solo tiene como diana poblaciones linfoides, sino que también actúa sobre células mieloides y puede inducir linfocitos Treg³²³. La dosis se suele reducir hasta su eliminación a lo largo del primer año post-trasplante para evitar sus efectos secundarios que incluyen hiperglucemia, retención de líquidos, hipertensión, osteoporosis y susceptibilidad a infecciones³²⁴ (**Figura 7**).

Otros fármacos muy empleados en el manejo del paciente trasplantado son los inhibidores de mTOR, sirolimus y everolimus. mTOR es un complejo central a múltiples vías que regula el metabolismo, crecimiento y proliferación celular. Normalmente se introducen como alternativa

cuando el paciente no puede continuar con inhibidores de la calcineurina debido a toxicidad o aparición de cáncer tras el trasplante³²⁵ (Figura 7).

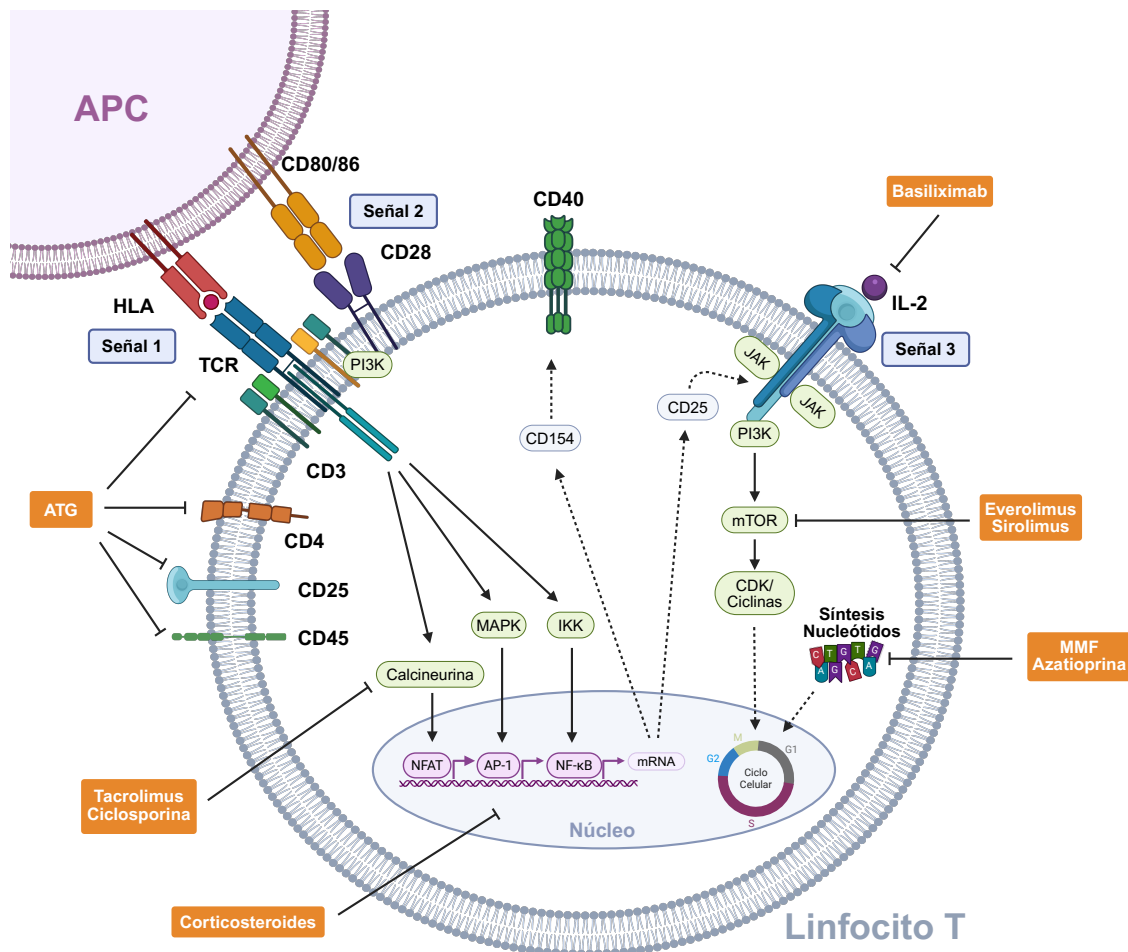


Figura 7. Dianas celulares de los fármacos inmunosupresores en linfocitos T. AP-1, proteína activadora 1; CDK, ciclina dependiente de quinasa, *cyclin-dependent kinase*; IKK, Quinasa I κ B, *I κ B kinase*; JAK, quinasas Janus, *Janus Kinases*; MAPK, Quinasa Activada por Mitógeno, *Mitogen-Activated Protein Kinase*; NFAT, Factor activador de linfocitos T activados, *Nuclear factor of activated T-cells*. Creada en Biorender.com y adaptada de M. Meneghini *et al.*³²⁶.

4.3.3. Tratamiento del rechazo

Cómo tratar el rechazo desde el punto de vista farmacológico depende de la fisiopatología de este. Habitualmente, durante el primer año predomina el rechazo celular en las biopsias, mientras que a partir del año post-trasplante el diagnóstico más común es el rechazo mediado por anticuerpos (ABMR, *antibody-mediated rejection*).

El rechazo celular ha disminuido significativamente gracias al efecto combinado de las terapias de inducción y mantenimiento³²⁷. El tratamiento también va a depender de la biopsia, clasificada

de acuerdo con los criterios de Banff³²⁸. En general, se comienza reinstaurando o aumentando la dosis de corticoides³²⁹. A continuación, se administran tratamientos dirigidos frente a los linfocitos T como ATG, basiliximab o alemtuzumab, anticuerpo monoclonal recombinante frente a CD52³³⁰.

El ABMR es la causa mayoritaria de pérdida del injerto por rechazo inmunológico y está causado por los DSA anti-HLA generados pre y post-trasplante. Este tipo de rechazo se divide a su vez en agudo – los anticuerpos se unen al endotelio del injerto y activan múltiples mecanismos que llevan a la pérdida rápida de la función del injerto – y crónico – proceso patológico progresivo resultante de eventos trombóticos repetitivos con cambios inflamatorios que llevan a daño endotelial y remodelación de la matriz³²⁸. En el rechazo humoral activo el objetivo es reducir los títulos de DSA, eliminar las poblaciones de linfocitos B y células plasmáticas, impedir la activación del complemento y reducir la lesión endotelial. Para ello, se utilizan corticoides, plasmaféresis, IVIG, rituximab – anticuerpo monoclonal deplecionante anti CD20 –, bortezomib dirigido frente a células productoras de anticuerpos y eculizumab que inhibe la activación del complemento mediante la unión a C5^{331,332}. En el rechazo humoral crónico el daño tisular es irreversible y tratar las causas es más difícil³³³, por lo que no hay tanto consenso en el tratamiento. El tratamiento más habitual incluye corticoides, IVIG y rituximab³³⁴, aunque más recientemente tocilizumab – dirigido frente al receptor de IL-6 – y felzartamab – frente a CD38, presente en células plasmáticas y células NK – han emergido como posibles terapias efectivas^{335,336} (**Figura 8**).

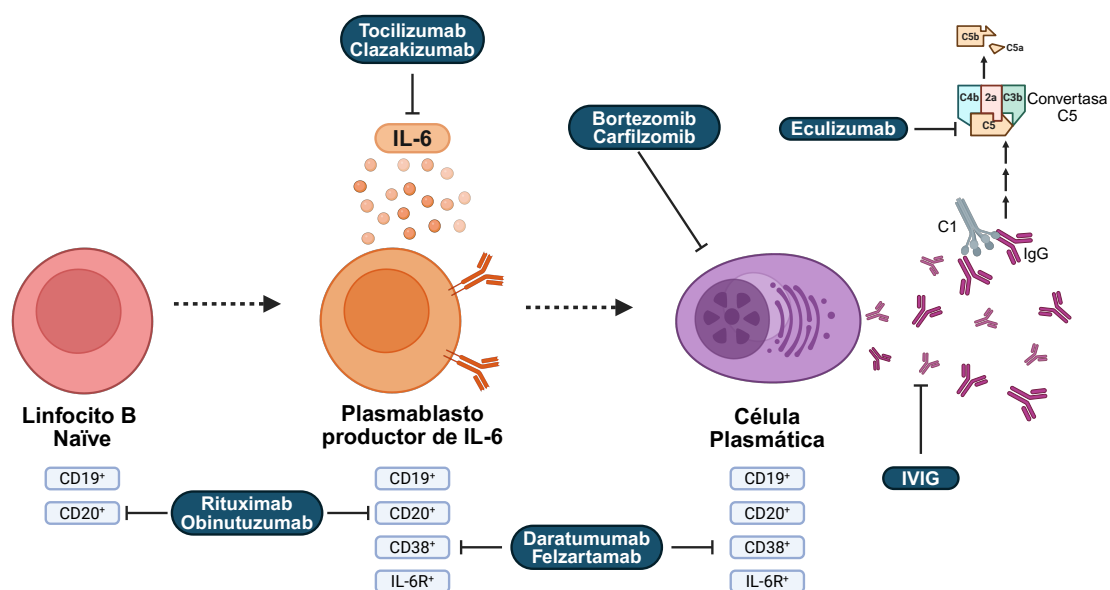


Figura 8. Estrategias terapéuticas dirigidas al rechazo mediado por anticuerpos. Creada en Biorender.com y adaptada de A. Vo, N. Ammerman & S. Jordan³³⁷.

4.4. Complicaciones en el post-trasplante

4.4.1. Eventos cardiovasculares

Actualmente, las complicaciones cardiovasculares suponen la primera causa de muerte en los pacientes trasplantados. Los eventos cardiovasculares en la población trasplantada incluyen enfermedad de las arterias coronarias, fallo cardiaco, arritmias e hipertensión pulmonar. A los factores de riesgo tradicionales como la hipertensión, el tabaco, la dislipidemia o la diabetes, se suman otros como el estrés oxidativo, la inflamación o la terapia inmunosupresora. Los efectos de la inmunosupresión incluyen hipertensión, dislipidemia, diabetes post-trasplante y anemia³³⁸.

4.4.2. Infecciones

Tras el trasplante, el riesgo de desarrollar infecciones aumenta debido a las exposiciones epidemiológicas y a la inmunosupresión a la que están sometidos los pacientes³³⁹. Las infecciones en el paciente trasplantado pueden ser infecciones comunes que pueden volverse persistentes en estos pacientes, infecciones oportunistas clínicamente relevantes en pacientes inmunosuprimidos o infecciones que se reactivan, tanto del donante como del receptor.

Asimismo, las infecciones dependen del momento post-trasplante, en función de las modificaciones de la medicación inmunosupresora a lo largo del tiempo. Así, en el primer mes los principales riesgos son las reactivaciones de infecciones pre-existentes tanto en el donante como el receptor o complicaciones infecciosas derivadas de la cirugía o la hospitalización³⁴⁰. En el periodo intermedio, hasta los 12 meses, la inmunosupresión es máxima y aparecen patógenos oportunistas como *Pneumocystis jirovecii*, o hay reactivación de virus latentes como virus del herpes simple y citomegalovirus (CMV). A partir de los 12 meses, la inmunosupresión se reduce y estabiliza. En este último periodo, los patógenos ambientales del paciente cobran más importancia³³⁹.

Además de poner en riesgo la vida del paciente, las infecciones pueden favorecer la respuesta inmunitaria alogénica provocando el rechazo del injerto³⁴¹. Los pacientes pueden recibir tratamiento profiláctico para determinados patógenos en función de su situación personal.

4.4.3. Neoplasia de novo

Otra de las complicaciones con mayor morbimortalidad es la aparición de tumores en los pacientes trasplantados. La incidencia de cáncer en los trasplantados renales es de más del doble que en población general pareada por sexo y edad con incidencias acumuladas del 5 % a los 5 años y por encima del 25 % tras 20 años. El aumento de incidencia es dependiente del tipo de tumor, observándose el mayor aumento con respecto a población general en el sarcoma de Kaposi, con una incidencia 300 veces mayor, cáncer cutáneo no melanoma (CCNM), 2-40 veces, cáncer de labio, más de 10 veces, y trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD, *Post-transplant Lymphoproliferative Disorder*). Por el contrario, no se ha observado aumento de la incidencia en cáncer de mama o de próstata³⁴²⁻³⁴⁸.

Los factores de riesgo para el desarrollo del cáncer son variados y dependen del tipo de tumor, la región geográfica y la población estudiada. Además, están influenciados tanto por las características individuales del paciente como por la inmunosupresión. A partir de los diversos estudios observacionales publicados, se han identificado múltiples factores: i) edad, aumentando el riesgo de cáncer en receptores mayores de 55 años³⁴⁹; ii) sexo masculino, con un 20-30 % de riesgo más que las mujeres³⁵⁰; iii) raza, relevante en CCNM, cáncer más prevalente en trasplantados caucásicos que en receptores afroamericanos o asiáticos^{345,351,352}; iv) enfermedad de base de la ERC, tanto los pacientes con diabetes como aquellos con enfermedad renal poliquística parecen tener menos riesgo de aparición de tumores^{349,350,353}; v) diálisis de larga duración pre-trasplante³⁵⁴; vi) historial de cáncer; y vii) factores ambientales como exposición solar o historial de tabaquismo^{355,356}.

Igualmente, los factores inmunológicos y relacionados con el trasplante tienen un impacto en el riesgo de cáncer, ya que influyen tanto en los episodios de rechazo como en la inmunosupresión. Las incompatibilidades en HLA-DR se han asociado a mayores tasas de linfomas B en pacientes trasplantados³⁵⁷. El donante también afecta, de forma que receptores con órganos de donantes cadáver con criterios expandidos tenían un 50 % más de riesgo que receptores de donante de vivo³⁵⁸. En cuanto al estado serológico CMV donante/receptor, no se ha visto que afecte a la aparición de cáncer.

Por lo general, el desarrollo de cáncer se atribuye a la inmunosupresión crónica a la que están expuestos los pacientes trasplantados, viéndose comprometida la inmunovigilancia anti-tumoral. De forma esperada, se ha observado que menores dosis de fármacos o la retirada parcial o total

de la inmunosupresión se asociaba con menor incidencia de tumores³⁵⁹⁻³⁶¹. Los agentes deplecionantes de linfocitos T, empleados como terapia de inducción o para el tratamiento del rechazo agudo, aumentaron el riesgo entre el 30 % y el 80 % de linfoma no Hodgkin o PTLD en comparación con los receptores que no recibieron inducción^{362,363}. En relación con los anticuerpos anti-IL2R, basiliximab o daclizumab, administrados como terapia de inducción, no se ha encontrado un aumento del riesgo de cáncer^{362,364}. Los inhibidores de mTOR, en comparación con inhibidores de la calcineurina, también disminuían hasta el 50 % el riesgo de cáncer^{342,365,366}.

Aunque se han identificado diversos factores de riesgo para el desarrollo de neoplasias en el post-trasplante y los pacientes son sometidos a seguimientos periódicos con revisiones y cribados, es crucial contar con biomarcadores que permitan identificar a aquellos con mayor susceptibilidad de desarrollar cáncer. Estos biomarcadores facilitarían la evaluación del riesgo en función de las características personales del paciente, su tratamiento inmunosupresor y factores inmunológicos. De esta manera, se podría personalizar la vigilancia y mejorar la prevención y detección temprana de tumores en esta población.

4.5. Papel de las MDSC en el trasplante

Al contrario de lo que ocurre en cáncer, en el contexto del trasplante de órgano sólido, las MDSC surgen como una población potencialmente beneficiosa ya que gracias a sus múltiples mecanismos inmunosupresores podrían ayudar a evitar el rechazo inmunológico.

En animales trasplantados de corazón³⁶⁷, piel^{368,369}, córnea^{370,371}, islotes pancreáticos³⁷² y riñón^{373,374} se ha observado una acumulación, en órganos linfoides e injertos, de células mieloides con capacidad supresora *in vitro*. El aumento, o transferencia, de MDSC se asociaba a mayor supervivencia del injerto. El bloqueo de las MDSC conllevaba la pérdida del injerto³⁷⁵ mientras que la administración de dexametasona favorecía la función de las MDSC³⁷⁶.

En humanos, son limitados los estudios que evalúan las MDSC en el contexto del trasplante. En receptores renales, B. Hock *et al.* encontraron niveles aumentados de MDSC totales, así como de M-MDSC y PMN-MDSC en comparación con controles sanos. Las MDSC se expandían post-trasplante independientemente de la terapia de inducción administrada^{377,378}. Y. Luan *et al.* también observaron una expansión de M-MDSC en receptores renales. Estas MDSC eran capaces de expandir linfocitos Treg *in vitro*³⁷⁹. En una cohorte de 50 receptores de trasplante

renal con rechazo celular T agudo dividieron a los pacientes según sus niveles de MDSC en altos y bajos, siendo 10 % de MDSC sobre las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) el punto de corte, y observaron que los pacientes del grupo de MDSC altas presentaba mayor supervivencia del injerto³⁸⁰. En receptores renales con injerto funcionante 10 años post-trasplante y dosis bajas de fármacos inmunosupresores, encontraron que las M-MDSC estaban elevadas con respecto a controles sanos y pacientes con corta supervivencia del injerto³⁸¹.

En receptores intestinales, de acuerdo con S. Okano *et al.*, tanto las MDSC totales como las tres subpoblaciones estaban aumentadas y presentaban capacidad supresora *in vitro*. Los pacientes con rechazo presentaban menores niveles de MDSC circulantes. Además, fueron capaces de detectar las MDSC en el injerto y la adición de las MDSC a co-cultivos *in vitro* aumentaba la viabilidad de organoides intestinales derivados del donante³⁸².

En los últimos años, se han descrito las MDSC en receptores de trasplante pulmonar. Aunque no se observó relación con eventos clínicos a corto plazo sí que aumentó la frecuencia de M-MDSC tras el rechazo celular agudo³⁸³. En pacientes con rechazo tras un trasplante hepático se han encontrado que las M-MDSC juegan un papel clave en el rechazo ya que las M-MDSC CD84⁺ PD-L1⁺ inducían el agotamiento de linfocitos T CD8⁺ que contribuyen al rechazo³⁸⁴.

Hasta el momento, no se conoce en profundidad el papel de las eMDSC en el contexto del trasplante órgano sólido. M. Iglesias-Escudero *et al.* reportaron el aumento de eMDSC post-trasplante en pacientes de trasplante pulmonar³⁸³, sin embargo, en trasplante renal esta población disminuía a los 6 meses post-trasplante³⁸⁵.

Nuestro grupo, en una cohorte de 229 receptores renales encontró niveles aumentados de M-MDSC con capacidad supresora hasta 12 meses post-trasplante. Aunque no se observó asociación con eventos de rechazo, las M-MDSC se encontraron disminuidas en aquellos pacientes con anticuerpos anti-HLA. Asimismo, aquellos pacientes con niveles elevados de M-MDSC, M-MDSC > 179,2 cel/ μ L, a los 14 días post-trasplante presentaban menor supervivencia libre de malignidad siendo las M-MDSC un factor de riesgo independiente de aparición de neoplasia en el post-trasplante³⁸⁶. Esta asociación también fue observada posteriormente por M.J. Bottomley *et al.*, quienes reportaron que menor expresión de HLA-DR se asociaba con aparición de neoplasia al año post-trasplante³⁸⁷.

Por tanto, las MDSC parecen tener un papel relevante en la tolerancia necesaria para la supervivencia del injerto. Sin embargo, los estudios existentes son pocos y con cohortes reducidas. Las MDSC tienen el potencial para ser un biomarcador tanto de rechazo como de aparición de neoplasia post-trasplante pero es necesario profundizar en su papel en el trasplante.





Objetivos



Estudios previos de nuestro grupo de investigación observaron que en los receptores de trasplante renal en los que se administraba basiliximab, anticuerpo monoclonal dirigido frente a CD25 – cadena α del receptor de IL-2 –, como terapia de inducción, se observaba una disminución significativa de la subpoblación de eMDSC.

En base a esto, el primer objetivo de la presente Tesis Doctoral fue:

1. Evaluar la presencia y funcionalidad de CD25 en la población de eMDSC.

Este objetivo se desarrolló en los siguientes subobjetivos:

1.1. Analizar el efecto de basiliximab sobre las eMDSC y la expresión de CD25.

1.2. Determinar la presencia y funcionalidad de las cadenas del receptor de IL-2 en células mieloides.

Asimismo, las MDSC son una población con capacidad inmunosupresora implicada en progresión tumoral y metástasis que, en pacientes con hepatocarcinoma, se acumula tanto en sangre periférica como en el microambiente tumoral asociándose a mayor progresión tumoral y peor supervivencia. Sin embargo, se desconoce la distribución y el papel de cada una de las subpoblaciones de MDSC en estos pacientes.

En base a esto, el segundo objetivo de la presente Tesis Doctoral fue:

2. Analizar el papel de las MDSC circulantes en pacientes con hepatocarcinoma.

Este objetivo se desarrolló en los siguientes subobjetivos:

2.1. Caracterizar las subpoblaciones de MDSC y sus factores asociados en sangre periférica de pacientes con hepatocarcinoma.

2.2. Evaluar la capacidad funcional de las MDSC.

2.3. Analizar la relación entre las distintas subpoblaciones de MDSC y el perfil clínico de los pacientes con hepatocarcinoma.

Por otro lado, en el contexto del trasplante de órgano sólido, es posible hipotetizar que las MDSC son una población beneficiosa que favorece la tolerancia al injerto. Si bien el trasplante renal es la mejor opción terapéutica para pacientes con enfermedad renal crónica avanzada, la terapia inmunosupresora, necesaria para garantizar la supervivencia del injerto, favorece la aparición de neoplasia en el post-trasplante. Por tanto, es necesaria la búsqueda de biomarcadores para

identificar los individuos en riesgo de desarrollar cáncer en el post-trasplante. Un trabajo anterior de nuestro grupo identificó que las M-MDSC elevadas precozmente eran un factor de riesgo independiente de aparición de neoplasia a los dos años post-trasplante.

En base a esto, el tercer objetivo de la presente Tesis Doctoral fue:

3. Evaluar el papel de las M-MDSC como factor de riesgo de aparición de neoplasia en el post-trasplante tardío.

Este objetivo se desarrolló en los siguientes subobjetivos:

3.1. Estudiar las M-MDSC en receptores de trasplante renal y su asociación con la aparición de cáncer en el post-trasplante.

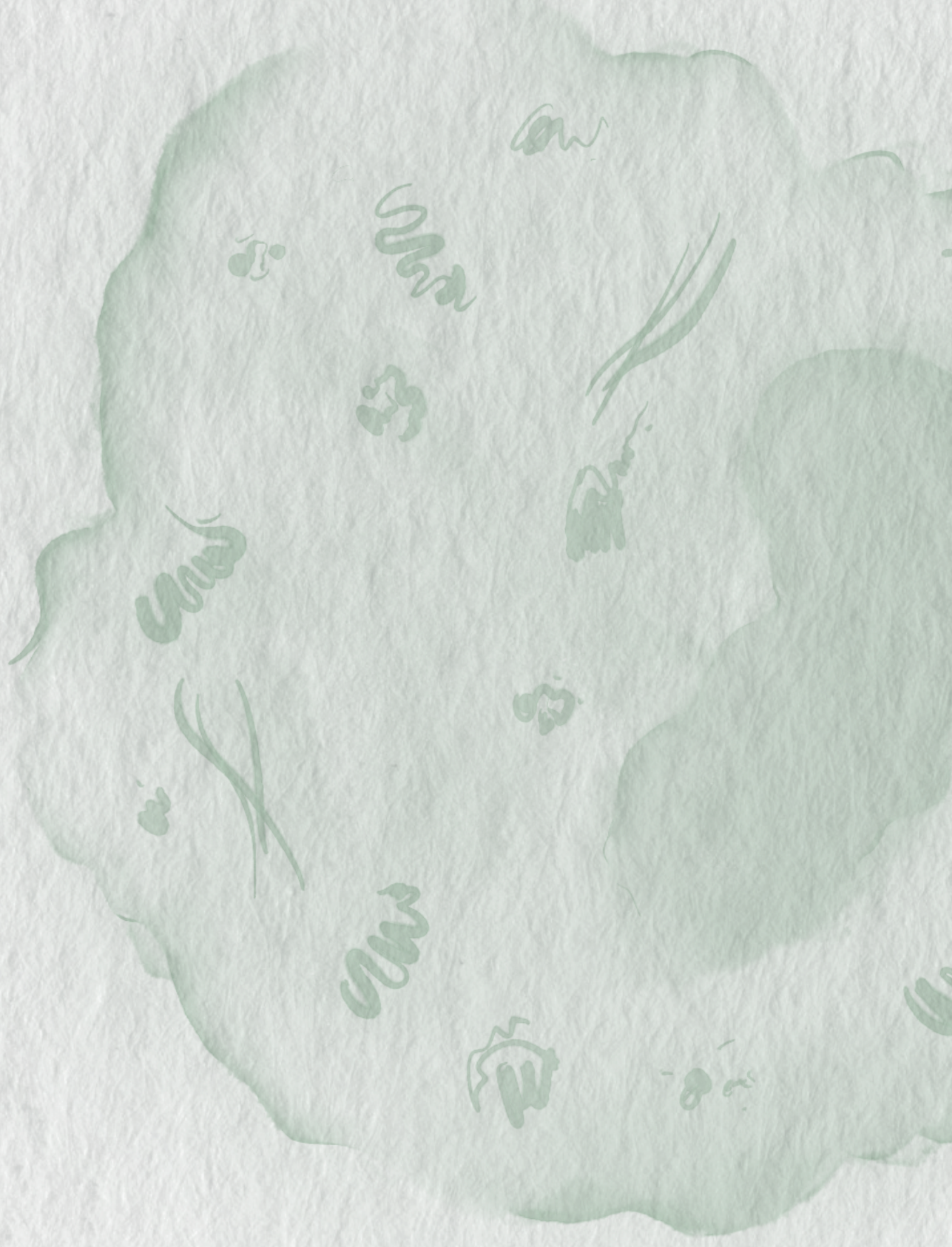
3.2. Evaluar los factores clínicos y demográficos asociados al riesgo de neoplasia y mortalidad en la población trasplantada.

3.3. Evaluar los factores asociados a la aparición de carcinoma cutáneo basocelular.

3.4. Evaluar los factores asociados a la aparición de carcinoma cutáneo epidermoide.

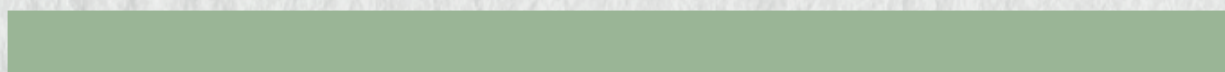
3.5. Evaluar los factores asociados a la aparición de tumores profundos.

3.6. Analizar la relación de las M-MDSC con eventos sensibilizantes y rechazo.





Material y Métodos



1. Pacientes

En este trabajo se han analizado dos cohortes:

Para el estudio de las MDSC en el contexto del hepatocarcinoma se incluyeron 22 pacientes con cáncer hepático reclutados en el Hospital Universitario 12 de Octubre entre marzo de 2018 y febrero de 2021 antes de someterse a cirugía: 18 para trasplante hepático y 4 para resección tumoral. De estos pacientes, 20 presentaban HCC y 2 hepatocolangiocarcinoma (CCA). El diagnóstico de HCC o CCA se confirmó histológicamente en todos los pacientes. Se obtuvo sangre periférica previo a la cirugía. También se reclutó un grupo de 17 controles sanos (CS) pareados por sexo y edad – con una mediana de edad de 63 años (rango intercuartílico, IQR: 58 – 67) en el grupo HCC y de 57,5 años (IQR: 41,5 - 62) en el grupo CS, p-value > 0,05 para la comparación. Asimismo, se incluyó un grupo de 6 receptores de trasplante hepático (RTH) de los que se tomaron muestras pre-trasplante y 7 y 14 días post-trasplante. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre (i+12) y todos los sujetos firmaron el consentimiento informado previo a la utilización de las muestras (CEI 17/015)

Para el estudio de receptores renales se incluyeron 240 pacientes receptores de un trasplante renal (RTR) trasplantados en el Hospital Universitario 12 de Octubre entre noviembre de 2014 y junio de 2016. Se tomaron muestras en el momento pre-trasplante y a 7 y 14 días y a 1, 3, 6 y 12 meses post-trasplante. Se eliminaron 14 pacientes por pérdidas de seguimiento, de forma que el estudio incluye 226 RTR.

Esta cohorte fue analizada de manera prospectiva durante nueve años recogiendo variables clínicas e inmunológicas. Se consideraron como eventos finales la aparición de neoplasia, eventos de rechazo, la aparición de anticuerpos anti-HLA DSA y la muerte. En los pacientes con sospecha de rechazo se realizaron biopsias para su confirmación definiéndose de acuerdo con la clasificación de Banff³²⁸. Se consideraron pacientes con tumores si había confirmación de anatomía patológica y se clasificaron en función del tipo de tumor en tres grupos: Carcinoma Cutáneo Basocelular (CCB), Carcinoma Cutáneo Epidermoide (CCE) y Tumores no cutáneos (TNC).

Como terapia de inducción se administró basiliximab o ATG. Un pequeño grupo no recibió ninguna terapia de inducción. En el grupo que desarrolló neoplasia en el post-trasplante, se analizó la terapia de mantenimiento durante el año previo al diagnóstico del tumor. Para comparar la terapia de mantenimiento en el mismo momento post-trasplante entre los grupos con y sin neoplasia, los pacientes de este último grupo se aleatorizaron 4:1 respecto a los pacientes con cáncer. Los fármacos empleados fueron tacrolimus, corticoides, MMF, azatioprina, everolimus y sirolimus. Los niveles de tacrolimus se mantuvieron en rango terapéutico durante todo el periodo de seguimiento.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre (i+12) y todos los sujetos firmaron el consentimiento informado previo a la utilización de las muestras (CEI 14/245).

2. Muestras

Para el estudio se obtuvo sangre periférica de pacientes y controles en tubos de Heparina-Litio (BD Bioscience) para el estudio celular y en tubos secos siliconados sin anticoagulante (BD Bioscience) para el estudio de componentes séricos.

Las PBMC se aislaron por centrifugación diferencial en gradiente de densidad con Lymphoprep™ (Stemcell Technologies) tras la dilución de la sangre 1:1 (v/v) con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos a 2000 revoluciones por minuto (rpm) con tasa de aceleración/deceleración 9/3. A continuación, se recogió la interfase y tras el lavado con tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*) se procedió al recuento celular en cámara de Neubauer con azul tripán (Corning).

Para la obtención de suero se centrifugaron los tubos secos 5 minutos a 3000 rpm. El suero se alicuotó y almacenó a -80°C para su posterior análisis.

3. Poblaciones mieloides por citometría de flujo

Para el inmunofenotipado de los pacientes, 1×10^6 PBMC se lavaron y resuspendieron en 100 μ L de PBS 0,5 % albumina sérica bovina (BSA, *Bovine serum albumin*) para evitar uniones inespecíficas. Seguidamente, se incubaron con *FcR Blocking Reagent* (Miltenyi Biotec) durante 10 minutos a 4°C para saturar el FcR. Después, las células se incubaron con los anticuerpos

monoclonales de superficie correspondientes, descritos en la **Tabla 6**, durante 20 minutos a 4°C y en oscuridad. Tras la incubación, las células marcadas se lavaron con PBS 0,5 % BSA y las células restantes se resuspendieron en 200 µL de PBS antes de la adquisición en un citómetro BD FACSCanto™ II.

Tabla 6. Anticuerpos monoclonales de superficie para el análisis de poblaciones mieloides por citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Referencia	Casa Comercial
CD33	PE-Cy7	WM-53	25-0338-42	eBioscience
CD11b	APC-A750	Bear1	B36295	Beckman Coulter
CD14	FITC	M5E2	555397	BD Bioscience
CD15	PercP-Vio700	VIMC6	130-113-487	Miltenyi-Biotec
HLA-DR	APC	L243	340549	BD Bioscience
CD25 (IL-2Rα)	PE	2A3	341011	BD Bioscience
CD122 (IL-2Rβ)	V500	Mik- β 3	563093	BD Bioscience
CD132 (IL-2Rγ)	V421	AG184	562881	BD Bioscience
Isotipo IgG1	APC	MOPC-21	554681	BD Bioscience
pSTAT5	Pacific Blue	47/Stat5(pY694)	560311	BD Bioscience

Se incluyeron diferentes controles para asegurar la correcta identificación de las poblaciones. Se utilizaron controles con un solo color para ajustar los voltajes e identificar poblaciones negativas. Se incluyeron controles *fluorescence minus one* (FMO) – omitiendo un anticuerpo en cada muestra para garantizar la correcta delimitación de las poblaciones – para los siguientes anticuerpos: CD25-PE, CD122-V500, CD132-V421. Estos controles fueron imprescindibles para establecer el punto de corte de expresión de las cadenas del IL-2R. Para HLA-DR-APC se empleó un control de isotipo IgG1 con el fin de establecer el punto de corte de expresión para cada paciente.

Con el objetivo de evaluar la unión de basixilimab, las PBMC se incubaron con basiliximab (*Simulect* en su forma comercial, Novartis Pharmaceuticals) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron para eliminar el exceso de anticuerpo y se añadieron los anticuerpos monoclonales correspondientes.

Tras la adquisición, los datos se analizaron con el software FlowJo V10 (Tree Star Inc). En primer lugar, la estrategia de gateo permitió discriminar entre singletes y agregados enfrentando en un *dotplot* el *forward-scatter area* (FSC-A) y el *forward-scatter height* (FSC-H). A continuación, la población de interés se seleccionó de acuerdo con su tamaño y complejidad en función de *side-scatter area* (SSC-A) y FSC-A.

En la cohorte de HCC, la selección de poblaciones celulares se realizó en función del tamaño y la complejidad celular mediante análisis de dispersión lateral (SSC-A). Se definieron dos principales grupos: neutrófilos de baja densidad – con mayor complejidad, SSC-A^{hi} – y células mononucleares – con menor complejidad, SSC-A^{low} –. Los PMN-MDSC se identificaron dentro de la población de neutrófilos como CD33⁺CD14⁻CD15⁺HLA-DR⁻ fenotípicamente. A partir de la fracción de células mononucleares, se seleccionó la población, CD33⁺CD11b⁺, en la cual se aplicó una estrategia de identificación basada en los marcadores HLA-DR, CD14 y CD15 para definir las siguientes subpoblaciones de interés: monocitos (CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{+/hi}), M-MDSC (CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-/low}) y eMDSC (CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁻HLA-DR⁻) (**Figura 9**). En todas las poblaciones definidas se evaluó la expresión de las cadenas del IL-2R.

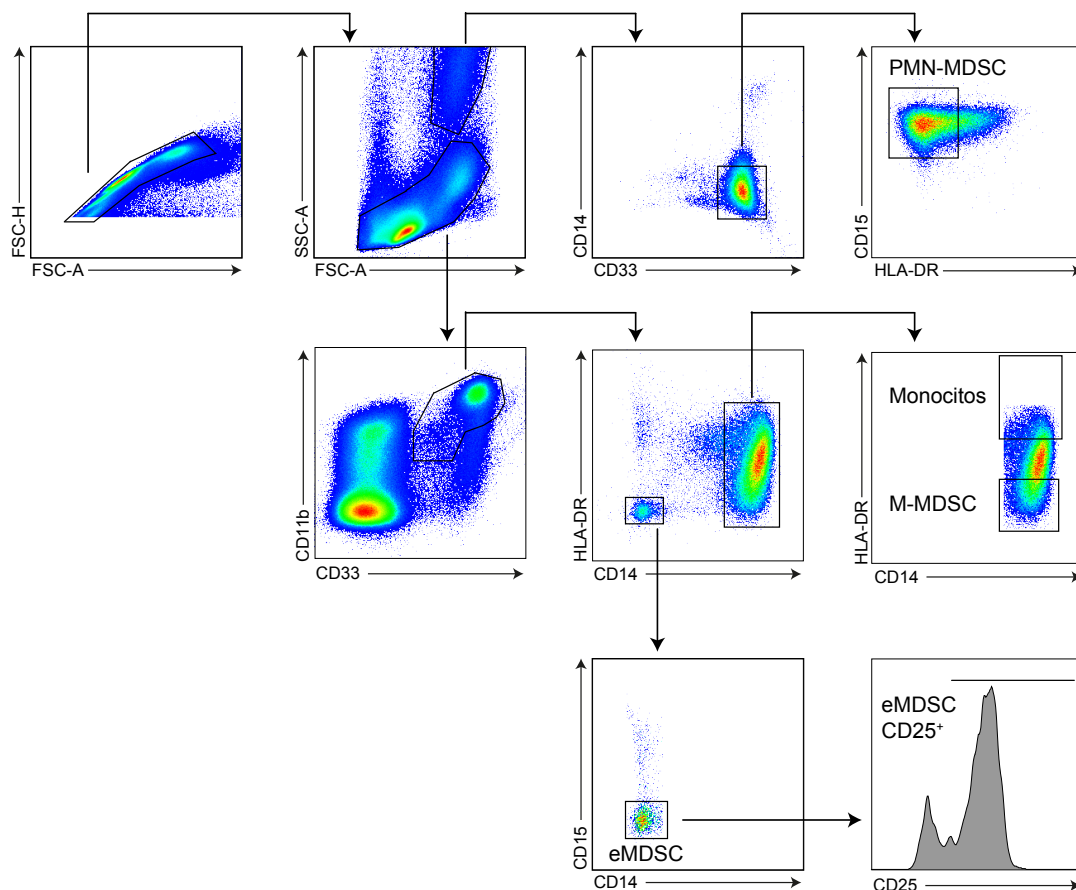


Figura 9. Estrategia de gateo para las poblaciones de MDSC en pacientes con HCC.

Los resultados se expresaron como el porcentaje de células en relación con el total de células mieloides CD33⁺ CD11b⁺ y el total de PBMC para cada población celular. Además, la expresión

de los marcadores de interés se cuantificó en términos de intensidad media de fluorescencia (MFI, *mean fluorescence intensity*).

En la cohorte de RTR, a partir del análisis inicial se seleccionaron las células $CD33^+CD11b^+$. El *dotplot* CD14 vs. HLA-DR permitió identificar la población de monocitos ($CD14^+HLA-DR^{+hi}$) y M-MDSC ($CD14^+HLA-DR^-$). En ambas poblaciones se confirmó la ausencia de CD15 (**Figura 10**). Los resultados se expresaron como porcentaje de células con respecto al total de células mieloides $CD33^+CD11b^+$, al total de PBMC y en valores absolutos (células/ μ L). El cálculo del número absoluto se realizó en función del recuento leucocitario obtenido a partir de la analítica rutinaria correspondiente a la misma extracción sanguínea.

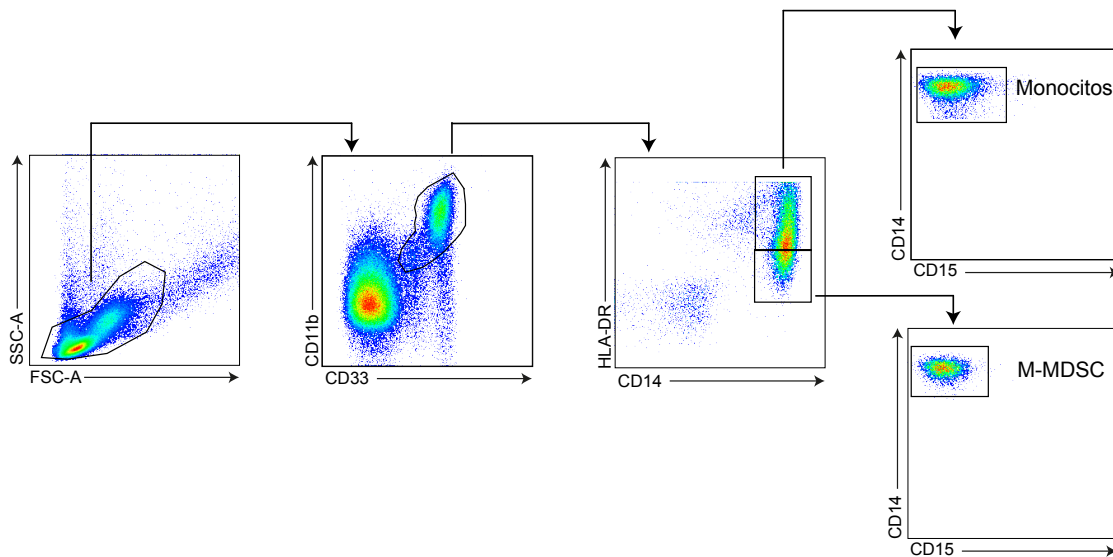


Figura 10. Estrategia de gateo para las poblaciones mieloides en RTR.

4. Ensayo de inmunosupresión *in vitro*

A partir de las PBMC se separaron las células $CD33^-$ y $CD33^+$ con el kit de purificación con microesferas CD33 (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras el aislamiento celular, la pureza de cada fracción se determinó por citometría de flujo con el anticuerpo monoclonal CD33-PE-Cy7. Para todos los experimentos, la pureza de ambas poblaciones fue superior al 90 %. El número de células $CD33^-$ plaqueadas en cada experimento se ajustó de acuerdo con el porcentaje de linfocitos T $CD3^+$, variable entre el 76 % y el 84 %.

Las células $CD33^-$ se marcaron con 2.5 μ M de éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, *carboxyfluorescein succinimidyl ester*) (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del

fabricante parando la tinción con suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*) para poder evaluar la proliferación de los linfocitos. Mediante citometría de flujo se comprobó el marcaje de CFSE previo al plaqueo. Las células CD33⁻ CFSE⁺ (5×10^4 células) se plaquearon en placas de 96 pocillos de fondo plano (Thermo Scientific) en ausencia de estímulo, como control negativo; o con 1,25 µg/mL anti-CD3 (BD Bioscience) adherido al pocillo y 0,5 µg/mL de anti-CD28 (Sanquin Reagents B.V) soluble como estímulos en el control positivo. Para el ensayo de inmunosupresión se añadieron al pocillo estimulado células mieloides CD33⁺ a ratio 1:1. Las células se cultivaron en medio RPMI1640 suplementado con 10 % FBS (Sigma-Aldrich), 1 % penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich), 1 % L-glutamina (Sigma-Aldrich) y 1 % piruvato (Sigma-Aldrich) a 37°C, saturación de humedad y 5 % de CO₂ (**Figura 11**).

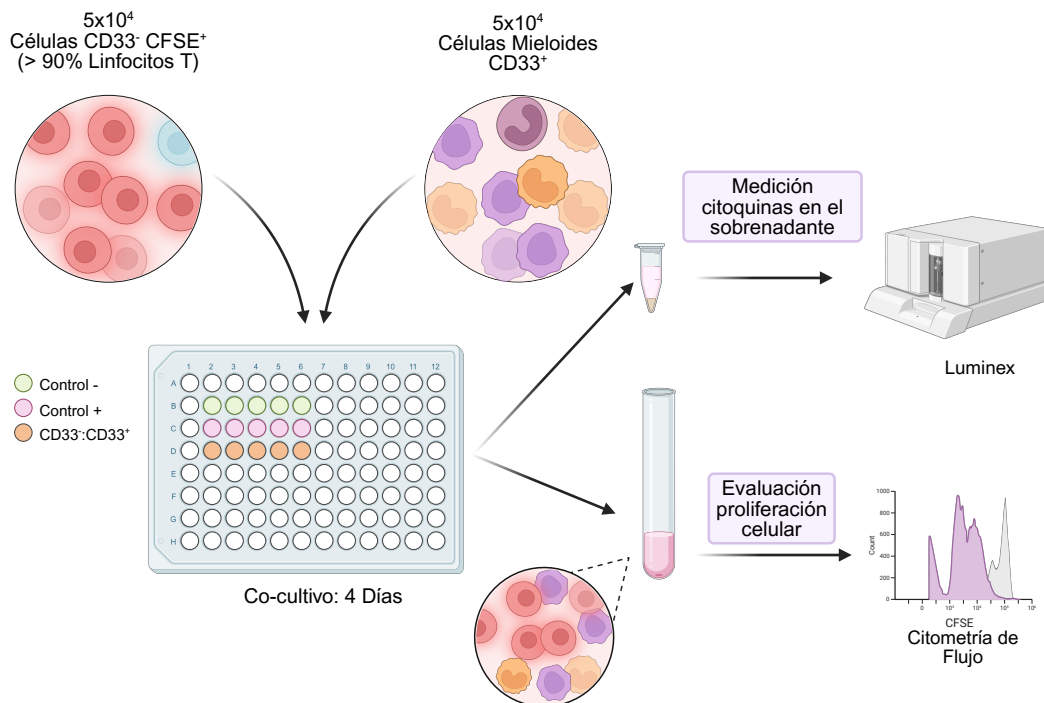


Figura 11. Esquema del ensayo de inmunosupresión *in vitro* mediada por MDSC. El experimento evaluaba la proliferación de linfocitos T marcados con CFSE co-cultivados con células mieloides de CS y pacientes con HCC. Las condiciones control incluyeron linfocitos T sin estímulo como control negativo y con anti-CD3 y anti-CD28 como control positivo. Creada usando Biorender.com

Tras 4 días de cultivo, los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

Para evaluar la proliferación de los linfocitos T, las células en cultivo se marcaron con CD4-Krome Orange (Beckman Coulter) y CD8-PerCP-Cy5.5 (BD Bioscience) y se analizó por

citometría de flujo la fluorescencia de CFSE en las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (**Figura 12**). El resultado del ensayo de supresión se calculó como:

$$\% \text{ Inhibición} = \% \text{ CFSE} + (\text{Control} +) - \% \text{ CFSE} (\text{Condición } 1:1)$$

Porcentajes de inhibición menores que cero indican que ha habido más proliferación que en el control positivo, mientras que porcentajes por encima de cero indican inhibición de proliferación.

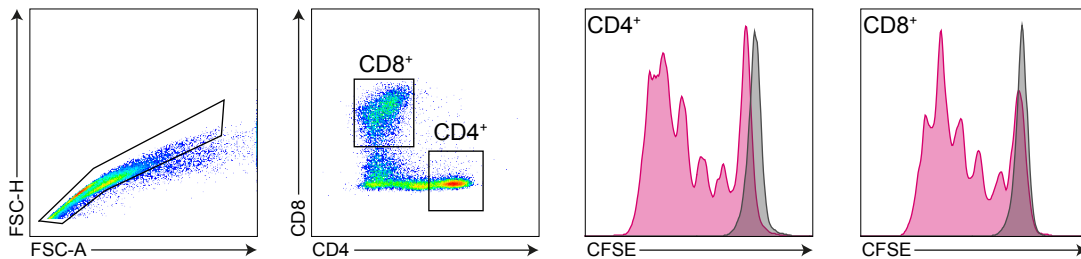


Figura 12. Estrategia de gateo para el ensayo de supresión. En este ejemplo representativo se muestra un CS. Los histogramas en color gris corresponden a la proliferación del control negativo, en ausencia de estímulos, para linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y los histogramas rosas corresponden a la proliferación del control positivo, estimulado con 1,25 µg/mL anti-CD3 adherido al pocillo y 0,5 µg/mL de anti-CD28 soluble.

5. Ensayo de activación del complemento por basiliximab

La citotoxicidad mediada por complemento se evaluó en células CD33⁺. 5x10⁵ células CD33⁺ se dispensaron en pocillos de placas Terasaki (*Terasaki Supplement HLA Tissue Typing Trays*, One Lambda) junto con un anticuerpo no fijador de complemento como control negativo (*Negative Control Reagent*, One Lambda), un anticuerpo IgG con múltiples especificidades frente a células sanguíneas y fijador de complemento como control positivo (*Anti Lymphocyte Control Reagent/IgG*, One Lambda) y 4 mg/L de basiliximab (*Simulect* en su forma comercial, Novartis Pharmaceuticals). Las células se incubaron durante 30 minutos, tras lo cual se añadió complemento de conejo (*HLA Class I Rabbit Complement*, One Lambda) siguiendo las instrucciones del fabricante, durante una incubación adicional de 60 minutos. La viabilidad celular se evaluó por citometría de flujo con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) como colorante de viabilidad y anti-CD33-PECy7, anti-CD11b-APC750, anti-CD14-FITC, anti-CD15-PerCP-Cy5.5 y anti-HLADR-APC para identificar las poblaciones mieloides.

6. Fosforilación de STAT5

Para la detección intracelular de STAT5 fosforilado (pSTAT5), se tomaron 5×10^5 células CD33⁺, aisladas previamente, por condición. Las células CD33⁺ se incubaron con basiliximab o *FcR Blocking Reagent*, en las condiciones control (**Tabla 7**), durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se estimularon con 1000 IU/mL de IL-2 (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos a 37°C. Tras la estimulación, las células CD33⁺ se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD33-PECy7, anti-CD11b-APC750, anti-CD14-FITC, anti-CD15-PerCP-Cy5.5 y anti-HLA-DR-APC (**Tabla 7**). Las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 10 minutos a 37°C y se permeabilizaron con metanol al 45 % durante 30 minutos a 4°C. Para la tinción intracelular se empleó anti-STAT5p-V450. Las células CD33⁻ se usaron como control técnico evaluando la fosforilación de STAT5 en linfocitos T CD3⁺. Como controles se incluyeron: FMO pSTAT5 – sin estímulo ni marcaje intracelular –, un negativo – sin estímulo –, y un positivo – con IL-2 – (**Tabla 7**). Las células se adquirieron en un citómetro BD FACSCanto™ II y los datos se analizaron utilizando el software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

Tabla 7. Condiciones experimentales para el ensayo de fosforilación intracelular de STAT5.

	Ac Bloqueante	Ac Intracito	Estímulo
FMO pSTAT5	FcR Blocking	-	-
Negativo	FcR Blocking	pSTAT5-V450	-
+ IL-2	FcR Blocking	pSTAT5-V450	IL-2
+ BAS + IL-2	Basiliximab	pSTAT5-V450	IL-2

Ac, Anticuerpo; FMO, *fluorescence minus one*; BAS, basiliximab

7. Actividad Arginasa-1

Para la evaluación de actividad Arg-1, los sueros se descongelaron y centrifugaron en columnas Amicon ultra-0.5 (Sigma-Aldrich) dos veces 30 minutos a 1400 rpm añadiendo agua destilada entre las centrifugaciones. La actividad Arg-1 se evaluó con el Kit QuantiChrom Arginase Assay (BioAssay Systems) en una placa de 96 pocillos de fondo plano (Thermo Scientific). Tras la adición de los sueros se añadió la solución de sustrato y se incubó durante 2 horas a 37°C. A continuación, se paró la reacción y se incubó 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, antes de la medición, todas las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos para eliminar la turbidez generada por la reacción. Para cada muestra se preparó un pocillo blanco,

que contenía suero en ausencia de solución de sustrato. La densidad óptica (DO) se midió a 430 nm en el lector PR 3100 microplate reader (Bio-Rad Life Science).

La actividad arginasa-1 se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Arg - 1 (U/L)} = \frac{DO_{\text{muestra}} - DO_{\text{blanco}}}{DO_{\text{estandar}} - DO_{\text{agua}}} \times 10,40$$

8. Cuantificación de citoquinas

Los niveles de citoquinas se cuantificaron tanto en los sobrenadantes del ensayo de supresión como en los sueros de los pacientes con HCC y CS. El panel de citoquinas incluyó: GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-21. Los sobrenadantes y los sueros – conservados a -80°C – se descongelaron y centrifugaron a 300g durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron transferidas a nuevos tubos Eppendorf.

Las citoquinas se analizaron mediante tecnología Luminex, citometría de flujo basada en microesferas, con el kit Cytokine 8-plex human panel (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, en una placa de 96 pocillos se añadieron 50 μ L de sobrenadante o suero y 50 μ L de cóctel de microesferas y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación a 600 rpm. Tras lavar dos veces con 150 μ L de buffer de lavado, se añadieron 25 μ L de anticuerpos de detección biotinilados y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente a 600 rpm. Los pocillos se lavaron dos veces con 150 μ L de buffer de lavado. Seguidamente, se añadieron 50 μ L de estreptavidina-PE a cada pocillo incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente a 600 rpm. Finalmente, se lavó dos veces con 150 μ L de buffer de lavado, tras lo cual se añadieron 120 μ L de buffer de lectura incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente en agitación a 600 rpm. La placa se leyó en un equipo Luminex FLEXMAP 3D.

9. Detección de anticuerpos anti-HLA

La detección de anticuerpos anti-HLA se realizó pre-trasplante cada 4 meses y post-trasplante anualmente en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario 12 de Octubre mediante tecnología Luminex con el kit LABScreen Mixed kit (One Lambda). Los sueros se trataron con BSA si el control negativo tuvo un resultado > 500 MFI, medida representativa de la cantidad de

anticuerpos, y se inactivó el complemento por calor si el control positivo tenía un resultado < 6000 MFI. En las muestras positivas para el screening de anticuerpos anti-HLA se determinó la especificidad de los anticuerpos con el kit LABScreen Single Antigen (One Lambda). Se consideró un resultado positivo > 500 MFI clasificando en función de la intensidad en reacción débil entre 500 y 2000 MFI, reacción intermedia entre 2000 y 4000 MFI y reacción fuerte por encima de 4000 MFI.

10. Tipaje HLA

Los donantes se tipificaron para HLA previo al trasplante en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario 12 de Octubre. Para los donantes locales, el tipaje HLA incluyó los loci HLA A, B, C DRB1, DRB3/4/5, DQB1 y DQA1 mediante PCR de cebador específico único (PCR-SSP, *Sequence Specific Primers PCR*) (Micro SSP Generic HLA Class I and II DNA Typing Tray, One Lambda).

11. Estadística

Las variables categóricas se expresaron como frecuencias absolutas y relativas. Para comparar la distribución entre grupos se emplearon la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher en función del tamaño muestral. Las variables continuas se representaron como mediana y rango intercuartílico (IQR, *Interquartile range*) y se compararon utilizando el estadístico U de Mann-Whitney, la prueba de rangos con signo de Wilcoxon o la prueba de Kruskal-Wallis según correspondiera. Los cambios en las dinámicas de las poblaciones mieloides a lo largo del seguimiento se evaluaron con un modelo de regresión de efectos mixtos para datos continuos.

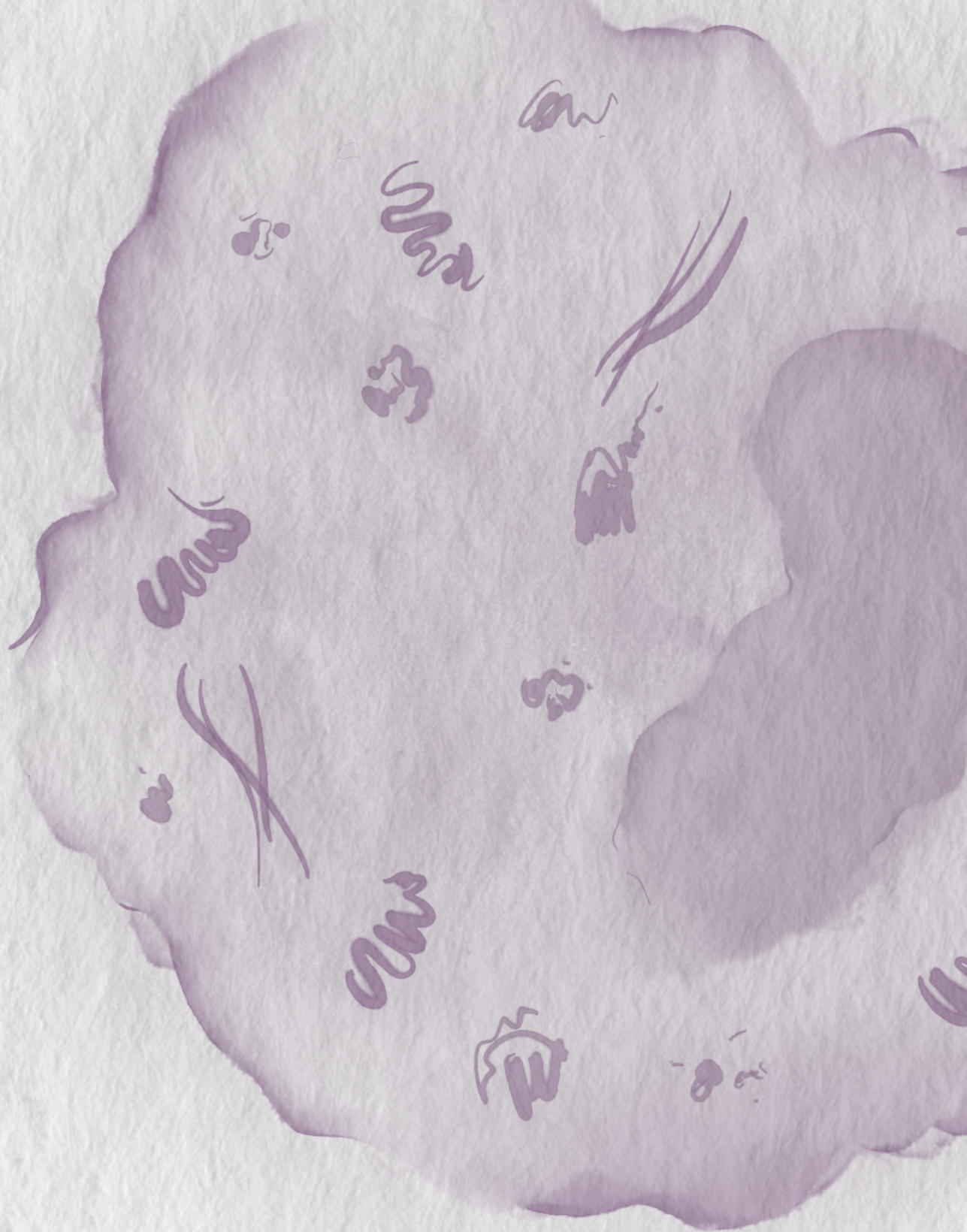
Las correlaciones entre variables continuas se evaluaron con regresión lineal y el coeficiente de correlación de Spearman y se representaron como gráficos de correlación empleando los paquetes de R Hmisc y corrplot. El análisis de componentes principales (PCA, *principal component analysis*) de las poblaciones mieloides se realizó con los paquetes de R factoMineR y factoextra.

Se emplearon curvas Característica Operativa del Receptor (ROC, *Receiver Operating Characteristic*) para determinar los puntos de corte de las M-MDSC a los diferentes tiempos post-trasplante. La selección del umbral óptimo se basó en la optimización del Índice de Youden,

optimizando la sensibilidad y especificidad del modelo. Se estimó el área bajo la curva (AUC, *area under curve*) y se representó la curva ROC en base a la razón de verdaderos positivos (TPR, *true positive rate*) y la razón de falsos positivos (FPR, *false positive rate*). Se utilizaron los paquetes de R ROCit y pROC.

Para estudiar el impacto en la aparición de anticuerpos anti-HLA, rechazo o neoplasia post-trasplante se usaron modelos de regresión de Cox calculando el *Hazard Ratio* (HR) univariante y multivariante con el intervalo de confianza (IC) al 95 % teniendo en cuenta los días hasta la aparición del evento. Se excluyeron del análisis aquellas variables que en la regresión de Cox mostraron HR no interpretables (0 o infinito), resultado de una separación completa en los datos (ausencia de eventos en algún nivel de la variable), lo que impidió la convergencia del modelo hacia estimaciones válidas. La supervivencia libre de malignidad (SLM) se definió como el tiempo desde el trasplante renal hasta el diagnóstico de cáncer mediante biopsia. La supervivencia libre de rechazo (SLR) se definió como el tiempo desde el trasplante renal hasta el diagnóstico de rechazo mediante biopsia. En aquellos pacientes con varios episodios, se consideró el primer episodio de rechazo. Los pacientes que no presentaron el evento de interés durante el periodo de seguimiento fueron censurados en la fecha de último control disponible. En el caso de pacientes que fallecieron sin desarrollar el evento, se censuró en la fecha de fallecimiento. Todos los seguimientos fueron actualizados hasta el 31/12/2024. La supervivencia libre de evento en el periodo de seguimiento se evaluó con curvas Kaplan-Meier y la prueba de *log-rank* con los paquetes de R survival y survminer. Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de supervivencia con riesgos competitivos, basado en el modelo de subdistribución de riesgos proporcionales de Fine y Gray, para modelar la aparición de neoplasia post-trasplante considerando los eventos de rechazo como evento competidor con el paquete tidycmprsk. Para los eventos de rechazo, la aparición de anticuerpos anti-HLA y DSA se consideró como evento competidor la aparición de neoplasia. Los resultados de los modelos de regresión de Cox se representaron en forma de gráficos tipo *forest plot* mostrando los HR con sus respectivos intervalos de confianza utilizando el paquete ggplot2.

Las diferencias se consideraron significativas estadísticamente cuando $p < 0,05$ (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). La representación y el análisis estadístico se realizaron con GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA) y R Software v4.1.1.





Resultados



CAPÍTULO I:
Las eMDSC expresan
el receptor de IL-2

Las MDSC han emergido como una de las poblaciones clave en la regulación de la respuesta inmunitaria, sobre todo en el contexto tumoral. En un estudio previo de nuestro grupo de investigación³⁸⁶, se observó una depleción de eMDSC en el post-trasplante en receptores renales tratados con basiliximab, fármaco dirigido frente a CD25, como terapia de inducción. Esta observación condujo a estudiar la presencia, funcionalidad y papel de CD25 en la población de eMDSC. En este contexto, en este capítulo se ha evaluado la expresión de CD25 así como el receptor completo de IL-2 y su funcionalidad en las subpoblaciones de MDSC.

1.1. Expresión de CD25 (IL2R- α) en eMDSC e impacto de basiliximab

En un estudio previo de nuestro grupo se analizó la evolución de las MDSC y sus subpoblaciones de forma longitudinal en una cohorte de trasplante renal³⁸⁶. Los RTR se clasificaron en función de la terapia de inducción recibida previa al trasplante. Atendiendo a esta clasificación, 106 pacientes se trataron con ATG, 86 con basiliximab, anticuerpo monoclonal bloqueante de IL-2R α , y 32 pacientes no recibieron terapia de inducción. Dentro de la fracción celular mononuclear, se identificaron las MDSC totales, CD33⁺CD11b⁺HLA-DR^{-low}, y la subpoblación de eMDSC, CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁻HLA-DR⁻.

En el pre-trasplante, los niveles de MDSC totales y eMDSC fueron comparables entre los tres grupos de inducción. Tras el trasplante, las MDSC totales aumentaron significativamente a los 7 y 14 días post-trasplante en todos los grupos en comparación con los niveles pre-trasplante (**Figura 13A**). Sin embargo, la evolución de la subpoblación de eMDSC, mostró diferencias según el tratamiento recibido. En los pacientes que no recibieron inducción, los niveles de eMDSC permanecieron estables a lo largo del seguimiento. En los RTR tratados con ATG se detectó un descenso transitorio a los 7 días post-trasplante, recuperándose los niveles a los 14 días post-trasplante. En los pacientes tratados con basiliximab, se objetivó un descenso tanto a los 7 como a los 14 días post-trasplante, y los niveles de eMDSC en este tiempo fueron significativamente inferiores en comparación con los de pacientes que no recibieron inducción o que fueron tratados con ATG (**Figura 13B**). Esta observación sugirió un efecto específico de basiliximab sobre las eMDSC, lo que llevó a plantear la hipótesis de que las eMDSC podrían expresar la diana del fármaco, IL-2R α o CD25.

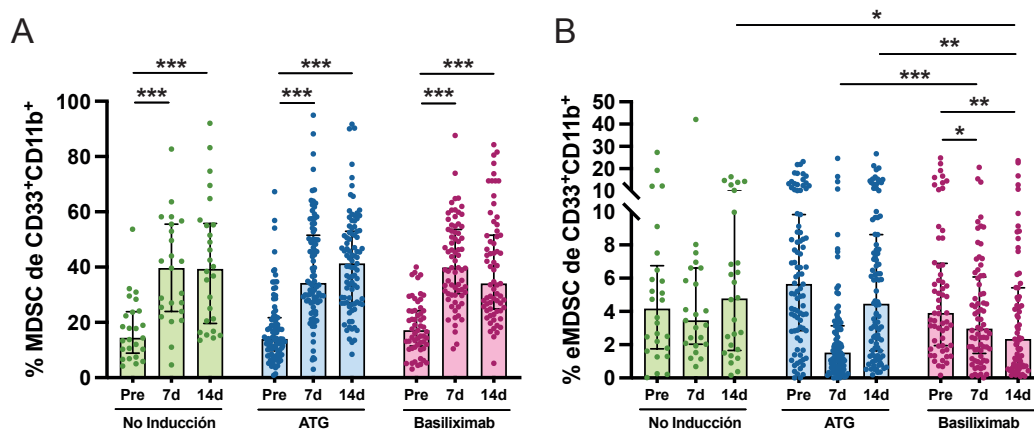


Figura 13. Las eMDSC disminuyen sostenidamente en los RTR tratados con basiliximab³⁸⁶. (A) Porcentaje de MDSC totales ($CD33^+CD11b^+HLA-DR^{-low}$) y (B) eMDSC ($CD33^+CD11b^+CD14^-CD15^-HLA-DR^-$) en RTR clasificados en función de la terapia de inducción. Todos los parámetros se muestran como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; ATG, globulina anti-timocítica; Pre, pre-trasplante; 7d, 7 días post-trasplante; 14d, 14 días post-trasplante.

Para validar esta idea, analizamos la expresión de CD25 en las eMDSC observando una reducción significativa en el porcentaje de eMDSC $CD25^+$ únicamente en los pacientes que habían recibido basiliximab (**Figura 14A, B**). Además, evaluamos la capacidad de unión de basiliximab a las eMDSC *in vitro* mediante la incubación de estas células con el fármaco antes del marcaje para citometría de flujo. La adición del fármaco bloqueó la detección de CD25 en la superficie de estas células. Antes de la incubación, el 77 % de las eMDSC presentaban CD25, sin embargo, después de la exposición a basiliximab, este porcentaje disminuyó a 0 sugiriendo que el fármaco compite con el anticuerpo utilizado en citometría de flujo para el reconocimiento de CD25 (**Figura 14C, D**) y, por tanto, que CD25, cadena α del receptor de la IL-2, está presente en la membrana de las eMDSC.

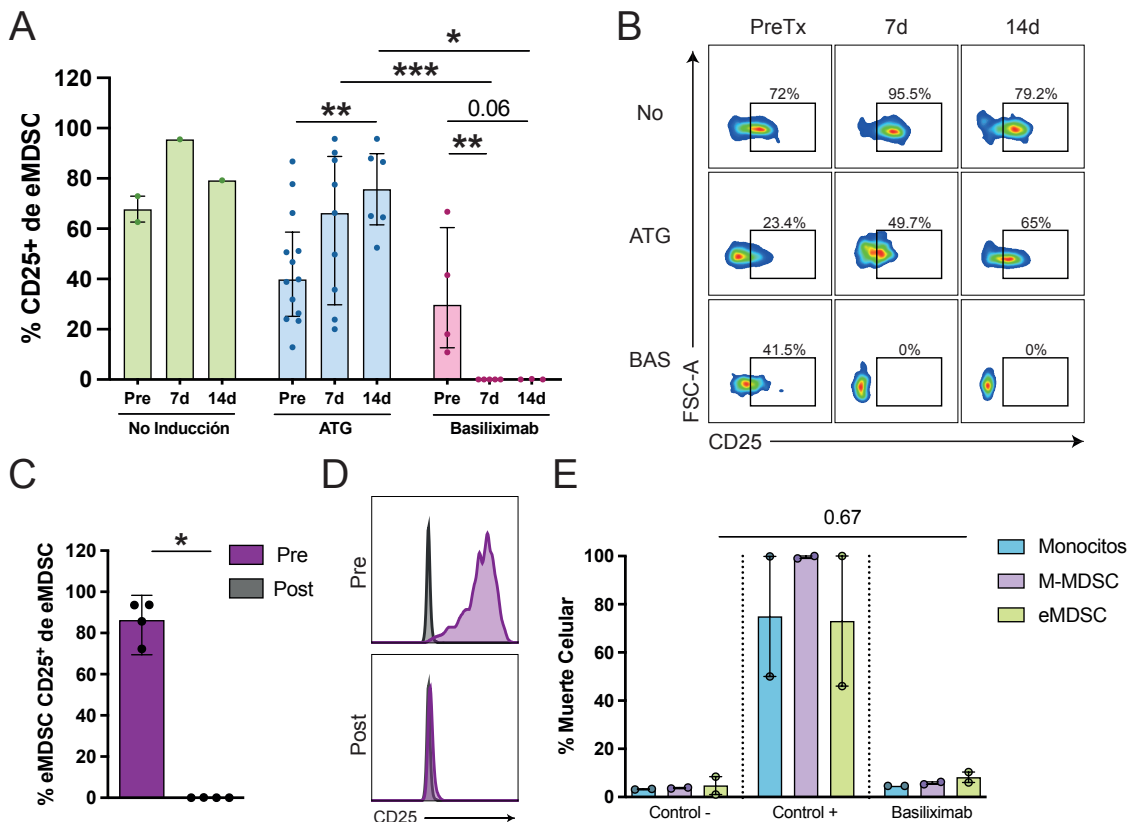


Figura 14. Basiliximab se une a CD25 en las eMDSC. (A) Porcentaje de eMDSC CD25⁺ y (B) Ejemplo representativo de expresión de CD25 en RTR tratados con ATG, basiliximab o sin inducción pre-trasplante (PreTx), y a los 7 y 14 días post-trasplante. (C) Porcentaje de eMDSC CD25⁺ y (D) Ejemplo representativo de expresión de CD25 antes y después de la incubación con basiliximab *in vitro* mostrada en forma de histograma en morado. La curva gris representa el control negativo en forma de FMO. (E) Porcentaje de muerte celular mediada por complemento en monocitos, M-MDSC y eMDSC tras la incubación con un anticuerpo no fijador de complemento (Control -), un anticuerpo IgG poliespecífico fijador de complemento (Control +) y basiliximab 4 mg/L. Todos los parámetros se muestran como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon según correspondiera. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; Pre, pre-trasplante; 7d, 7 días post-trasplante; 14d, 14 días post-trasplante.

Aunque Basiliximab está considerado un anticuerpo monoclonal bloqueante, no deplecionante, diseñado para unirse específicamente a CD25 sin inducir citotoxicidad directa sobre las células que expresan la diana, quisimos evaluar si el mecanismo responsable de la reducción observada en las eMDSC de los pacientes tratados con este anticuerpo podría deberse a su capacidad para activar la cascada del complemento provocando la muerte de las células. Para ello, las células mieloides CD33⁺ aisladas se incubaron con basiliximab y complemento de conejo, y posteriormente se analizó la muerte celular por citometría de flujo en monocitos (CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR⁺), M-MDSC (CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-low})

y eMDSC (CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁻HLA-DR⁻). Como control positivo, la adición de un anticuerpo IgG poliespecífico fijador de complemento aumentó la muerte celular en las tres poblaciones estudiadas en comparación con el control negativo, confirmando la funcionalidad del sistema de complemento en el ensayo. La incubación con basiliximab no indujo muerte celular en monocitos o M-MDSC, lo que era esperable dado que estas poblaciones no expresan la diana del fármaco. En el caso de las eMDSC basiliximab no desencadenó citotoxicidad mediada por complemento, sugiriendo que la reducción de esta subpoblación observada en pacientes tratados con el fármaco no se debe a un mecanismo de lisis celular por activación del complemento (**Figura 14E**).

1.2. Las eMDSC presentan un receptor funcional de IL-2

El IL-2R está compuesto por tres cadenas independientes, α (CD25), β (CD122) y γ (CD132) y puede presentarse en tres configuraciones: i) de baja afinidad, en la que solo participa la cadena α , capaz de unir IL-2 de forma independiente; ii) de afinidad intermedia, compuesto por las cadenas $\beta\gamma$; y iii) de alta afinidad, cuando las tres cadenas están presentes en el receptor³⁸⁸.

La presencia de estas cadenas en la superficie de las MDSC se evaluó mediante citometría de flujo en tres poblaciones mieloides: células CD14⁺ (incluyendo tanto monocitos como M-MDSC), PMN-MDSC y eMDSC. Como controles negativos de expresión, se emplearon FMO para determinar el umbral de expresión en cada población para cada marcador.

En primer lugar, se observó que ni las células CD14⁺ ni las PMN-MDSC expresaban CD25, aunque sí mostraban la presencia de las cadenas β y γ (**Figura 15A, B**). En contraste, y confirmando lo observado anteriormente, las eMDSC sí expresaban la cadena α en su superficie, además de las cadenas β y γ (**Figura 15C**). Por tanto, solo las eMDSC expresan las tres cadenas del IL-2R.

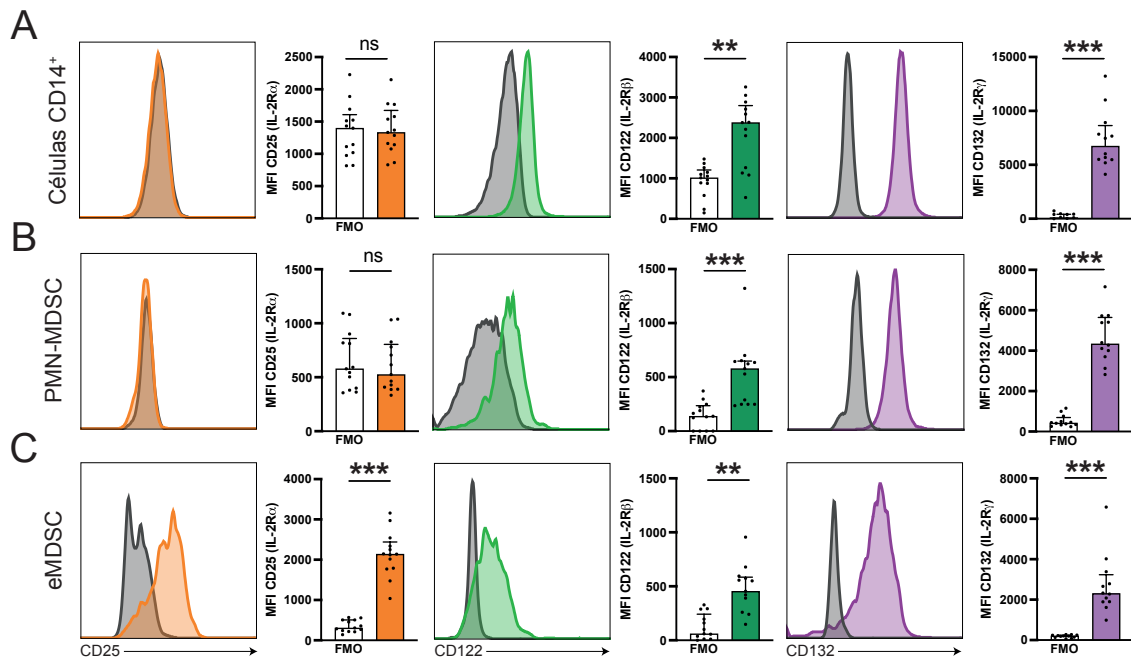


Figura 15. Expresión del receptor de IL-2 en eMDSC. Expresión de CD25 (IL-2R α , izquierda), CD122 (IL-2R β , centro) y CD132 (IL-2R γ , derecha) en (A) células CD14⁺ (monocitos y M-MDSC) (B) PMN-MDSC y (C) eMDSC representado como histograma y gráfico de barras. Para cada marcador se muestra un ejemplo representativo de citometría con la FMO en gris como control negativo. El conjunto de experimentos se muestra como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; FMO, *fluorescence minus one*; ns, no significativo

La unión de IL-2 a su receptor induce la activación de las quinasas Janus 1 y 3 (JAK, *Janus Kinases*), desencadenando diversas rutas de señalización intracelular: la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*), la vía de PI3K y la vía JAK1/3-STAT5A/B³⁸⁹⁻³⁹¹. Con el objetivo de comprobar si las tres cadenas, α , β y γ , expresadas en la superficie de las eMDSC, se asociaban para componer un receptor funcional, se evaluó la fosforilación de STAT5 mediante citometría de flujo tras la estimulación de las células mieloides con IL-2. Tras la adición de IL-2, se observó que la fosforilación de STAT5 en eMDSC aumentó significativamente con respecto a las células no estimuladas. Sin embargo, cuando las células se pre-incubaron con basiliximab antes de la adición de la IL-2, el porcentaje de eMDSC pSTAT5⁺ se redujo significativamente hasta niveles similares a los observados en ausencia de estimulación (**Figura 16A, B**). Esto indica que las eMDSC presentan un receptor funcional que responde a IL-2 y que basiliximab bloquea esta señalización.

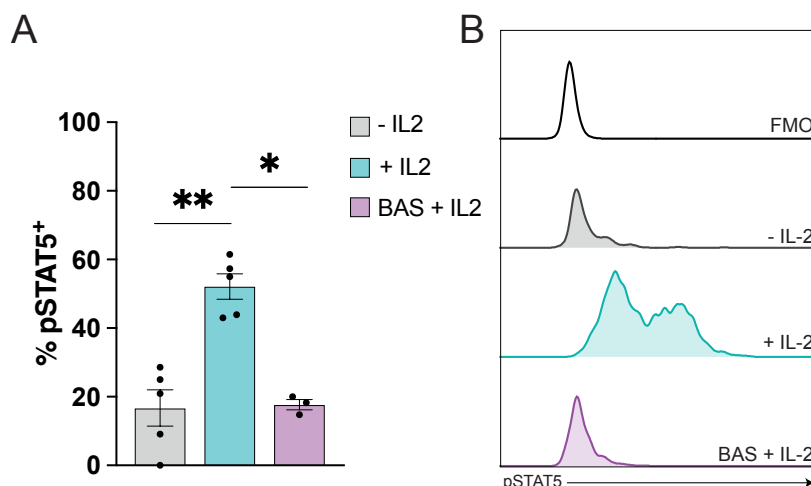


Figura 16. Funcionalidad del IL-2R. (A) Porcentaje de células eMDSC pSTAT5⁺ estimuladas con IL-2 y pretratadas con basiliximab (BAS + IL-2) (B) Ejemplo representativo de la fosforilación de STAT (pSTAT5). A se muestra como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. *, p<0,05; **, p<0,01.

1.3. Expresión de CD25 (IL2R- α) en eMDSC e impacto de eMDSC CD25⁺ en receptores de trasplante hepático

Tras confirmar la existencia de eMDSC CD25⁺ en trasplantados renales y su perfil pre- y post-trasplante, se planteó su análisis en RTH. Se compararon CS, RTR y RTH pre-trasplante. Tanto los niveles de eMDSC CD25⁺ como la expresión media de CD25 por célula fueron semejantes entre CS y RTR, pero significativamente superiores en RTH (**Figura 17A-C**). De los seis RTH incluidos, cinco fueron sometidos a un trasplante hepático como tratamiento para el HCC y el sexto, por presentar cirrosis alcohólica. Curiosamente, los RTH con HCC presentaron los mayores niveles de eMDSC CD25⁺ así como la mayor expresión de CD25 en las eMDSC mientras que el paciente con cirrosis alcohólica mostró los niveles más bajos (**Figura 17A, B**).

Además, en el seguimiento a los 7 y 14 días post-trasplante de los RTH, se observó un aumento significativo de las eMDSC CD25⁺. En comparación con los niveles pre-trasplante, a los 7 y 14 días post-trasplante casi el 100 % de las eMDSC eran CD25⁺ (**Figura 17D**). La expresión celular de CD25 también aumentó en el post-trasplante (**Figura 17E**).

Con estos antecedentes, decidimos estudiar las poblaciones de MDSC en pacientes con hepatocarcinoma.

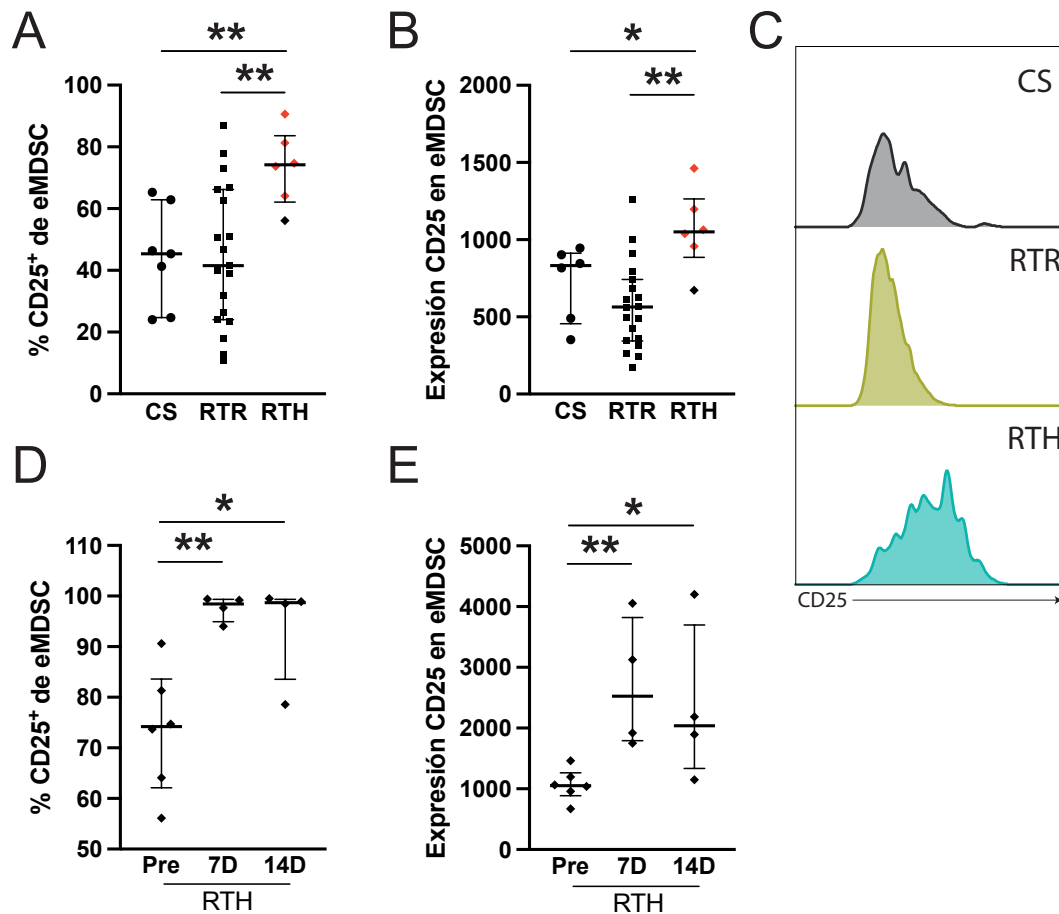


Figura 17. Las eMDSC CD25⁺ están presentes en RTH y aumentan post-trasplante. (A) Porcentaje de eMDSC CD25⁺, (B) expresión de CD25 en eMDSC y (C) ejemplo representativo de expresión de CD25 en CS, RTR y RTH (D) Porcentaje de eMDSC CD25⁺ y (E) expresión de CD25 en eMDSC durante el seguimiento post-trasplante de los RTH. En A y B los rombros rojos simbolizan pacientes que llegaron al trasplante hepático por HCC. Todos los parámetros se muestran como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon según correspondiera. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; Pre, pre-trasplante; 7d, 7 días post-trasplante; 14d, 14 días post-trasplante.

CAPÍTULO II:

Estudio de las subpoblaciones de MDSC en pacientes con hepatocarcinoma

Este capítulo ha sido publicado en:

Chivite-Lacaba, M., Justo, I., Utrero-Rico, A., Caso, O., González-Cuadrado, C., Del Rey, M. J., Laguna-Goya, R., Arroyo-Ródenas, J., Alfocea-Molina, Á., Ruigómez-Martín, C. C., Serrano, M., Pascual-Palacios, L., Mancebo, M. E., & Paz-Artal, E.

Delineation of monocytic and early-stage myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of patients with hepatocarcinoma.

Int J Cancer. 2025. Jun 15;156(12):2416-2428. doi: 10.1002/ijc.35390. PMID: 40052651

El estudio de las MDSC en el microambiente tumoral del hepatocarcinoma se ha llevado a cabo fundamentalmente en modelos de ratón siendo la información en humanos todavía limitada. En pacientes con HCC, las MDSC se acumulan tanto en sangre periférica como en el microambiente tumoral y se asocian a mayor progresión tumoral y peor supervivencia. Entre las poblaciones de MDSC, las M-MDSC son la subpoblación más ampliamente estudiada en este tipo tumoral. Se desconoce el papel de las PMN-MDSC y eMDSC.

En este capítulo, se han identificado y caracterizado las tres subpoblaciones principales de MDSC en pacientes con hepatocarcinoma y se ha evaluado su capacidad inmunosupresora *in vitro*, así como su asociación con la progresión tumoral.

2.1. Características clínicas de los pacientes con HCC

Nuestra cohorte incluyó a 22 pacientes con cáncer hepático reseccionado en el Hospital Universitario 12 de Octubre. Las principales características clínicas y demográficas se describen en la **Tabla 8**. La mediana de edad fue de 63 años y 19 pacientes (83,4 %) eran hombres. En cuanto a los factores de riesgo, el consumo de alcohol previo se registró en el 59 % de los casos, mientras que el 54,5 % presentaba hepatitis crónica, predominantemente por VHC. El índice de masa corporal (BMI, *body mass index*) mostró una mediana de 28. En relación con las comorbilidades, 8 pacientes (36,4 %) tenían diabetes *mellitus* y 7 (31,8 %) estaban en tratamiento con fármacos para la dislipemia. Respecto a la enfermedad hepática, 16 pacientes (72,7 %) tenían cirrosis, 3 (13,6 %) habían desarrollado encefalopatía hepática y 2 (9,1 %) descompensación edematoascítica. Los parámetros de laboratorio analizados – INR, bilirrubina, creatinina, albúmina y alfa-fetoproteína (aFP) – mostraban valores dentro del rango de normalidad.

El análisis histológico de los tumores reveló que 20 pacientes (90,9 %) presentaban hepatocarcinoma celular, siendo el subtipo moderadamente diferenciado el más frecuente, mientras que 2 pacientes (9,1 %) tenían hepatocolangiocarcinoma. En cuanto a la distribución nodular, 8 pacientes (36,4 %) tenían un solo nódulo, 7 (31,8 %) presentaban dos nódulos y otros 7 (31,8 %) más de tres. Solo un paciente presentó metástasis.

Atendiendo a los sistemas de estadificación, los pacientes incluidos en este estudio presentaban una enfermedad moderada clasificándose la mayoría de los pacientes como Clase A (86,4 %), dentro de la Clasificación de Child-Pugh, estadios A (68,2 %) o B (18,2 %), de acuerdo con el sistema BCLC y estadios I (40,9 %) o II (45,6 %) de acuerdo con TNM. Un paciente fue

clasificado como TNM 0, ya que, tras una respuesta completa a la radiofrecuencia, fue sometido a un trasplante hepático. En cuanto a los tratamientos previos, 7 pacientes (31,8 %) no habían recibido tratamiento antes de la resección, 9 (40,9 %) fueron tratados con ablación por radiofrecuencia, 9 (40,9 %) con QETA, 2 (9,1 %) con RETA y 4 (18,2 %) habían sido sometidos a cirugía previa. Durante el seguimiento, con un tiempo mínimo de tres años, 3 pacientes fallecieron (13,6 %), 2 de ellos (9,1 %) debido a recurrencia del HCC.

Tabla 8. Características de los pacientes con cáncer hepático (n=22)

Características demográficas	
Edad, mediana (IQR)	63 (58 – 67)
Sexo, hombre, n (%)	19 (86,4 %)
Factores de riesgo	
Tabaquismo activo, n (%)	7 (31,8 %)
Consumo alcohol, n (%)	13 (59 %)
BMI, mediana (IQR)	28 (24,25 – 30)
Hepatitis ¹ , n (%)	12 (54,5 %)
VHB	3 (13,6 %)
VHC	10 (45,5 %)
Diabetes <i>mellitus</i> , n (%)	8 (36,4 %)
Tipo 1	1 (4,6 %)
Tipo 2	7 (31,8 %)
Fármacos anti-dislipidemia, n (%)	7 (31,8 %)
Atorvastatina	4 (18,2 %)
Simvastatina	1 (4,6 %)
Gemfibrozilo	2 (9,1 %)
Enfermedad hepática	
Cirrosis, n (%)	16 (72,7 %)
Encefalopatía hepática, n (%)	3 (13,6 %)
Descompensación edematoascítica, n (%)	2 (9,1 %)
Parámetros de laboratorio el día de la muestra²	
INR, mediana (IQR)	1,11 (1,032 – 1,177)
Bilirrubina, mg/dL, mediana (IQR)	0,6 (0,42 – 0,98)
Creatinina, mg/dL, mediana (IQR)	0,98 (0,83 – 1,09)
Albumina, g/dL, mediana (IQR)	4,5 (4,1 – 4,7)
Alfa-fetoproteína, ng/mL, mediana (IQR)	3,71 (2,78 – 17,53)
Análisis histológico	
HCC pobremente diferenciado, n (%)	4 (18,2 %)
HCC moderadamente diferenciado, n (%)	11 (50 %)
HCC bien diferenciado, n (%)	5 (22,7 %)
Hepatocolangiocarcinoma (CCA), n (%)	2 (9,1 %)

Progresión Tumoral	
Tumores sincrónicos	1 (4,6 %)
Número de nódulos, n (%)	
1	8 (36,4 %)
2	7 (31,8 %)
≥ 3	7 (31,8 %)
Microinvasión vascular	2 (9,1 %)
Metástasis	1 (4,6 %)
Clasificación	
Clase Child-Pugh, n (%)	
A	19 (86,4 %)
B	2 (9,1 %)
C	1 (4,6 %)
Estadio BCLC, n (%)	
0	2 (9,1 %)
A	15 (68,2 %)
A/B	4 (18,2 %)
C	1 (4,6 %)
TNM	
0	1 (4,6 %)
I	9 (40,9 %)
II	10 (45,6 %)
III	2 (9,1 %)
Tratamientos previos³	
No	7 (31,8 %)
Ablación por radiofrecuencia	9 (40,9 %)
Quimioembolización transarterial (QETA)	9 (40,9 %)
Radioembolización transarterial (RETA)	2 (9,1 %)
Cirugía	4 (18,2 %)
Tipo de Trasplante, n (%)	
Hepático	17 (77,2 %)
Hepatorrenal	1 (4,6 %)
Seguimiento	
Recurrencia Tumoral	2 (9,1 %)
Exitus	3 (13,6 %)

IQR, rango intercuartílico; BMI, índice masa corporal; INR, Ratio internacional normalizado, *international normalised ratio*.

¹Un paciente tenía tanto VHB como VHC

²Valores normales en la población de referencia: INR [0,80-1,20], Bilirrubina [0,20-1 mg/dL], Creatinina [0,50-0,90 mg/dL], Albumina [3,5-5,0 g/dL], Alfa-fetoproteína [\leq 7 ng/mL]

³Los pacientes pueden presentar más de un tratamiento previo

2.2. Expansión de MDSC en HCC

Para el estudio de las MDSC en pacientes con HCC evaluamos cuatro poblaciones mieloides (**Figura 9**): monocitos ($CD33^+CD11b^+CD14^+CD15^-HLA-DR^{+hi}$), M-MDSC ($CD33^+CD11b^+CD14^+CD15^-HLA-DR^{-low}$), PMN-MDSC ($CD33^+CD11b^+CD14^-CD15^+HLA-DR^-$) y eMDSC ($CD33^+CD11b^+CD14^-CD15^-HLA-DR^-$). Estas poblaciones se identificaron en la sangre periférica de CS y pacientes con HCC antes de la cirugía. Las tres subpoblaciones de MDSC: M-MDSC, PMN-MDSC y eMDSC, estaban significativamente aumentadas en pacientes con HCC en comparación con los CS (**Figura 18A-C**). Asimismo, los pacientes con HCC tenían mayores niveles de eMDSC $CD25^+$ (**Figura 18D**). Por el contrario, los niveles de monocitos eran inferiores en los pacientes con HCC (**Figura 18E**). Como consecuencia de esta expansión de MDSC, la distribución del compartimento mielode difería entre CS y HCC, con una sobrerrepresentación de las M-MDSC y eMDSC en los pacientes con HCC (**Figura 18F**).

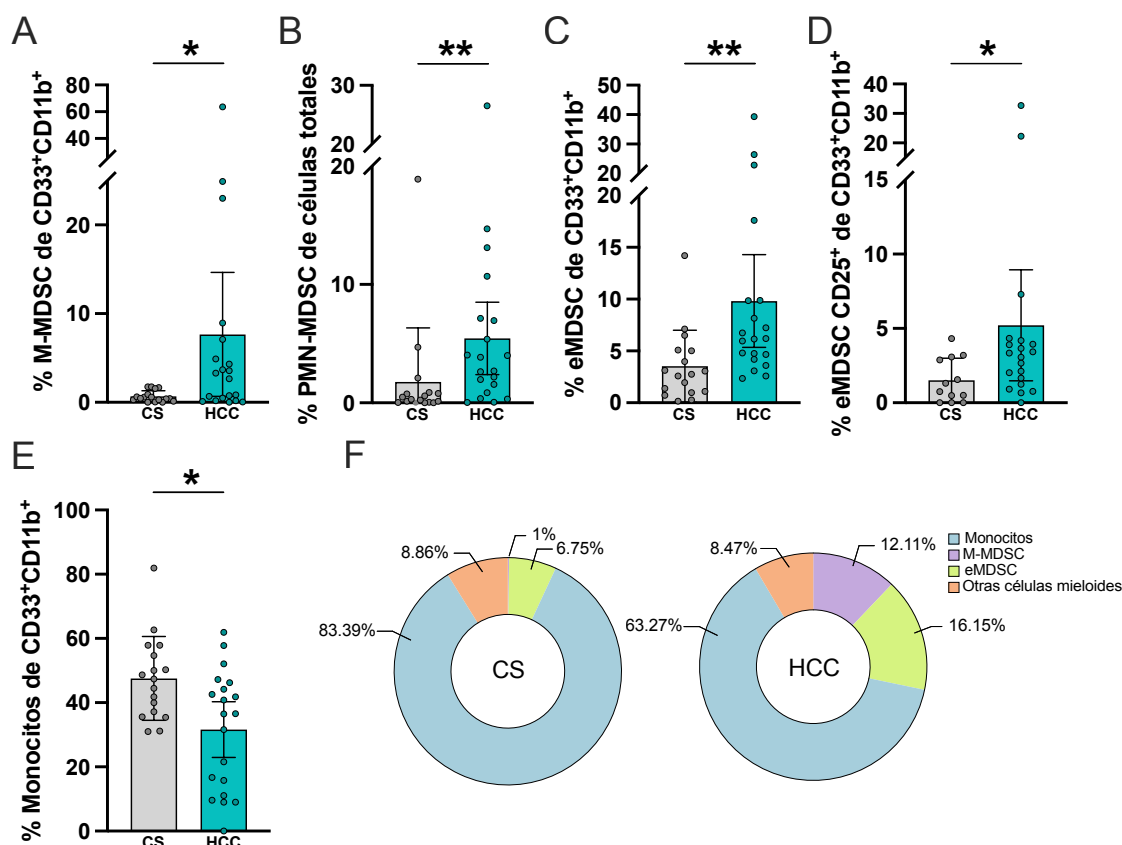


Figura 18. Las MDSC se expanden en pacientes con HCC. (A) Porcentaje de M-MDSC, (B) PMN-MDSC, (C) eMDSC, (D) eMDSC $CD25^+$ y (E) monocitos en controles sanos (CS) y pacientes con hepatocarcinoma (HCC). (F) Distribución de las poblaciones de monocitos, M-MDSC y eMDSC en CS y HCC. A-E muestran la mediana y el rango intercuartílico. F muestra la media. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney. *, $p < 0.05$.

En concordancia con estos resultados se encontró que la actividad Arg-1 sérica y los niveles de IL-10 circulantes, moléculas relacionadas con la funcionalidad inmunosupresora de las MDSC, eran significativamente superiores en pacientes con HCC que en CS (**Figura 19A, B**). Por el contrario no hubo diferencias en los niveles de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ , IL-6 o TNF- α circulantes (**Figura 19C, D**).

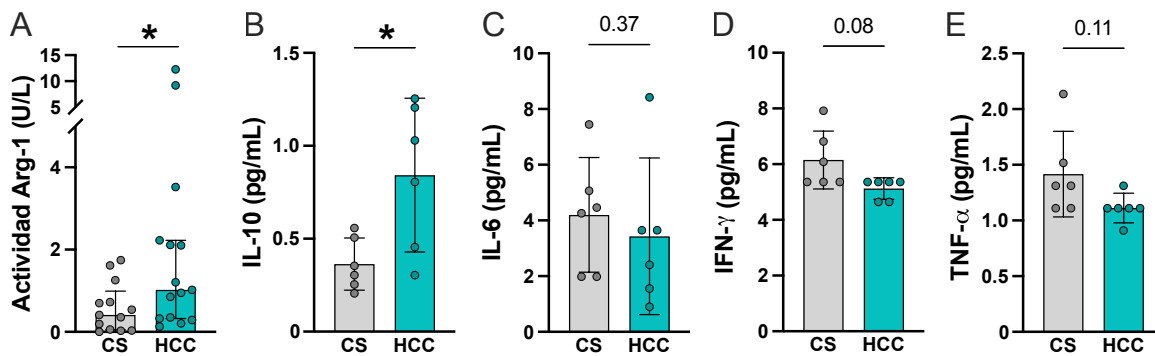


Figura 19. Marcadores solubles de inmunosupresión en los pacientes con HCC. (A) Actividad Arginasa-1 (Arg-1) en controles sanos (CS) y pacientes con hepatocarcinoma (HCC). (B) Niveles circulantes de IL-10, (C) IL-6, (D) IFN- γ y (E) TNF- α . Todos los parámetros se muestran como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney. *, $p < 0.05$.

2.3. Los pacientes con HCC presentan mayor ambiente inmunosupresor

Para comprender mejor la contribución de los parámetros relacionados con las células mieloides en la caracterización de los pacientes con cáncer de hígado, realizamos un PCA. Este análisis consistió en una reducción a dos dimensiones basada en los siguientes parámetros: monocitos, M-MDSC, PMN-MDSC, eMDSC, eMDSC CD25⁺, expresión de HLA-DR en células CD14⁺ y expresión de CD25 en eMDSC.

El gráfico de dos dimensiones del PCA mostró que las dimensiones 1 y 2 explicaban el 38.2 % y el 25.9 % de la variabilidad entre los sujetos analizados, respectivamente. El análisis permitió separar a los CS de los pacientes con HCC en grupos diferenciados en la dimensión 1. De igual forma, el PCA también discriminó entre los pacientes con HCC y aquellos con CCA (**Figura 20A**). Los parámetros con mayor contribución en la dimensión 1 fueron los monocitos, la expresión de HLA-DR en células CD14⁺ y las M-MDSC. Además, los HCC y CCA también se

diferenciaban en la dimensión 2, influenciada principalmente por las eMDSC CD25⁺ así como por la expresión de CD25 en las eMDSC (Figura 20B).

La representación gráfica de esta reducción dimensional sugiere visualmente que el perfil inmunosupresor asociado a las MDSC es más prevalente en pacientes con HCC que en aquellos con CCA.

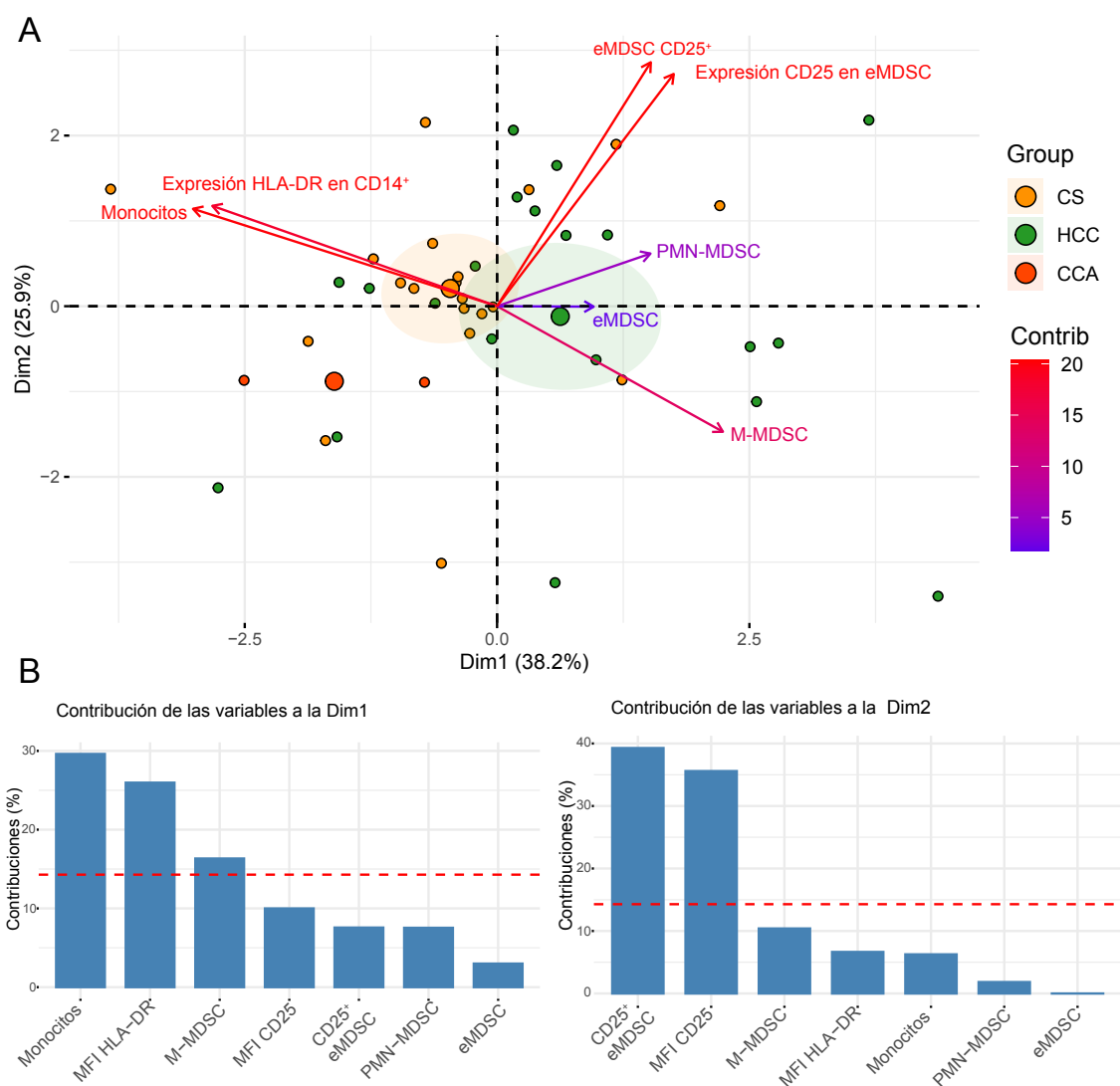


Figura 20. Caracterización de los pacientes con cáncer hepático en función de las poblaciones mieloides. (A) Análisis de componentes principales (PCA) de las poblaciones mieloides y parámetros asociados en controles sanos (CS), pacientes con hepatocarcinoma (HCC) y colangiocarcinoma (CCA) (B) Contribución de cada parámetro a las dimensiones 1 y 2 del PCA. En A cada punto pequeño representa una muestra, los puntos grandes representan la mediana de cada grupo y la elipse sombreada es el intervalo de confianza al 95 %. En B los parámetros por encima de la línea roja discontinua se consideran de relevancia en cuanto a su contribución a cada dimensión.

2.4. Capacidad inmunosupresora de las MDSC *in vitro*

Con el objetivo de confirmar que las células identificadas fenotípicamente por citometría de flujo eran verdaderas MDSC, y siguiendo las recomendaciones de expertos⁶⁷, se evaluó su capacidad inmunosupresora *in vitro*. Para ello, células mieloides CD33⁺ aisladas tanto de CS como de pacientes con HCC fueron co-cultivadas con células autólogas CD33⁻ previamente marcadas con CFSE, permitiendo evaluar la proliferación de los linfocitos T. Para calcular el porcentaje de inhibición, la proliferación del co-cultivo con una proporción 1:1 se relativizó con respecto al control positivo, de manera que valores positivos reflejaban supresión de la proliferación.

En primer lugar, se verificó que la proliferación *in vitro* de los linfocitos T estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 en ausencia de células mieloides era similar entre los CS y los pacientes con HCC (**Figura 21A, B**). El compartimento mieloides de los CS, compuesto mayoritariamente por monocitos (**Figura 21C**), favorecía la proliferación *in vitro* de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (**Figura 21A, D**), mientras que, las células mieloides de los pacientes con HCC, enriquecidas en CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-low} (M-MDSC) y CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁻HLA-DR⁻ (eMDSC), inhibían la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (**Figura 21B, D**).

Adicionalmente, se cuantificaron ocho citoquinas: IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-21, GM-CSF, IL-6 y TNF- α , en los sobrenadantes de los cultivos de los pacientes con HCC mediante un panel de Luminex. En relación con las citoquinas asociadas a la función de los linfocitos T se observó que, aunque no alcanzaba significación estadística, la supresión de la proliferación estaba acompañada de una reducción en la producción de IL-2 y un aumento de IL-10. No se detectaron diferencias en IFN- γ , IL-4 e IL-21. En lo que respecta a las citoquinas relacionadas con la función de las células mieloides, tanto IL-6 como TNF- α aumentaron tras la adición de células mieloides al co-cultivo, mientras que GM-CSF no mostró cambios (**Figura 21E**).

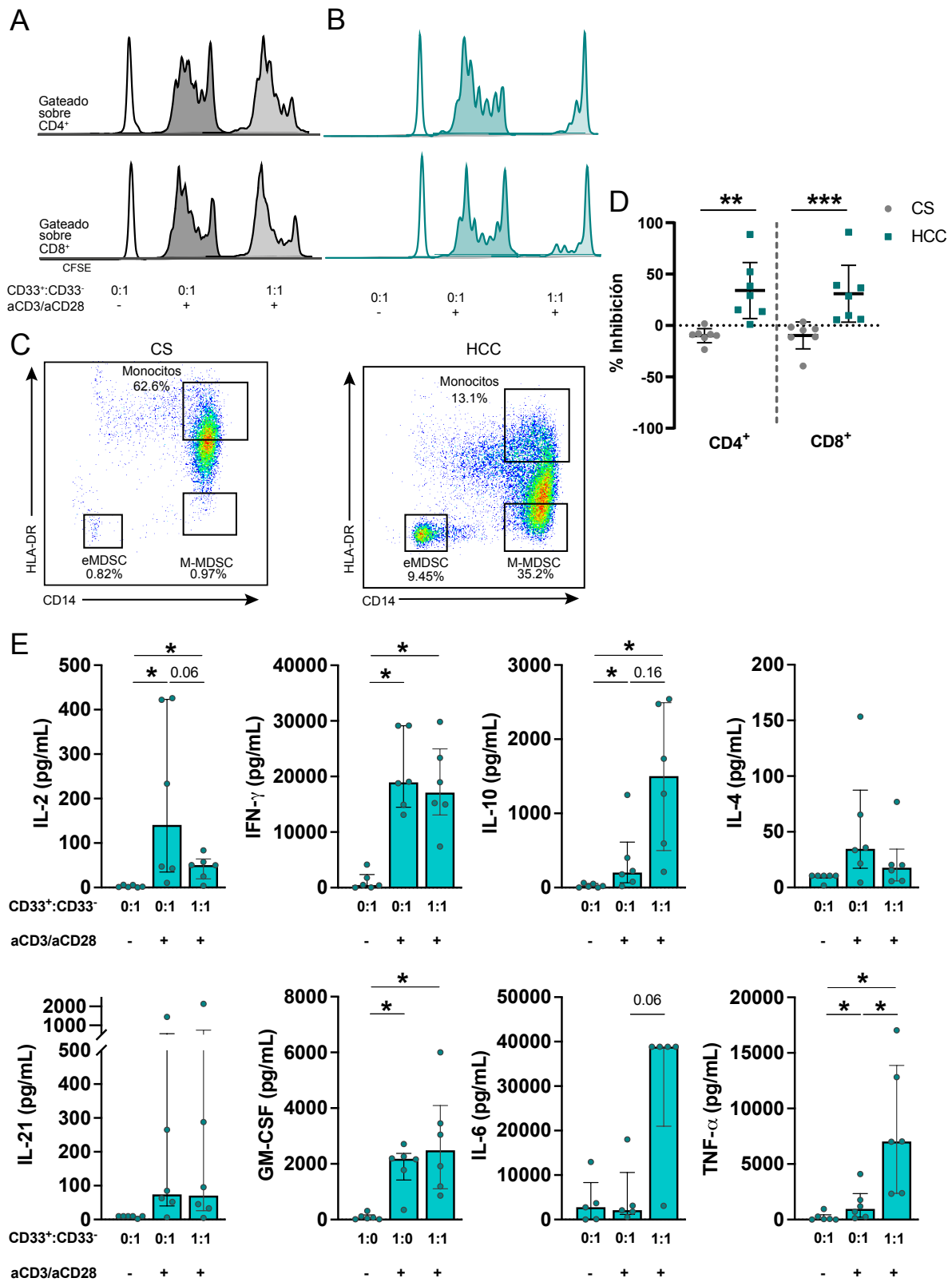


Figura 21. MDSC aisladas de pacientes con HCC inhiben la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. (A) Proliferación representativa de células CD33⁻ marcadas con CFSE co-cultivadas *ex vivo* con células mieloides CD33⁺ aisladas de CS (B) o pacientes con HCC (C) Ejemplo representativo del compartimento mieloides de un CS (izquierda) y paciente con HCC (derecha) (D) Porcentaje de inhibición de la proliferación (proliferación control positivo – proliferación co-cultivo a ratio 1:1) de linfocitos T

CD4⁺ y CD8⁺ en co-cultivos con células mieloides de CS o HCC (E) Niveles de IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-21, GM-CSF, IL-6 y TNF- α producidos *in vitro* en el ensayo de inmunosupresión de pacientes con HCC. D y E muestran la mediana y el rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon según correspondiera. *, p<0.05; **, p<0,01; ***, p<0,001; aCD3, anti-CD3; aCD28, anti-CD28.

2.5. Mayor capacidad supresora asociada a M-MDSC

Tras confirmar la capacidad supresora de las MDSC, evaluamos si la inhibición de la proliferación de los linfocitos T se asociaba con una subpoblación o fenotipo concreto dentro de las poblaciones mieloides estudiadas (**Figura 22**). Como era de esperar, la inhibición de los linfocitos T CD4⁺ correlacionaba directamente con la de los linfocitos T CD8⁺. En cuanto a las MDSC, encontramos una correlación directa significativa entre el porcentaje de M-MDSC y la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺, así como una correlación casi significativa con la inhibición de los linfocitos T CD8⁺ (p=0,06). La correlación entre la inhibición de la proliferación linfocitaria y las PMN-MDSC fue más débil, mientras que con las eMDSC fue la más baja e incluso inversa en el caso de las células T CD8⁺. La ratio M-MDSC/eMDSC también mostró una correlación directa significativa con la supresión de la proliferación tanto de linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺. Igualmente, la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ como de CD8⁺ se correlacionaron inversamente con la proporción de monocitos y con la expresión por célula de HLA-DR en las células CD14⁺. Curiosamente, la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ mostró una correlación inversa significativa con la expresión de CD25 en las eMDSC, es decir, a más expresión de CD25 en las eMDSC, más proliferación linfocitaria. Sin embargo, la expresión por célula de CD25 en las eMDSC se correlacionó directamente con factores activadores de linfocitos T, como la proporción de monocitos y su expresión superficial de HLA-DR. Por último se encontraron correlaciones inversas entre la expresión de CD25 en eMDSC y M-MDSC y la relación M-MDSC/eMDSC. En conjunto, estos datos sugieren que la expansión del compartimento mieloidesupresor de la inmunidad adaptativa en el HCC está impulsada principalmente por las M-MDSC.

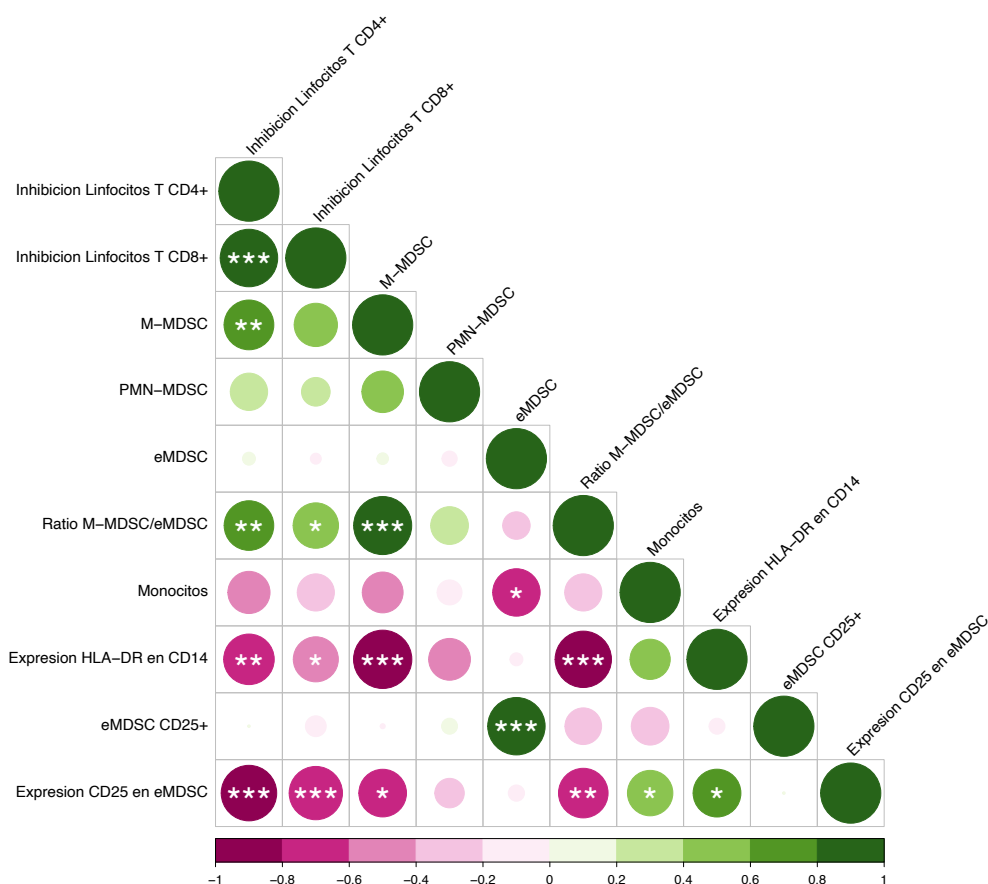


Figura 22. Análisis de correlación de la inhibición de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y las poblaciones y parámetros mieloides. Las correlaciones directas aparecen en verde y las inversas en rosa. El tamaño y el gradiente de color de los círculos representan la magnitud de la correlación. Los asteriscos representan la significación estadística. Las correlaciones se evaluaron con el coeficiente de correlación de Spearman. *, p<0.05; **, p< 0.01; ***, p<0.001.

2.6. El HCC avanzado se asocia con las subpoblaciones de M-MDSC y eMDSC

Finalmente, tras confirmar *in vitro* la capacidad supresora de las MDSC y dada la variabilidad interindividual observada, se analizó si las características clínicas de los pacientes con HCC se asociaban con niveles elevados de MDSC y con una mayor capacidad supresora.

Los pacientes con diabetes *mellitus* tipo I o tipo II presentaron niveles significativamente más altos de M-MDSC en comparación con aquellos sin diabetes, sin encontrarse diferencias para las subpoblaciones de PMN-MDSC, eMDSC, eMDSC CD25⁺ ni monocitos o la actividad Arg-1 (**Figura 23A**). En cuanto a la hepatitis viral (VHB o VHC), no se detectaron diferencias en comparación con pacientes sin hepatitis para la mayoría de las poblaciones mieloides, con

excepción de las PMN-MDSC, cuyos niveles fueron significativamente más elevados en los pacientes infectados (**Figura 23B**). En el contexto de enfermedad hepática, todas las poblaciones de MDSC se encontraron aumentadas en pacientes con HCC y cirrosis en comparación con aquellos sin cirrosis, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística (**Figura 23C**).

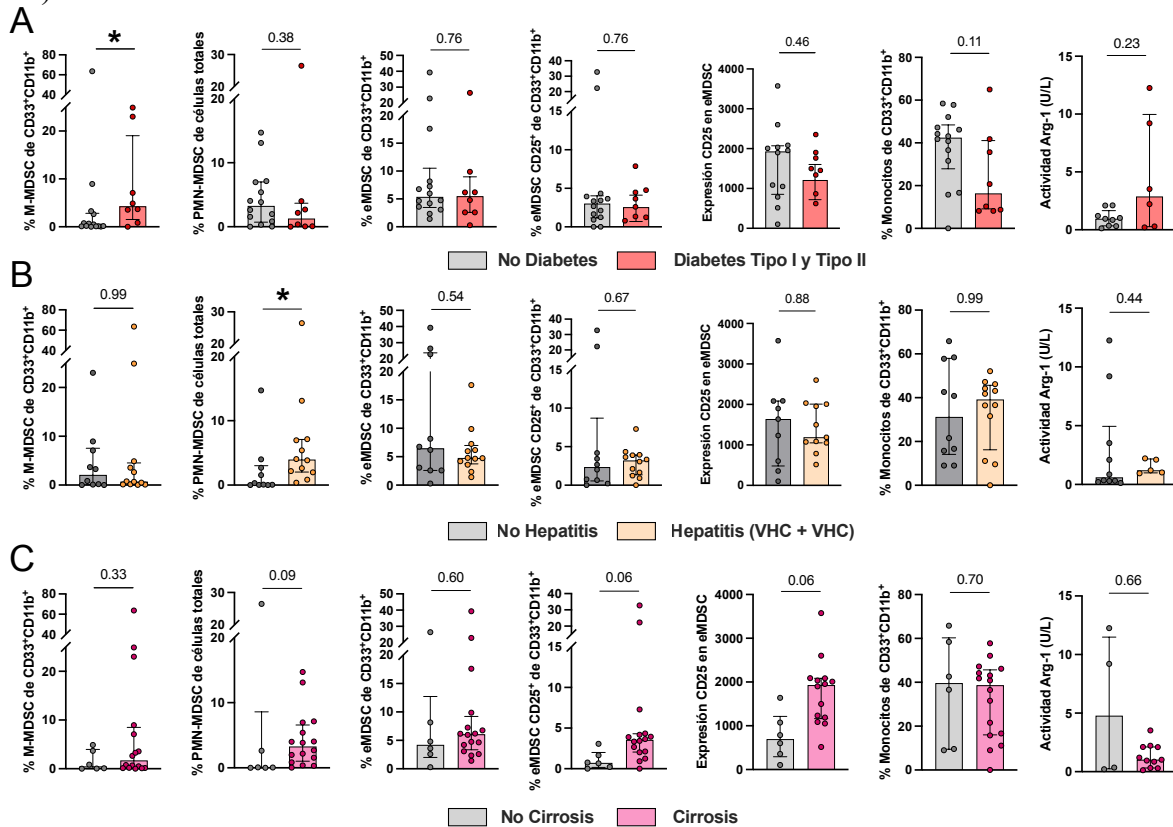


Figura 23. Relación entre MDSC y actividad Arg-1 y diabetes, hepatitis y cirrosis en pacientes con HCC. (A) Porcentaje de M-MDSC, PMN-MDSC, eMDSC, eMDSC CD25⁺, expresión de CD25 en eMDSC, porcentaje de monocitos y actividad Arg-1 en pacientes con HCC con o sin diabetes, (B) con o sin hepatitis y (C) con o sin cirrosis. Los parámetros se muestran como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney. *, p<0.05.

Respecto a variables relacionadas con la progresión tumoral, los pacientes con más de dos nódulos hepáticos presentaron niveles significativamente más altos de eMDSC y eMDSC CD25⁺ en comparación con aquellos con dos o menos nódulos. Aunque sin alcanzar la significación, la expresión de CD25 en las eMDSC también mostró una tendencia al alza en los pacientes con mayor número de nódulos tumorales. No se observaron diferencias en las poblaciones de M-MDSC, PMN-MDSC ni monocitos (**Figura 24A**). Tanto los niveles de eMDSC CD25⁺ como la expresión de CD25 por célula correlacionaron directamente con el número de nódulos (**Figura 24B**). El PCA permitió discriminar a los pacientes según el número de nódulos, separando dos grupos principalmente en la dimensión 2 (**Figura 24C**), influida por los niveles de eMDSC CD25⁺ y la expresión de CD25 en eMDSC (**Figura 20B**).

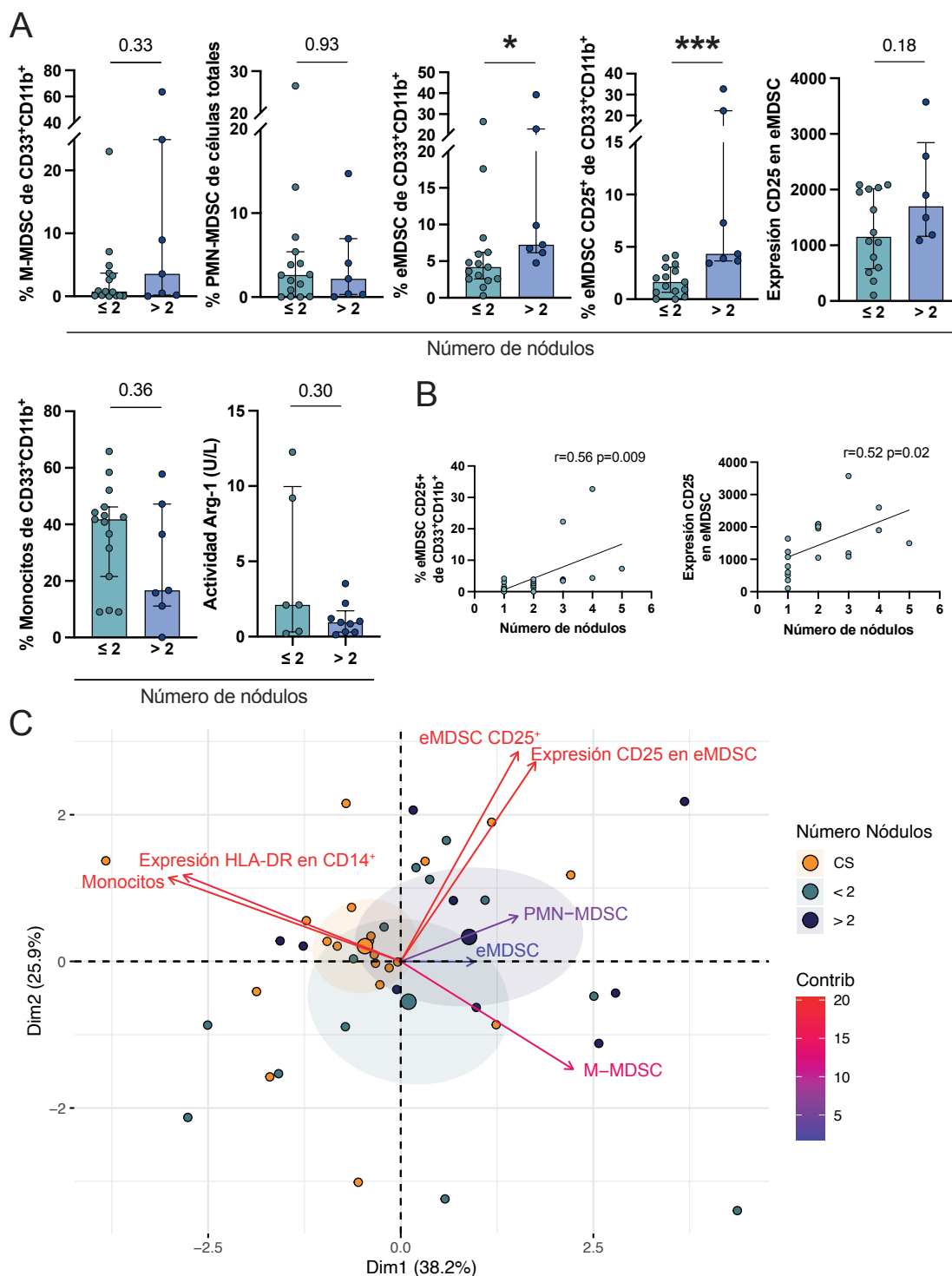


Figura 24. Niveles de MDSC en pacientes con HCC según el número de nódulos tumorales. (A) Porcentaje de M-MDSC, PMN-MDSC, eMDSC, eMDSC CD25⁺, expresión de CD25 en eMDSC, porcentaje de monocitos y actividad Arg-1 sérica en pacientes con HCC clasificados de acuerdo con el número de nódulos presentes en el tumor. (B) Correlación entre el número de nódulos y los niveles de eMDSC CD25⁺ (izquierda) y la expresión de CD25 en eMDSC (derecha). (C) PCA de poblaciones mieloides en pacientes con HCC agrupados de acuerdo con el número de nódulos. Las comparaciones se muestran como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney. Las correlaciones se evaluaron con el coeficiente de correlación de Spearman. *, p<0.05; ***, p<0.001

De forma similar, los pacientes en estadios TNM II/III (T2N0M0 o T3N0M0) presentaron niveles significativamente más elevados de M-MDSC, eMDSC y eMDSC CD25⁺ en comparación con los pacientes en estadios TNM menos avanzados (0/I, T1N0M0), mientras que no se observaron diferencias en la distribución de PMN-MDSC, monocitos ni en la actividad Arg-1 sérica (**Figura 25A**). La estratificación en función de la mediana del porcentaje de M-MDSC (% M-MDSC = 2,66 %) mostró una mayor proporción de pacientes con HCC en estadio II/III en el grupo con un porcentaje de M-MDSC alto. Concretamente, 9 de los 11 pacientes (81,2%) del grupo de % M-MDSC > 2,66 % se encontraban en estadio II/III, mientras que solo 3 de los 11 (27,3 %) pacientes con % M-MDSC bajo pertenecían a estos estadios, evidenciando una distribución desigual entre los grupos (81,2 % vs. 27,3 %, p=0,03). (**Figura 25B**). El PCA también permitió diferenciar a los pacientes según el estadio TNM, con una separación más clara en la dimensión 1 (**Figura 25C**), determinada principalmente por los niveles de monocitos, M-MDSC y la expresión de HLA-DR (**Figura 20B**).

El marcador tumoral aFP se midió en los pacientes con HCC y se empleó en la clasificación de estos en aFP alto y bajo, en función de valor de normalidad establecido en nuestro hospital (7 ng/mL). Los pacientes con niveles de aFP elevados (≥ 7 ng/mL) presentaron niveles significativamente más altos de M-MDSC, mientras que las PMN-MDSC, eMDSC y la actividad Arg-1 no variaron en función de este marcador. La proporción de eMDSC CD25⁺ mostró una tendencia a ser mayor en los pacientes con aFP alta, y la expresión de CD25 en eMDSC sí fue significativamente superior en este grupo (**Figura 26A**) y correlacionó directamente con la concentración sérica de aFP (**Figura 26B**). El PCA definió dos clústeres discretos separados tanto en la dimensión 1, influenciada por monocitos, M-MDSC y la expresión de HLA-DR en monocitos, como en la dimensión 2, en la que las eMDSC CD25⁺ y la expresión de CD25 en eMDSC eran las principales contribuyentes (**Figura 26B**, **Figura 20B**).

Las relaciones entre otras variables clínicas y las poblaciones mieloides se resumen en la **Tabla 9**. No se encontraron diferencias relevantes en las subpoblaciones de MDSC en la mayoría de las variables, salvo por niveles significativamente más altos de eMDSC y eMDSC CD25⁺ en pacientes con encefalopatía hepática o microinvasión vascular. Aunque no se encontraron diferencias según el análisis histológico, los pacientes con HCC tendieron a presentar niveles más altos de M-MDSC y eMDSC en comparación con aquellos con CCA.

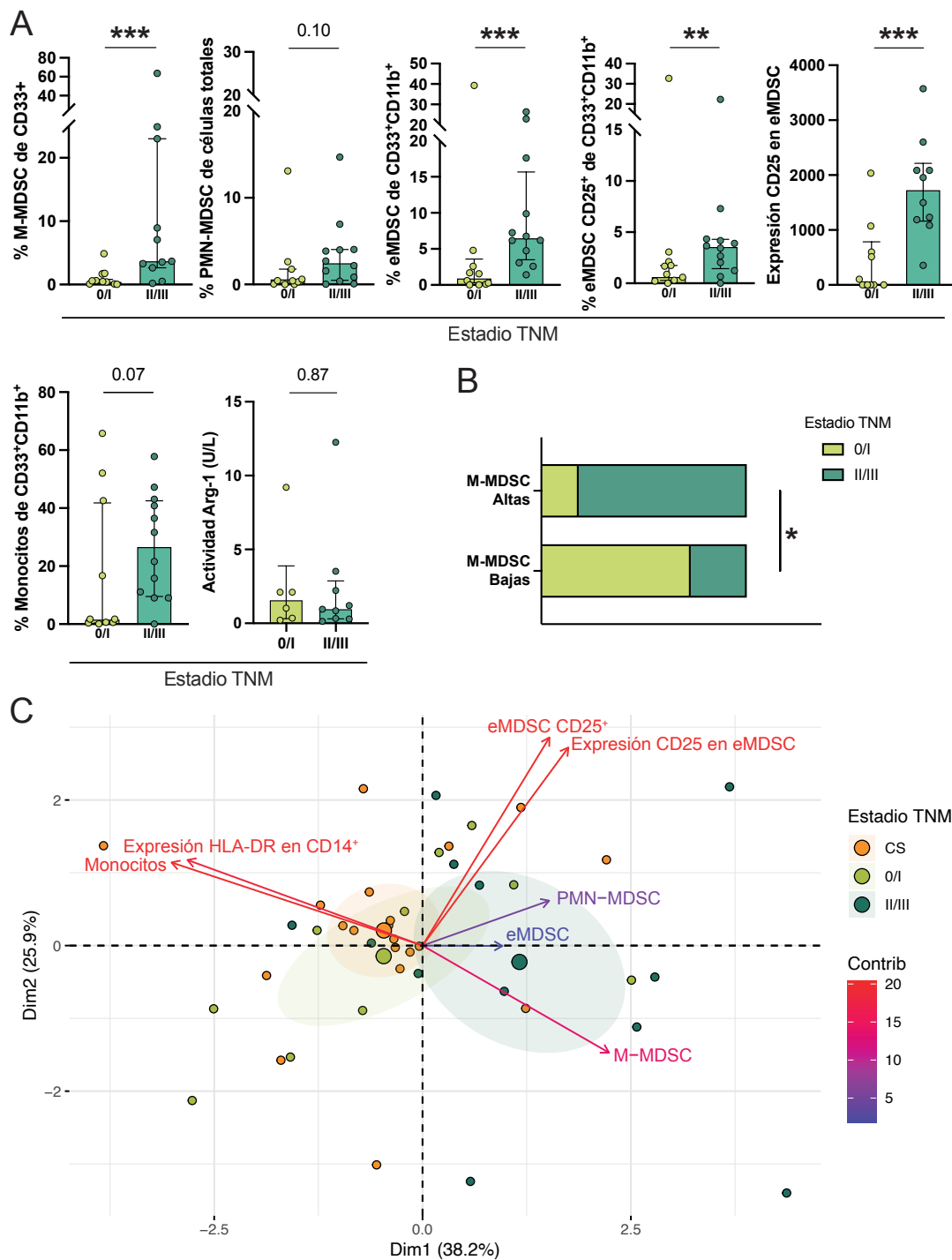


Figura 25. Niveles de MDSC en pacientes con HCC según el estadio TNM. (A) Porcentaje de M-MDSC, PMN-MDSC, eMDSC, eMDSC CD25⁺, expresión de CD25 en eMDSC, porcentaje de monocitos y actividad Arg-1 sérica en pacientes con HCC clasificados de acuerdo con el estadio TNM (B) Distribución del estadio TNM de los pacientes clasificados en función de los niveles de M-MDSC (bajo M-MDSC ≤ 2.66 %, alto M-MDSC > 2.66 %). (C) PCA de poblaciones mieloides en pacientes con HCC agrupados de acuerdo con el estadio TNM. Las comparaciones se muestran como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney y las diferencias en la distribución se determinaron con la prueba exacta de Fisher. *, p<0.05; **, p< 0.01; ***, p<0.001

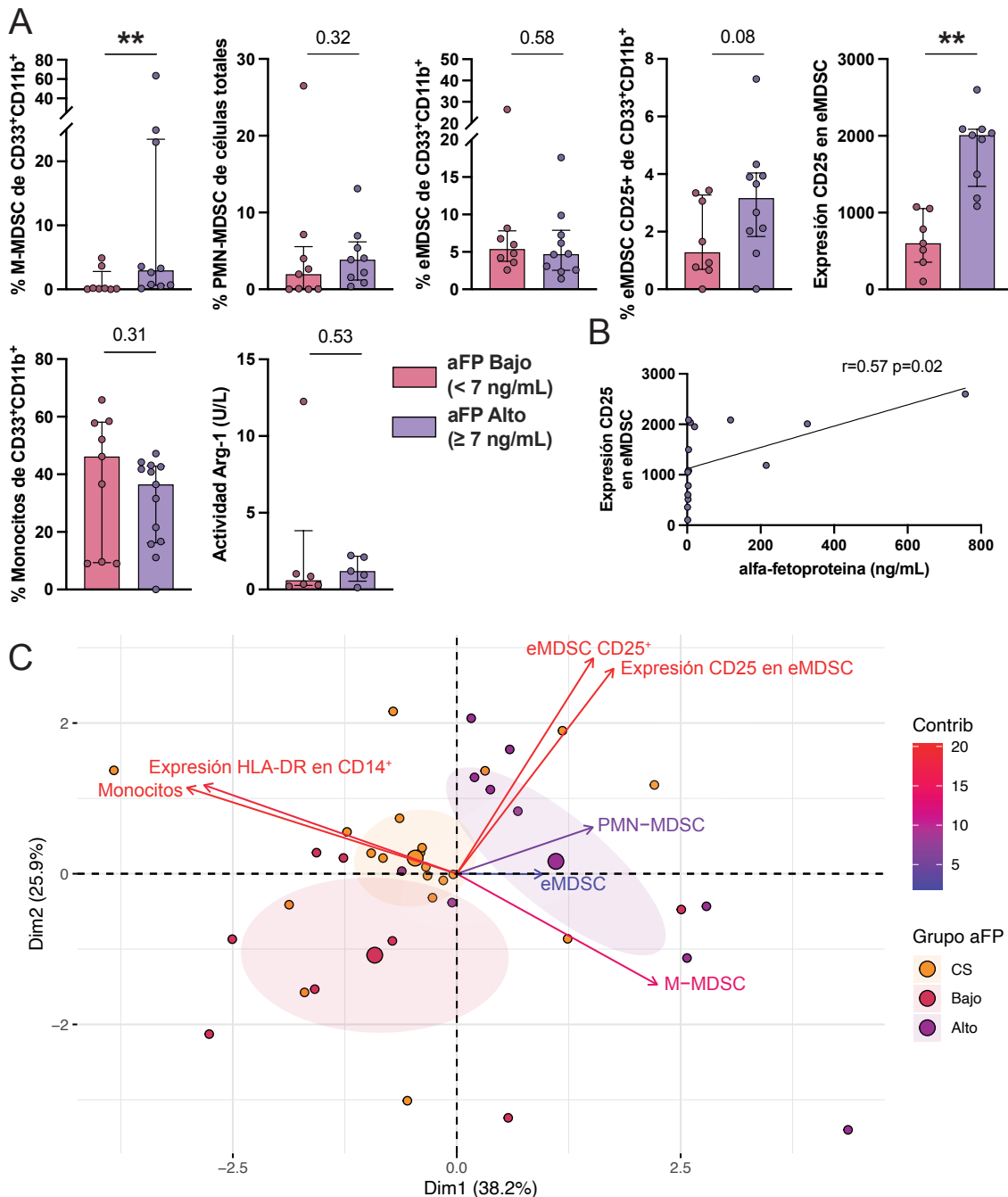


Figura 26. Niveles de MDSC en pacientes con HCC con altos niveles de alfa-fetoproteína (aFP). (A) Porcentaje de M-MDSC, PMN-MDSC, eMDSC, eMDSC CD25⁺, expresión de CD25 en eMDSC, porcentaje de monocitos y actividad Arg-1 sérica en pacientes con HCC clasificados de acuerdo con los niveles de aFP (bajo aFP, aFP < 7 ng/mL; alto aFP, aFP > 7 ng/mL). (B) Correlación entre la concentración sérica de aFP y la expresión de CD25 en eMDSC. (C) PCA de poblaciones mieloides en pacientes con HCC agrupados de acuerdo con los niveles de aFP. Las comparaciones se muestran como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney. Las correlaciones se evaluaron con el coeficiente de correlación de Spearman. **, $p < 0.01$.

Tabla 9. Poblaciones mieloides y características clínicas de los pacientes con HCC

	M-MDSC		PMN-MDSC		Monocitos	
Tabaquismo activo						
No (n=7)	0,5 (0,2 – 3,8)	0,7	3,9 (2,3 – 4)	0,3	36,6 (20,6 – 44,7)	0,8
Si (n=15)	0,8 (0,1 – 5,4)		1,6 (0,1 – 6,2)		40,8 (16,3 – 48,2)	
Consumo de alcohol						
No (n=9)	0,5 (0,1 – 2,7)	0,3	2,6 (0,9 – 4)	0,9	42,6 (31,6 – 47,2)	0,3
Si (n=13)	3,3 (0,2 – 9)		2,2 (0,3 – 5,4)		36,5 (11,1 – 43,1)	
Fármacos anti-dislipidemia						
No (n=15)	0,8 (0,2 – 6,3)	0,9	2,2 (0,6 – 6,2)	0,8	40,8 (16,3 – 45,2)	0,9
Estatinas (n=5)	0,8 (0,5 – 3,7)		0,1 (0,06 – 4)		42,6 (9,6 – 47,2)	
Gemfibrozilo (n=2)	3,6 (1,8 – 5,3)		2,67 (2,64 – 2,68)		29,1 (25,4 – 32,9)	
Encefalopatía hepática						
No (n=19)	0,8 (0,2 – 4,3)	0,6	2,6 (0,6 – 4,72)	0,7	40,8 (16,35 – 45,2)	0,9
Si (n=3)	0,2 (0,1 – 4,6)		0,3 (0,2 – 7,5)		16,7 (16,3 – 37,3)	
Descompensación Edematoascítica						
No (n=20)	0,7 (0,1 – 5,4)	0,6	2,7 (0,3 – 5,8)	0,4	41,3 (14,6 – 46,5)	0,7
Si (n=2)	3,1 (2,9 – 3,3)		0,6 (0,5 – 0,7)		34,1 (32,8 – 35,3)	
Análisis histológico¹						
Pobre (n=4)	2 (0,6 – 8,2)	0,09	3,9 (3,3 – 6,3)	0,6	41,3 (32,9 – 42,1)	0,6
Moderado (n=11)	3,6 (0,4 – 6,92)		2 (0,2 – 6,2)		31,6 (10,4 – 45,2)	
Bien (n=5)	0,5 (0,1 – 0,8)		2,7 (0,3 – 4)		42,6 (21,6 – 47,2)	
CCA (n=2)	0,02 (0,01 – 0,03)		1,3 (0,66 – 2)		51,2 (43,9 – 58,5)	
Microinvasión vascular						
No (n=20)	0,7 (0,1 – 3,9)	0,2	2,4 (0,4 – 4,4)	0,8	41,3 (20,4 – 46,5)	0,1
Si (n=2)	6,3 (5 – 7,6)		7,4 (3,7 – 11)		12,4 (10,7 – 14,1)	
Metastasis						
No (n=21)	0,8 (0,1 – 4,9)	0,8	2,6 (0,3 – 5,4)	0,8	36,6 (15,8 – 46,2)	1
Si (n=1)	3,3 (-)		1,6 (-)		40,8 (-)	
Clase Child-Pugh						
A (n=19)	0,8 (0,2 – 4,3)	0,2	3,6 (0,6 – 4,7)	0,7	40,8 (16,4 – 45,2)	0,7
B (n=2)	4,6 (2,4 – 6,8)		7,4 (3,7 – 11)		36,8 (26,3 – 47,3)	
C (n=1)	0,2 (-)		0,3 (-)		16,7 (-)	
Estadio BCLC						
A (n=17)	0,8 (0,1 – 7)	0,9	2,6 (0,3 – 5,4)	0,9	36,6 (15,8 – 44,2)	1
B (n=4)	1,6 (0,4 – 2,9)		2,4 (0,7 – 4,8)		39,4 (25,6 – 48,4)	
C (n=1)	3,3 (-)		1,6 (-)		40,8 (-)	

Los datos se representan como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney para comparar variables con dos factores o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon según correspondiera en variables con más de dos factores. ¹Categorías correspondientes al análisis histológico: Pobre, HCC moderadamente diferenciado; Moderado, HCC moderadamente diferenciado; Bien, HCC bien diferenciado; CCA, hepatocolangiocarcinoma.

	eMDSC		eMDSC CD25+		CD25 en eMDSC (MFI)	
Tabaquismo activo						
No (n=7)	4,2 (3 – 4,8)	0,2	1,6 (1 – 2,5)	0,2	1514 (858 – 2054)	0,8
Si (n=15)	6,2 (3,9 – 9)		3,4 (1,4 – 4,1)		1365 (1060 – 1982)	
Consumo de alcohol						
No (n=9)	4,8 (3,6 – 6)	0,2	1,7 (0,9 – 3,3)	0,3	1074 (786 – 1639)	0,2
Si (n=13)	6,8 (3,1 – 17,6)		3,4 (2 – 3,9)		1901 (1136 – 2060)	
Fármacos anti-dislipidemia						
No (n=15)	6,2 (3,6 – 9)	0,7	3,3 (1,6 – 3,9)	0,5	1901 (1085 – 2035)	0,5
Estatinas (n=5)	4,8 (2,6 – 4,8)		0,8 (0,7 – 3,1)		1074 (601 – 1639)	
Gemfibrozilo (n=2)	4,9 (4,3 – 5,6)		2,9 (2,3 – 3,6)		1009 (897 – 1120)	
Encefalopatía hepática						
No (n=19)	4,8 (2,8 – 6,7)	0,03	2,1 (0,8 – 3,8)	0,03	1209 (853 – 1995)	0,2
Si (n=3)	23 (14,8 – 31,1)		22,2 (12,8 – 28)		2738 (2319 – 3156)	
Descompensación Edematoascítica						
No (n=20)	5,4 (3,5 – 8,6)	0,4	2,9 (0,9 – 4)	1	1365 (853 – 2028)	0,8
Si (n=2)	3,8 (2,6 – 5)		2,6 (1,9 – 3,2)		1570 (1379 – 1762)	
Análisis Histológico						
Pobre (n=4)	2,8 (2,4 – 6,7)	0,2	2,1 (1,5 – 2,3)	0,2	2085 (2060 – 2086)	0,08
Moderado (n=11)	6,8 (4,7 – 9)		3,4 (1,1 – 3,9)		1136 (654 – 1840)	
Bien (n=5)	6 (4,8 – 6,2)		4,2 (3,3 – 4,3)		1639 (1232 – 1901)	
CCA (n=2)	3,1 (3,8 – 3,1)		1,2 (1 – 1,4)		693 (647 – 740)	
Microinvasión vascular						
No (n=20)	4,8 (3 – 6,9)	0,03	2,9 (1,2 – 3,9)	0,04	1365 (1058 – 1995)	0,9
Si (n=2)	24,7 (24 – 25,5)		11,4 (6,1 – 16,8)		1965 (1160 – 2770)	
Metástasis						
No (n=21)	6 (2,6 – 8,2)	0,6	3,1 (0,9 – 3,9)	1	1232 (919 – 1982)	0,4
Si (n=1)	3,1 (–)		2,7 (–)		2085 (–)	
Clase Child-Pugh						
A (n=19)	4,8 (2,8 – 6,7)	0,08	2,1 (0,8 – 3,8)	0,08	1209 (853 – 1995)	0,2
B (n=2)	14,8 (10,8 – 18,9)		12,8 (8,1 – 17,6)		3574 (–)	
C (n=1)	39,3 (–)		32,7 (–)		1901 (–)	
Estadio BCLC						
A (n=17)	6,2 (3,6 – 8,2)	0,8	3,1 (0,9 – 3,9)	0,07	1232 (930 – 1955)	0,5
B (n=4)	5,4 (3,9 – 11,1)		2,3 (1,1 – 3,6)		1503 (878 – 2116)	
C (n=1)	3,1 (–)		2,7 (–)		2085 (–)	

La **Figura 27** muestra las correlaciones entre variables analíticas y clínicas continuas, poblaciones mieloides e inhibición linfocitaria *in vitro*. Además de las mencionadas con anterioridad, la capacidad inmunosupresora correlacionó inversamente con los linfocitos circulantes (CD4⁺, $r=-0,81$, $p=0,0269$; CD8⁺, $r=-0,85$, $p=0,0161$). También, se encontró una correlación inversa entre los niveles de plaquetas y la proporción de eMDSC CD25⁺ ($r=-0,50$, $p=0,0169$) así como con la expresión de CD25 en eMDSC ($r=-0,56$, $p=0,0011$).

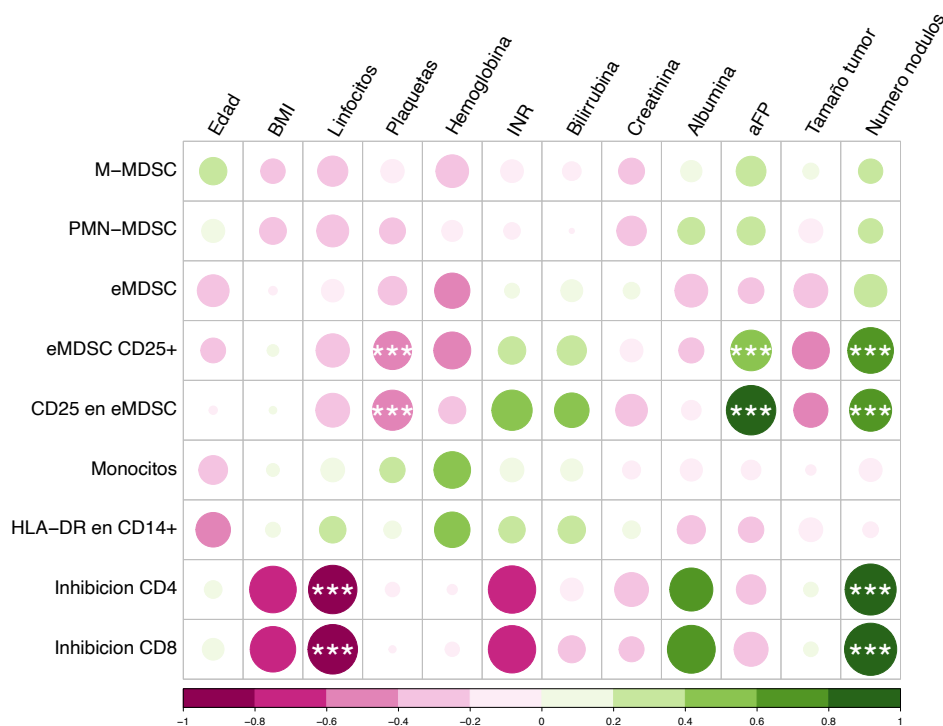


Figura 27. Correlación entre poblaciones mieloides y variables clínicas y analíticas continuas en pacientes con HCC. Las poblaciones mieloides analizadas fueron M-MDSC, PMN-MDSC, eMDSC, eMDSC CD25⁺, monocitos, expresión de CD25 en eMDSC y de HLA-DR en células CD14⁺ medido como MFI. Las variables clínicas evaluadas incluyeron la edad, BMI y parámetros de laboratorio obtenidos el mismo día de la extracción de la muestra: conteo de neutrófilos ($\times 1000/\mu\text{L}$), linfocitos ($\times 1000/\mu\text{L}$) y plaquetas ($\times 1000/\mu\text{L}$), niveles de hemoglobina, INR, bilirrubina, creatinina, albúmina y aFP, el tamaño tumoral y el número de nódulos. Las correlaciones directas aparecen en verde y las inversas en rosa. El tamaño y el gradiente de color de los círculos representan la magnitud de la correlación. Los asteriscos representan la significación estadística. Las correlaciones se evaluaron con el coeficiente de correlación de Spearman. ***, $p < 0.001$.

La **Tabla 10** compara la capacidad supresora de las MDSC sobre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ entre los distintos grupos de pacientes, clasificados según sus variables clínicas categóricas. Se observaron tendencias hacia mayor capacidad inmunosupresora en los pacientes con VHC en comparación con aquellos sin hepatitis, así como en los pacientes con estadio TNM II en comparación con aquellos en estadio 0/I, que no alcanzaron significación estadística. No se observó asociación con el resto de los parámetros estudiados (**Tabla 10**).

Tabla 10. Relación entre inhibición de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y características clínicas

	Inhibición T CD4 ⁺		Inhibición T CD8 ⁺	
Tabaquismo activo				
No (n=2)	33,8 (31,4 – 36,1)	0,86	33,87 (31,25 – 36,50)	0,58
Si (n=5)	15,2 (13,6 – 52,3)		9,80 (6 – 36,50)	
Consumo alcohol				
No (n=3)	29,1 (21,4 – 33,8)	0,86	28,6 (17,3 – 33,9)	1
Si (n=4)	33,7 (11,7 – 61,3)		23,2 (8,7 – 50,1)	
Hepatitis				
No (n=2)	7,4 (4,2 – 10,5)	0,09	5,8 (5,6 – 5,9)	0,1
VHC (n=5)	38,4 (29,1 – 52,3)		36,5 (28,6 – 39,1)	
Diabetes mellitus				
No (n=5)	29,1 (15,2 – 38,4)	1	28,6 (9,8 – 39,1)	0,86
Tipo 2 (n=2)	32,9 (23,3 – 42,6)		21,3 (13,6 – 28,9)	
Cirrosis				
No (n=1)	13,6 (–)	0,57	6 (–)	0,57
Si (n=6)	33,8 (18,7 – 48,8)		32,6 (14,5 – 38,5)	
Encefalopatía hepática				
No (n=6)	33,8 (18,7 – 48,8)	0,29	32,6 (14,5 – 38,5)	0,29
Si (n=1)	1,1 (–)		5,5 (–)	
Descompensación edematoascítica				
No (n=5)	15,2 (13,6 – 29,1)	0,38	9,8 (6 – 28,6)	0,38
Si (n=2)	45,3 (41,5 – 48,8)		37,8 (37,2 – 38,5)	
Análisis histológico¹				
Moderado (n=4)	45,3 (32,6 – 61,3)	0,11	37,8 (29,8 – 52)	0,11
Bien (n=3)	13,6 (7,4 – 21,3)		6 (5,8 – 17,3)	
Clase Child-Pugh				
A (n=6)	33,8 (18,7 – 48,8)	0,29	32,5 (14,5 – 38,5)	0,29
C (n=1)	1,1 (–)		5,5 (–)	
Estadio BCLC				
A (n=5)	15,2 (13,6 – 52,3)	0,86	9,8 (6 – 36,5)	0,57
B (n=2)	33,8 (31,4 – 36,1)		33,9 (31,2 – 36,5)	
Estadio TNM				
0/I (n=3)	13,6 (7,4 – 14,)	0,06	9,8 (6 – 36,5)	0,06
II (n=4)	45,3 (36,1 – 61,3)		33,9 (31,3 – 36,5)	

Los datos se representan como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney.

¹Categorías correspondientes al análisis histológico: Moderado, HCC moderadamente diferenciado; Bien, HCC bien diferenciado.

Por último, el análisis PCA reveló que los pacientes que fallecieron durante el seguimiento se distinguían discretamente en la dimensión 2 de aquellos que permanecieron vivos, siendo eMDSC CD25⁺ y la expresión de CD25 en las eMDSC las principales variables que contribuían a esa separación (**Figura 28**).

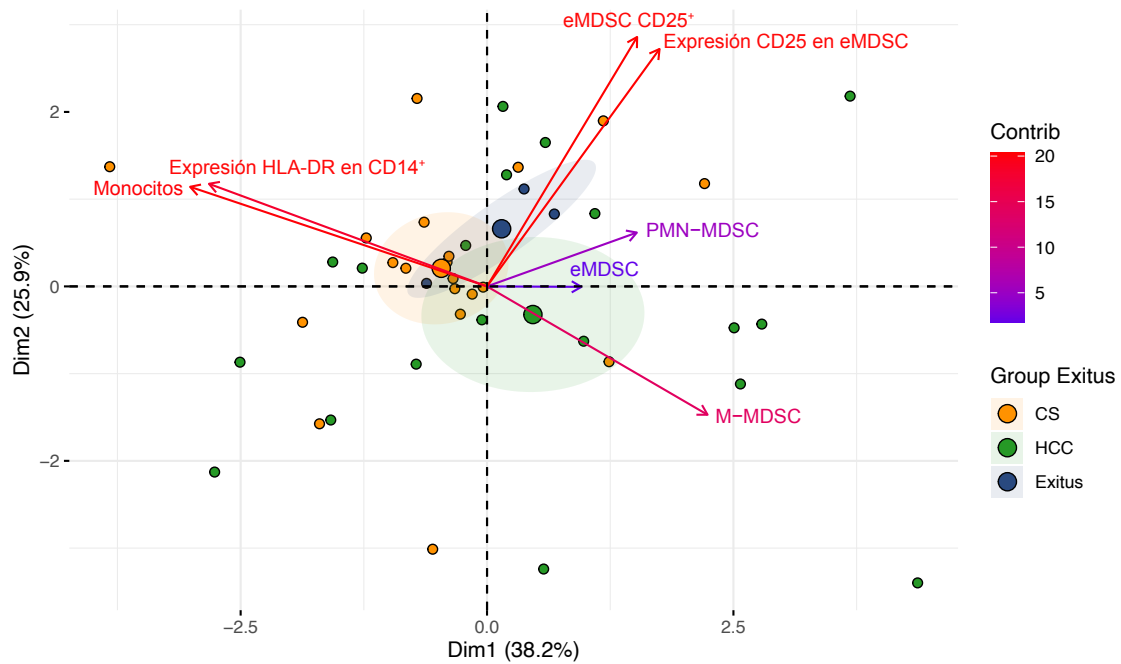


Figura 28. PCA de las poblaciones mieloides y los pacientes con HCC clasificados en función del desenlace clínico (supervivencia o exitus).

CAPÍTULO III:

**Las M-MDSC son un factor de riesgo
de aparición de neoplasia en el post-
trasplante renal**

Las MDSC se han propuesto como una población potencialmente beneficiosa en el ámbito del trasplante de órgano sólido. Gracias a sus múltiples mecanismos inmunosupresores, estas células podrían desempeñar un papel relevante en la inducción de tolerancia inmunológica, facilitando así la reducción de la terapia inmunosupresora convencional. No obstante, es ampliamente sabido que las MDSC se asocian a procesos oncológicos mediando la progresión tumoral y los procesos metastásicos. Un estudio previo de nuestro grupo³⁸⁶ identificó que niveles elevados de M-MDSC a los 14 días post-trasplante eran un factor de riesgo independiente de aparición de neoplasia durante los dos primeros años tras el trasplante. Aunque se reconoce que las M-MDSC pueden ser beneficiosas para la tolerancia al injerto, protegiendo así del rechazo, los estudios que abordan su papel en el contexto del trasplante renal siguen siendo limitados, con cohortes reducidas y seguimientos a corto plazo. Con estos antecedentes, en este capítulo se ha evaluado el papel de las M-MDSC en la aparición de neoplasia y episodios de rechazo en una cohorte de receptores de trasplante renal seguida clínicamente durante nueve años.

3.1. Descripción de la cohorte de estudio

La cohorte analizada estuvo compuesta por 226 RTR trasplantados en el Hospital Universitario 12 de Octubre entre los años 2014 y 2016, por tanto, con seguimiento clínico mínimo de nueve años tras el trasplante. Las principales características clínicas y demográficas de la población se detallan en la **Tabla 11**. La mediana de edad fue de 55 años y la mayoría de los pacientes eran hombres (71,68 %). En cuanto a las causas de la ERC, la nefropatía diabética (22,57 %) y la poliquistosis renal (12,39 %) fueron las etiologías más frecuentes. Además, 23 pacientes (10,18 %) presentaban hepatitis crónica y 13 (5,75 %) tenían antecedentes oncológicos previos al trasplante. Respecto a la modalidad de diálisis, 20 pacientes (8,85 %) se encontraban en situación de pre-diálisis, 35 (15,49 %) habían recibido diálisis peritoneal y la mayoría había sido tratada con hemodiálisis (74,78 %). Los pacientes llevaban una mediana de 480 (210 – 900) días en diálisis antes de recibir el injerto.

En relación con la procedencia de los órganos trasplantados, la mayor parte provino de donantes en muerte encefálica (64,60 %), mientras que el 23,45 % correspondió a donantes en asistolia. Una minoría de RTR (11,95 %) recibió un injerto de donante vivo. En la mayoría de los casos, se trató del primer trasplante que recibían (87,61 %) y fue un trasplante renal aislado (94,69 %).

En cuanto a la sensibilización, 39 pacientes (17,26 %) presentaban anticuerpos anti-HLA pre-trasplante. Atendiendo a las incompatibilidades en HLA-A, -B y -DR entre donantes y receptores, 27 (12,11 %) pacientes presentaban menos de tres, mientras que 199 (88,05 %) tenían tres o más incompatibilidades. Más concretamente, en el caso de HLA-B la mayoría de los pacientes presentaban 2 incompatibilidades (56,64 %), mientras que para HLA-DR, 88 (38,94 %) y 102 (45,13 %) tenían una o dos incompatibilidades respectivamente. La función del injerto fue inmediata en 110 pacientes (48,67 %).

En relación con la terapia inmunosupresora, como terapia de inducción, 110 pacientes (48,67 %) recibieron ATG, 85 (37,61 %) fueron tratados con basiliximab y un pequeño grupo de 31 (13,72 %) pacientes no recibió tratamiento de inducción. La terapia de mantenimiento se agrupó en cinco categorías de tratamientos de forma que en el momento de consulta, 12 sujetos (5,31 %) estaban recibiendo tacrolimus en monoterapia, 139 (61,50 %) triple terapia con tacrolimus, MMF y corticoides, 22 pacientes (9,74 %) tacrolimus en combinación con MMF, 26 (11,50 %) tacrolimus y corticoides y 22 (9,74 %) tacrolimus, corticoides y otro inmunosupresor, bien un inhibidor de mTOR o azatioprina.

Durante los nueve años de seguimiento se registraron como eventos de interés la aparición de DSA *de novo* (7,96 %), la pérdida del injerto (10,18 %), episodios de rechazo (15,49 %), el desarrollo de neoplasias (20,36 %) y los fallecimientos (30,09 %).

Tabla 11. Características de la cohorte de trasplante renal.

	(n=226)
Características demográficas e historia clínica	
Edad, mediana (IQR)	55 (43 – 66)
Sexo, mujer	64 (28,32 %)
Enfermedad de Base	
Amiloidosis	3 (1,32 %)
Glomerulonefritis focal y segmentaria	13 (5,75 %)
Glomerulonefritis membranoproliferativa	4 (1,78 %)
Otra Glomerulonefritis	15 (6,64 %)
Nefroangioesclerosis hipertensiva	17 (7,52 %)
Nefropatía diabética	51 (22,57 %)
Nefropatía IgAxs	19 (8,41 %)
Nefropatía reflujo	8 (3,54 %)
Otra Nefropatía	8 (3,54 %)
Poliquistosis	28 (12,39 %)
Vasculitis	4 (1,78 %)
Tubulointersticial	10 (4,43 %)
Otra	21 (9,29 %)
Desconocida	25 (11,06 %)
Hepatitis Crónica	23 (10,18 %)
Cáncer previo al trasplante	13 (5,75 %)

Diálisis previa al trasplante	
No	20 (8,85 %)
Diálisis Peritoneal	35 (15,49 %)
Hemodiálisis	169 (74,78 %)
Días en Diálisis, mediana (IQR)	480 (210 – 900)
Características del trasplante	
Tipo de Donante	
Asistolia	53 (23,45 %)
Muerte Encefálica	146 (64,60 %)
Donante Vivo	27 (11,95 %)
Trasplante Previo, no	198 (87,61 %)
Tipo de Trasplante	
Renal	214 (94,69 %)
Hepato-Renal	4 (1,77 %)
Páncreas-Riñón	8 (3,54 %)
Anti-HLA Pre-trasplante, si	39 (17,26 %)
Disparidad HLA (ABDR)	
< 3	27 (11,95 %)
≥ 3	199 (88,05 %)
Disparidad HLA-B	
0	14 (6,20 %)
1	84 (37,17 %)
2	128 (56,64 %)
Disparidad HLA-DR	
0	36 (15,93 %)
1	102 (45,13 %)
2	88 (38,94 %)
Funcionalidad del Injerto	
Inmediata	110 (48,67 %)
Retrasada	114 (50,44 %)
Inmunosupresión	
Inducción	
ATG	110 (48,67 %)
Basiliximab	85 (37,61 %)
No Inducción	31 (13,72 %)
Mantenimiento¹	
Tac	12 (5,31 %)
Tac+MMF+Corticoides	139 (61,50 %)
Tac+MMF	22 (9,74 %)
Tac+Corticoides	26 (11,50 %)
Tac+Corticoides+Otros [#]	22 (9,74 %)
Evolución post-trasplante	
DSA <i>de novo</i> post-trasplante, si	18 (7,96 %)
Pérdida del injerto	23 (10,18 %)
Rechazo	35 (15,49 %)
Neoplasia <i>de novo</i>	46 (20,36 %)
Exitus	68 (30,09 %)

IQR, rango intercuartílico; ATG, globulina anti-timocítica; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. [#]Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)

3.2. Expansión de M-MDSC post-trasplante

En el estudio de A. Utrero-Rico *et al.*³⁸⁶ se evaluaron longitudinalmente las poblaciones de monocitos (CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR⁺) y M-MDSC (CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-low}) mediante citometría de flujo en la cohorte de RTR (**Figura 10**). Estas células se identificaron en la sangre periférica de los RTR antes del trasplante y a los 7, 14 y 30 días, así como a los 3, 6 y 12 meses después del trasplante y se evaluaron tanto en porcentaje respecto al total de células mieloides como en recuento absoluto.

Las M-MDSC, tanto en porcentaje como en números absolutos, se encontraron aumentadas durante todo el primer año post-trasplante con respecto al pre-trasplante. Alcanzaron su pico a los 7 o 14 días después del trasplante, manteniéndose en niveles máximos a los 14 días y al mes post-trasplante. A partir de los 3 meses, se observó una disminución progresiva, aunque los niveles permanecieron por encima de los niveles pre-trasplante a lo largo de todo el periodo de seguimiento (**Figura 29A**). Por el contrario, los monocitos disminuyeron significativamente entre los 7 días y los 3 meses tras el trasplante recuperando los niveles pre-trasplante a los 6 meses, cuando se evaluaron sobre células mieloides, o a los 3 meses, considerándose en números absolutos (**Figura 29B**).

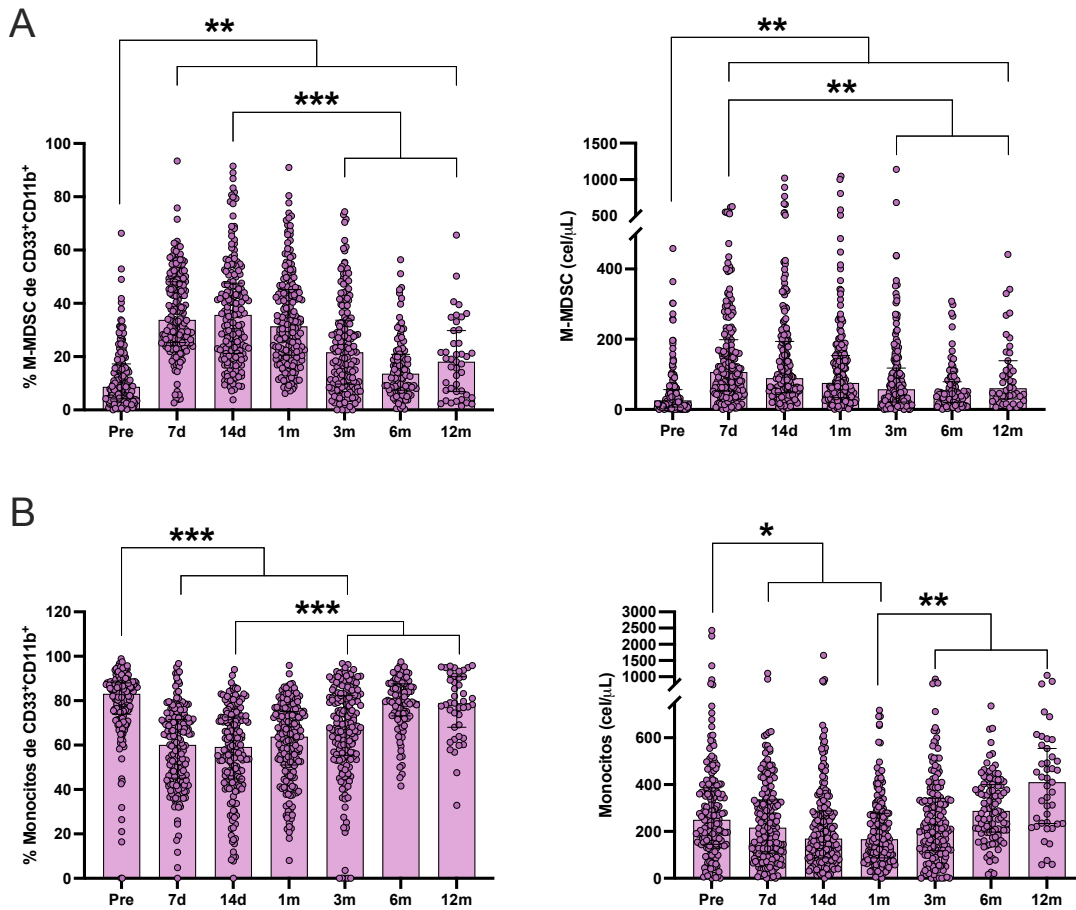


Figura 29. Expansión de las M-MDSC durante el primer año post-trasplante³⁸⁶. (A) Porcentaje sobre células mieloides y recuento absoluto de M-MDSC y (B) Monocitos en RTR durante el primer año post-trasplante. Todos los parámetros se muestran como mediana y rango intercuartílico. La significación entre grupos se determinó con la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Pre, pre-trasplante; 7d, 7 días post-trasplante; 14d, 14 días post-trasplante; 1m, 1 mes post-trasplante; 3m, 3 meses post-trasplante; 6m, 6 meses post-trasplante; 12m, 12 meses post-trasplante.

3.3. Las M-MDSC en pacientes sin y con neoplasia en el post-trasplante

De los 226 RTR incluidos en el estudio, 46 pacientes (20,36 %) desarrollaron neoplasias a lo largo de los 9 años de seguimiento post-trasplante, con una mediana de tiempo desde el trasplante hasta el diagnóstico del cáncer de 1385 (776 – 1990) días.

La **Tabla 12** resume las características clínicas de los pacientes que desarrollaron neoplasia durante el seguimiento. Estos pacientes eran significativamente de mayor edad comparados con los que no presentaron tumores. No se observaron diferencias en cuanto a la distribución por

sexo, la etiología de base de la ERC, la presencia de hepatitis crónica, el historial de cáncer previo al trasplante ni en la modalidad o duración de la diálisis.

En relación con las características del trasplante, se identificó que entre los receptores que desarrollaron neoplasias, la proporción de primeros trasplantes era significativamente superior, y la proporción de pacientes sensibilizados pre-trasplante era significativamente inferior. No se detectaron diferencias significativas entre pacientes con y sin neoplasias en relación con el tipo de donante, trasplante renal o combinado con otro órgano, grado de incompatibilidad HLA ni la funcionalidad inicial del injerto.

Respecto a la terapia inmunosupresora, se observó que la mayoría de los pacientes del grupo con neoplasias había recibido basiliximab como terapia de inducción (60,87 %) en comparación con el grupo sin cáncer, donde ATG (54,44 %) fue la opción más frecuentemente utilizada. No se identificaron diferencias en los esquemas de inmunosupresión de mantenimiento entre ambos grupos.

Finalmente, en la evolución post-trasplante, el grupo de pacientes que no hizo neoplasia acumuló mayor incidencia de aparición de DSA *de novo*, pérdida del injerto o episodios de rechazo, pero el porcentaje de mortalidad durante el seguimiento fue el único significativamente superior en los pacientes con tumores.

Tabla 12. Características de los RTR sin y con neoplasia en el post-trasplante.

	Neoplasia (n=46)	No Neoplasia (n=180)	p
Características demográficas e historia clínica			
Edad, mediana (IQR)	66 (55 – 73)	54 (42 – 63)	0,00009
Sexo, mujer	8 (17,39 %)	56 (31,11 %)	0,09
Enfermedad de Base			0,99
Amiloidosis	1 (2,17 %)	2 (1,11 %)	
GN focal y segmentaria	1 (2,17 %)	12 (6,67 %)	
GN membranoproliferativa	1 (2,17 %)	7 (3,89 %)	
Otra GN	4 (8,70 %)	11 (6,11 %)	
Nefroangioesclerosis hipertensiva	4 (8,70 %)	13 (7,22 %)	
Nefropatía diabética	10 (21,74 %)	41 (22,78 %)	
Nefropatía IgA	4 (8,70 %)	15 (8,33 %)	
Nefropatía reflujo	1 (2,17 %)	7 (3,89 %)	
Otra Nefropatía	1 (2,17 %)	7 (3,89 %)	
Poliquistosis	5 (10,87 %)	23 (12,78 %)	
Vasculitis	1 (2,17 %)	7 (3,89 %)	
Tubulointersticial	3 (6,52 %)	7 (3,89 %)	
Otra	4 (8,70 %)	17 (9,44 %)	
Desconocida	6 (13,04 %)	19 (10,56 %)	
Hepatitis Crónica	7 (15,22 %)	16 (8,89 %)	0,32
Cáncer previo al trasplante	5 (10,87 %)	8 (4,44 %)	0,19

Diálisis previa al trasplante			0,49
No	3 (6,52 %)	17 (9,44 %)	
Diálisis Peritoneal	5 (10,87 %)	30 (16,57 %)	
Hemodiálisis	37 (80,43 %)	132 (73,48 %)	
Días en Diálisis	330 (210 – 645)	510 (240 – 960)	0,12
Características del trasplante			
Tipo de Donante			0,14
Asistolia	6 (13,04 %)	47 (26,11 %)	
Muerte Encefálica	35 (76,09 %)	111 (61,67 %)	
Donante Vivo	5 (10,87 %)	22 (12,22 %)	
Trasplante Previo, no	45 (97,83 %)	153 (85 %)	0,035
Tipo de Trasplante			0,20
Renal	46 (100 %)	168 (93,33 %)	
Hepato-Renal	0	8 (4,44 %)	
Páncreas-Riñón	0	4 (2,22 %)	
Anti-HLA Pre-trasplante, si	3 (6,52 %)	36 (20 %)	0,04
Disparidad HLA (ABDR)			0,32
< 3	3 (6,52 %)	24 (13,13 %)	
≥ 3	43 (93,48 %)	156 (86,67 %)	
Disparidad HLA-B			0,80
0	4 (8,70 %)	15 (8,33 %)	
1	19 (41,20 %)	63 (35 %)	
2	23 (50 %)	102 (56,67 %)	
Disparidad HLA-DR			0,16
0	5 (10,87 %)	24 (13,13 %)	
1	22 (47,83 %)	69 (38,33 %)	
2	19 (41,20 %)	87 (48,33 %)	
Funcionalidad del Injerto			1
Inmediata	23 (50 %)	89 (48,44 %)	
Retrasada	23 (50 %)	91 (50,56 %)	
Inmunosupresión			
Inducción			0,0008
ATG	12 (26,08 %)	98 (54,44 %)	
Basiliximab	28 (60,87 %)	57 (31,67 %)	
No Inducción	6 (13,04 %)	25 (13,89 %)	
Mantenimiento¹			0,33
Tac	4 (8,70 %)	7 (3,89 %)	0,33
Tac+MMF+Corticoides	24 (52,17 %)	115 (63,89 %)	0,20
Tac+MMF	7 (15,22 %)	15 (8,30 %)	0,26
Tac+Corticoides	5 (10,87 %)	27 (15 %)	1
Tac+Corticoides+Otros [#]	6 (13,04 %)	16 (8,89 %)	0,57
Evolución post-trasplante			
DSA de novo post-trasplante, si	2 (4,35 %)	16 (8,89 %)	0,46
Perdida del injerto	1 (2,17 %)	22 (12,22 %)	0,08
Rechazo	6 (13,04 %)	29 (16,11 %)	0,73
Exitus	21 (45,65 %)	47 (26,11 %)	0,018

Las variables numéricas se representan como mediana y rango intercuartílico. Las variables categóricas se representan como tamaño y porcentaje. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney para las variables numéricas y con la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas.

IQR, rango intercuartílico; GN, glomerulonefritis; ATG, globulina anti-timocítica; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato.

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. [#]Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)

En cuanto a las poblaciones mieloides, no se observaron diferencias en la dinámica de las M-MDSC ni de los monocitos entre ambos grupos a lo largo del primer año post-trasplante (**Figura 30**). No obstante, los pacientes que desarrollaron neoplasia presentaban niveles significativamente más elevados de M-MDSC, tanto en porcentaje como en números absolutos, en la medición pre-trasplante y a los 7 días posteriores al trasplante, en comparación con aquellos que no desarrollaron cáncer. A los 14 y 30 días post-trasplante, aunque se mantuvo la tendencia hacia niveles más altos de M-MDSC en el grupo con neoplasias, la diferencia no alcanzó la significación estadística. A partir de los tres meses tras el trasplante, los niveles de M-MDSC se estabilizaron, sin diferencias relevantes entre los grupos (**Figura 30A**). En el caso de los monocitos, si bien se observó una tendencia hacia niveles más bajos en los RTR que desarrollaron cáncer, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas, salvo para los monocitos medidos en números absolutos al mes post-trasplante, donde se evidenció una diferencia significativa entre los grupos (**Figura 30B**).

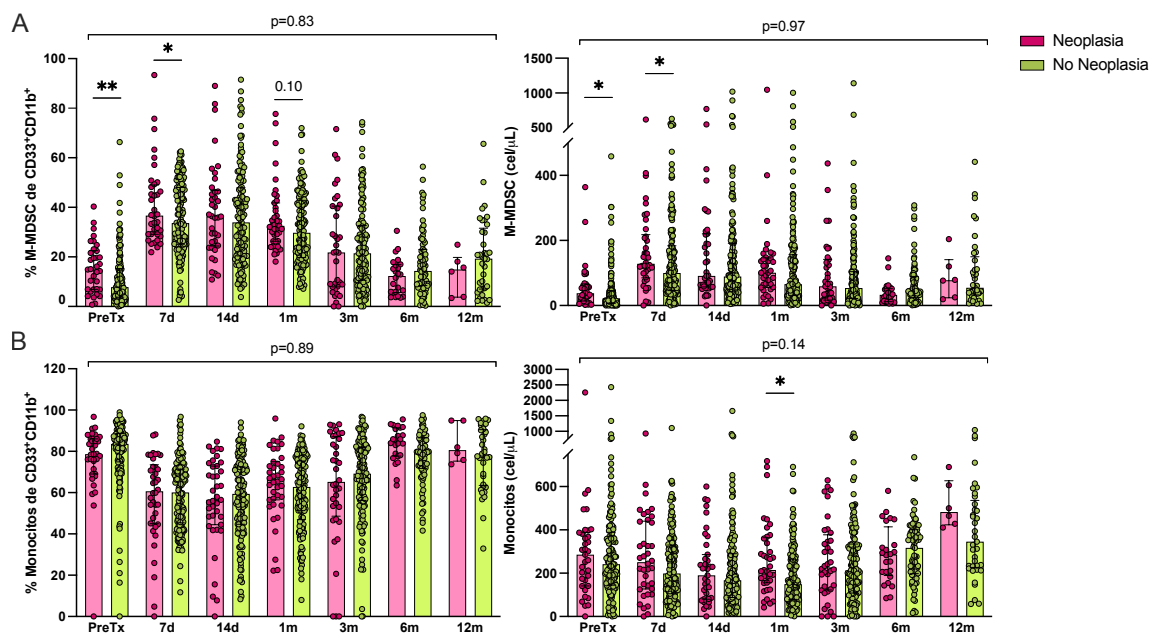


Figura 30. Dinámica de las M-MDSC y monocitos durante el primer año post-trasplante en receptores con y sin neoplasia. (A) Porcentaje sobre células mieloides y recuento absoluto de M-MDSC y (B) monocitos en RTR durante el primer año post-trasplante. Todos los parámetros se muestran como mediana y rango intercuartílico. La evolución temporal de las poblaciones celulares se analizó mediante un modelo de regresión de efectos mixtos para datos continuos. Las comparaciones entre grupos se realizaron con el estadístico U de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; Pre, pre-trasplante; 7d, 7 días post-trasplante; 14d, 14 días post-trasplante; 1m, 1 mes post-trasplante; 3m, 3 meses post-trasplante; 6m, 6 meses post-trasplante; 12m, 12 meses post-trasplante.

En resumen, los RTR que desarrollaron cáncer durante los 9 años tras el trasplante correspondían a una población de mayor edad, con menor número de trasplantes previos, menor sensibilización anti-HLA pre-trasplante y que había recibido basiliximab como terapia de inducción en mayor proporción. En los pacientes con cáncer se acumularon más muertes. Las M-MDSC se encontraron significativamente elevadas, tanto en el pre-trasplante como a los 7 días post-trasplante.

3.4. Estratificación de los RTR en función de los niveles de M-MDSC

A continuación, se estratificaron los RTR en función de los niveles de M-MDSC en el pre-trasplante y a 7, 14 y 30 días post-trasplante, tiempos en los que se habían identificado diferencias entre los pacientes sin y con neoplasia. Utilizando curvas ROC, se determinaron los puntos de corte óptimos para cada tiempo de análisis, seleccionando los umbrales que optimizaban el índice de Youden. La **Tabla 13** resume los puntos de corte obtenidos, junto con sus respectivas sensibilidades, especificidades y áreas bajo la curva.

Tras la estratificación de los pacientes en función del punto de corte de las M-MDSC en el pre-trasplante, la proporción de pacientes que desarrollaron neoplasias fue significativamente mayor en el grupo con niveles elevados de M-MDSC (18 de 59 pacientes; 31 %) en comparación con aquellos con niveles por debajo del umbral definido (16 de 114 pacientes; 14 %) ($p=0,01$). Este mismo resultado se observó considerando las M-MDSC en números absolutos en el pre-trasplante (22/84, 26 % vs 12/88, 14 %; $p=0,04$), a los 7 días (26/93, 28 % vs 12/91, 13 %; $p=0,02$) y al mes (23/86, 27 % vs 14/95, 15 %; $p=0,04$) post-trasplante. En resumen, los pacientes que hicieron neoplasias en el periodo estudiado mostraron significativamente más M-MDSC peritrasplante.

A partir de este punto, los pacientes con niveles de M-MDSC por encima del punto de corte serán denominados “M-MDSC Altas”, mientras que aquellos con niveles por debajo del umbral definido por la curva ROC serán referidos como “M-MDSC Bajas”.

Tabla 13. Especificidad, sensibilidad y área bajo la curva (AUC) para los puntos de corte de M-MDSC determinados con curvas ROC

	Punto de corte	Sensibilidad (TPR)	Especificidad (1 – FPR)	AUC
M-MDSC pre-trasplante				
% sobre CD33 ⁺	12,30 %	0,53	0,71	0,60
NAbs (cel/ μ L)	28 cel/ μ L	0,73	0,47	0,60
M-MDSC 7 días post-trasplante				
% sobre CD33 ⁺	63,30 %	0,11	0,97	0,48
NAbs (cel/ μ L)	111,60 cel/ μ L	0,68	0,55	0,59
M-MDSC 14 días post-trasplante				
% sobre CD33 ⁺	23,70 %	0,79	0,34	0,53
NAbs (cel/ μ L)	50,80 cel/ μ L	0,87	0,31	0,56
M-MDSC 1 mes post-trasplante				
% sobre CD33 ⁺	22,50 %	0,74	0,32	0,46
NAbs (cel/ μ L)	84,60 cel/ μ L	0,87	0,31	0,56

NAbs, números absolutos; TPR, *true positive rate*; FPR, *false positive rate*; AUC, *area under curve*.

3.5. Las M-MDSC altas confieren riesgo de forma independiente para la aparición de neoplasia en receptores renales

Con el objetivo de determinar el impacto de las variables que diferían entre RTR sin y con cáncer – edad, trasplantes previos, presencia de anticuerpos anti-HLA pre-trasplante, terapia de inducción, muerte y niveles de M-MDSC – sobre el riesgo de desarrollar neoplasia, se llevó a cabo un análisis de regresión de Cox, tanto univariante como multivariante. Adicionalmente, se realizó un análisis de supervivencia considerando riesgos competitivos, basado en el modelo de Fine y Gray, que incluyó tanto la aparición de neoplasias como los episodios de rechazo como eventos de interés.

La **Tabla 14** resume los HR obtenidos en los análisis univariante y multivariante para las variables evaluadas. La **Figura 31** presenta, en formato de *forest plot*, los HR de las variables más relevantes.

La edad emergió como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de neoplasia, de modo que cada incremento de un año en la edad se asoció con un aumento del 4 % en el riesgo de aparición de cáncer. La nefropatía diabética, aunque un factor protector significativo en el modelo univariante no resultó un factor independiente en el modelo multivariante.

El uso de basiliximab como terapia de inducción, en vez de ATG, se asoció con un incremento superior a tres veces en el riesgo de aparición de tumores en el seguimiento post-trasplante. De nuevo, esta asociación se perdió tras el ajuste multivariante. No obstante, el análisis de Kaplan-Meier mostró que los pacientes que recibieron basiliximab presentaron una menor SLM a los 9 años (64 % (54 % – 76 %) en comparación con aquellos tratados con ATG (89 % (83 % – 96 %) (**Figura 32A**).

El desarrollo de anticuerpos anti-HLA DSA de clase I y II *de novo*, también se identificó como factor protector en el análisis univariante, aunque no conservó su significación en el modelo multivariante.

Por otro lado, variables como haber recibido un trasplante previo, la presencia de anticuerpos anti-HLA pre-trasplante así como la existencia de una o dos incompatibilidades en HLA-DR mostraron tendencia hacia un efecto protector, si bien estas asociaciones no alcanzaron la significación estadística. No se identificaron asociaciones significativas en el resto de las variables analizadas.

En cuanto a las M-MDSC, se observó que el grupo de M-MDSC altas, de acuerdo con el análisis de curvas ROC (**Tabla 13**), se asoció de manera independiente con un mayor riesgo de neoplasia. Concretamente, tener las M-MDSC altas dentro de las células mieloides CD33⁺ en el pre-trasplante y en recuento absoluto, en el pre-trasplante y a los 7 días post-trasplante se asociaron con HR de 3,83 (IC 95 %: 1,68 – 8,73), 3,12 (IC 95 %: 1,23 – 7,89) y 2,17 (IC 95 %: 1,02 – 4,61), respectivamente. Aunque niveles elevados de M-MDSC al mes post-trasplante también mostraron una asociación significativa en el análisis univariante, esta no se mantuvo en el modelo multivariante.

El análisis de riesgos competitivos mediante el modelo de Fine y Gray confirmó los hallazgos de la regresión de Cox, con la excepción de la nefropatía diabética, que no se identificó como un factor significativo en el análisis univariante de este modelo (**Tabla 14**).

Tabla 14. Hazard Ratio (HR) e intervalo de confianza al 95 % para la aparición de neoplasia en el post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes.

	Log-Rank		Riesgos Competitivos (Fine + Gray)	
	Univariante	Multivariante	Univariante	Multivariante
Características Clínicas				
Edad	1,05 (1,03 – 1,1), p<0,0001	1,04 (1,01 – 1,1) p=0,0004	1,04 (1,02 – 1,07) p<0,0001	1,04 (1,01 – 1,08) p=0,005
Sexo (mujer)	0,49 (0,23 – 1,05), p=0,07	-	0,64 (0,29 – 1,39) p=0,26	-
Enfermedad de Base				
Nefropatía diabética	0,11 (0,02 – 0,94), p=0,03	0,13 (0,01 – 1,18) p=0,07	0,31 (0,03 – 3,23) p=0,33	-
Poliquistosis	0,42 (0,17 – 1,07), p=0,07	0,08 (0,01 – 1,03) p=0,05	0,42 (0,04 – 4,52) p=0,47	-
Hepatitis Crónica	1,87 (0,79 – 4,40), p=0,16	-	1,66 (0,7 – 3,96) p=0,25	-
Cáncer previo	2,14 (0,85 – 5,41), p=0,11	-	1,96 (0,73 – 5,31) p=0,18	-
Diálisis				
Hemodiálisis	1,66 (0,51 – 5,39), p=0,40	-	1,22 (0,39 – 3,87) p=0,73	-
Peritoneal	0,99 (0,23 – 4,18), p=0,99	-	0,94 (0,23 – 3,88) p=0,93	-
Días en diálisis	0,99 (0,99 – 1), p=0,18	-	1 (1 – 1) p=0,21	-
Características del Trasplante				
Tipo Donante (vs vivo)				
Asistolia	0,66 (0,20 – 2,16), p=0,49	-	0,58 (0,18 – 1,88) p=0,37	-
Muerte encefálica	1,52 (0,60 – 3,89), p=0,38	-	1,06 (0,41 – 2,73) p=0,91	-
Trasplante Previo	0,15 (0,02 – 1,11), p=0,06	0,23 (0,03 – 1,72) p=0,15	0,18 (0,02 – 1,3) p=0,09	0,44 (0,05 – 3,61) p=0,45
Anti-HLA pre-trasplante	0,33 (0,10 – 1,05), p=0,06	0,24 (0,02 – 3,31) p=0,29	0,25 (0,06 – 1,05) p=0,058	0,29 (0,03 – 2,42) p=0,25
Mismatch < 3	0,48 (0,15 – 1,54), p=0,22	-	0,61 (0,19 – 2) p=0,41	-
Disparidad B				
1	0,36 (0,09 – 1,30), p=0,12	-	1,73 (0,21 – 14,2) p=0,61	-
2	0,64 (0,19 – 2,12), p=0,46	-	1,42 (0,17 – 11,5) p=0,74	-
Disparidad DR				
1	0,45 (0,18 – 1,10), p=0,08	1,59 (0,38 – 6,73) p=0,52	2,7 (0,65 – 11,2) p=0,17	-
2	0,52 (0,21 – 1,28), p=0,15	0,59 (0,13 – 2,61) p=0,48	1,33 (0,3 – 5,98) p=0,71	-

<i>Inmunosupresión</i>				
Inducción (vs ATG)				
No Inducción	1,78 (0,67 – 4,74), p=0,25	-	1,88 (0,63 – 5,62), p=0,26	-
Basiliximab	3,45 (1,75 – 6,79), p=0,0005	1,97 (0,85 – 4,55) p=0,11	3,36 (1,61 – 6,99), p=0,001	2,02 (0,81 – 5,06) p=0,13
Mantenimiento¹				
Tac	0,50 (0,07 – 3,65), p=0,49	-	0,67 (0,09 – 4,9) p=0,70	-
Tac + MMF + Corticoides	0,69 (0,39 – 1,24), p=0,21	-	0,74 (0,4 – 1,38) p=0,34	-
Tac + MMF	1,76 (0,79 – 3,93), p=0,17	-	1,73 (0,75 – 4) p=0,20	-
Tac + Corticoides	0,97 (0,47 – 2,01), p=0,93	-	0,69 (0,29 – 1,67) p=0,41	-
Tac + MMF + Otro [#]	1,40 (0,59 – 3,31), p=0,79	-	1,07 (0,38 – 3,01) p=0,90	-
<i>Evolución post-trasplante</i>				
DSA post-trasplante				
Clase I	1,40 (0,43 – 4,54), p=0,57	-	0,48 (0,06 – 3,68) p=0,48	-
Clase II	0,68 (0,09 – 4,92), p=0,70	-	0,65 (0,08 – 5,08) p=0,68	-
Clase I+II	0,11 (0,02 – 0,82), p=0,03	0,33 (0,04 – 3,28) p=0,37	0,13 (0,02 – 0,99) p=0,04	0,21 (0,03 – 1,56) p=0,13
Rechazo	0,77 (0,33 – 1,81), p=0,547	-	-	-
<i>M-MDSC</i>				
M-MDSC Pre-trasplante				
> 12,3 % de CD33 ⁺	2,47 (1,26 – 4,85), p=0,008	3,83 (1,68 – 8,73) p=0,01	2,39 (1,18 – 4,85) p=0,016	2,08 (1,02 – 4,23) p=0,021
> 28 cel/μL	2,3 (1,11 – 4,74), p=0,02	3,12 (1,23 – 7,89) p=0,01	1,95 (1,06 – 4,05) p=0,034	1,92 (1,05 – 3,38) p=0,039
M-MDSC 7d Post-trasplante				
> 63,3 % de CD33 ⁺	1,47 (0,75 – 2) p=0,18	-	1,54 (0,98 – 1,92) p=0,12	-
> 111,6 cel/μL	2,31 (1,17 – 4,58), p=0,01	2,17 (1,02 – 4,61) p=0,04	2,80 (1,31 – 6,01) p=0,008	2,41 (1,06 – 5,47) p=0,035
M-MDSC 14d Post-trasplante				
> 23,7 % de CD33 ⁺	1,55 (0,82 – 2,93) p=0,18	-	1,51 (0,76 – 3,01) p=0,24	-
> 50,8 cel/μL	1,44 (1,74 – 2,82), p=0,28	-	2,80 (1,31 – 6,01) p=0,084	-
M-MDSC 1m Post-trasplante				
> 22,5 % de CD33 ⁺	1,31 (0,69 – 2,49) p=0,41	-	1,04 (0,53 – 2,05) p=0,91	-
> 84,6 cel/μL	2,24 (1,13 – 4,46), p=0,02	1,77 (0,78 – 4,01) p=0,18	2,68 (1,27 – 5,62) p=0,009	2,12 (0,99 – 4,51) p=0,052

Para el análisis multivariante se consideraron las variables significativas en el análisis univariante.
ATG, globulina anti-timocítica; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. [#]Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)

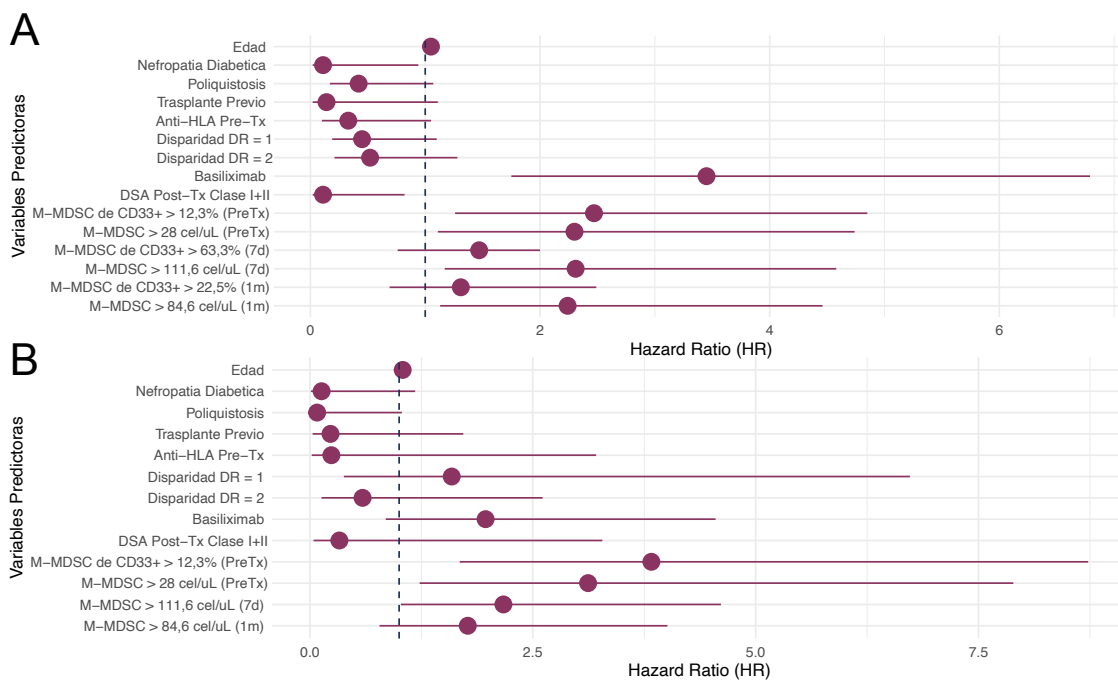


Figura 31. Forest plot de los Hazard Ratio (HR) para la aparición de neoplasia en el post-trasplante. (A) HR correspondientes a la regresión de cox univariante y (B) multivariante. Se muestra el HR con el intervalo de confianza al 95 % correspondientes a la edad, nefropatía diabética, poliquistosis, trasplante previo, anticuerpos anti-HLA pre-trasplante, disparidad en HLA-DR, basiliximab como terapia de inducción, anticuerpos anti HLA DSA post-trasplante, y el porcentaje sobre células mieloides y recuento de M-MDSC pre-trasplante (PreTx), a los 7 días (7d) y al mes (1m) post-trasplante.

La estratificación de los pacientes en dos grupos según los puntos de corte establecidos por las curvas ROC, reveló, mediante análisis de Kaplan-Meier, que aquellos receptores con niveles elevados de M-MDSC presentaron una menor SLM en comparación con los pacientes con niveles bajos (**Figura 32B-E**). A los 9 años, la SLM para los grupos con M-MDSC elevadas fue de 71 % (61 – 84), 75 % (66 – 85), 73 % (65 – 83) y 71 % (62 – 82) para los puntos de corte de > 12,3 % de CD33+ pre-trasplante, > 28 células/ μ L pre-trasplante, > 111,6 células/ μ L a los 7 días post-trasplante y > 84,6 células/ μ L al mes post-trasplante (**Tabla 13**), respectivamente; mientras que los grupos con niveles bajos de M-MDSC superaron el 85 % en todos los casos.

Resumiendo, la edad y niveles elevados de M-MDSC en el pre-trasplante y a los 7 días post-trasplante emergieron como los únicos factores de riesgo independientes de aparición de neoplasia, aunque la terapia de inducción permitía estratificar a los pacientes de forma que los RTR tratados con basiliximab presentaban menor SLM.

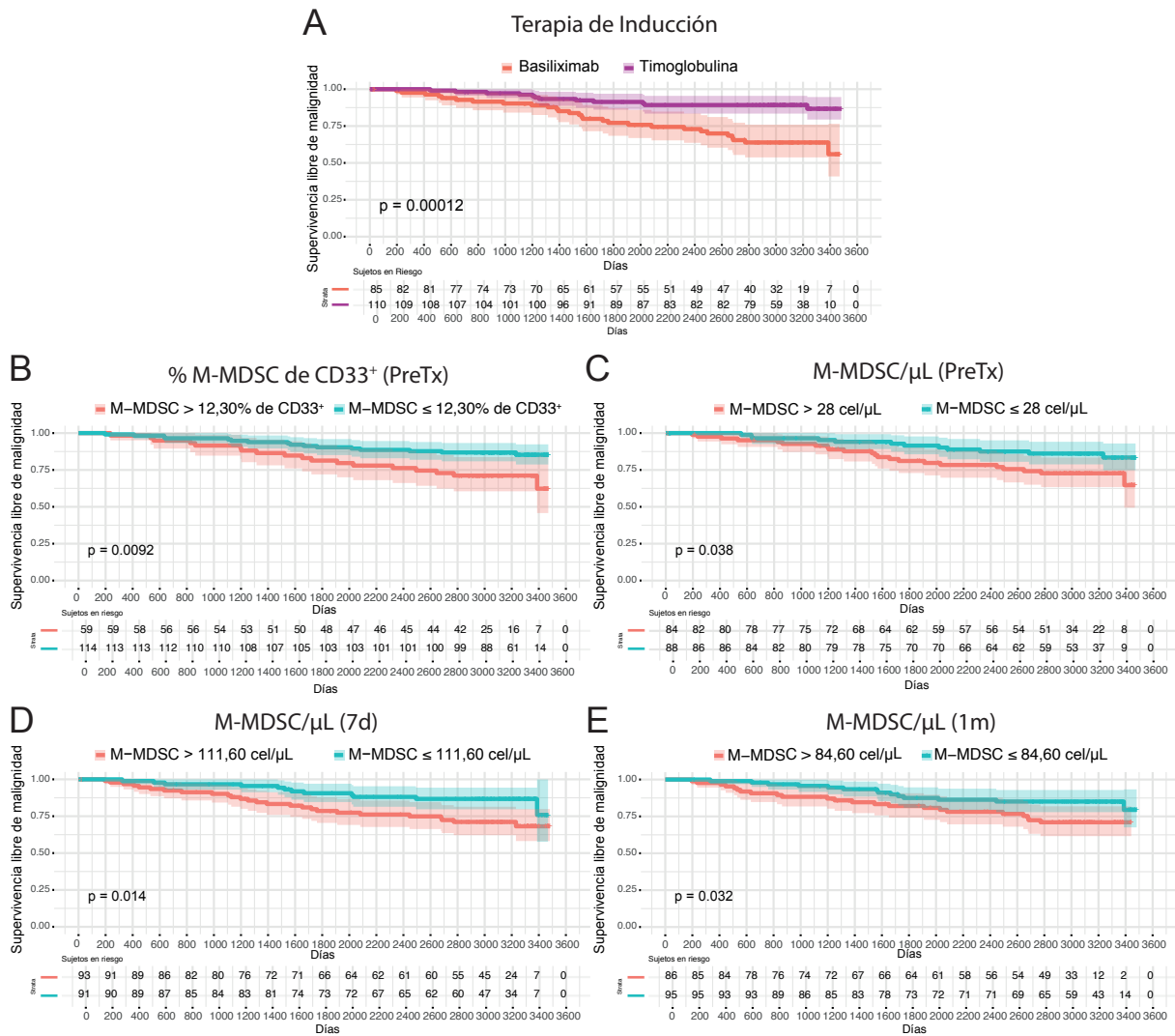


Figura 32. RTR con niveles altos de M-MDSC presentan menor supervivencia libre de malignidad. Gráficas Kaplan Meier estratificando a los pacientes en función de (A) la terapia de inducción, (B) los niveles de M-MDSC sobre células mieloides CD33⁺ en el pre-trasplante, (C) recuento de M-MDSC en el pre-trasplante (D) recuento de M-MDSC 7 días post-trasplante, y (E) recuento de M-MDSC un mes post-trasplante. El color sombreado representa el intervalo de confianza al 95 %. El tiempo se representa en días.

3.6. Perfil de las M-MDSC en receptores renales con distintos tipos de tumor

En la cohorte de RTR analizada el tipo tumoral más frecuente fue el carcinoma cutáneo basocelular, con una prevalencia del 26,09 %, seguido del carcinoma cutáneo epidermoide (23,91 %) y el adenocarcinoma de páncreas (8,70 %). (Tabla 15). Con base en esta distribución, los pacientes se agruparon en tres categorías: i) carcinoma cutáneo basocelular o epitelioma (CCB); ii) carcinoma cutáneo epidermoide o escamoso (CCE); y iii) tumores no cutáneos

(TNC), que incluyeron el resto de las neoplasias, en órganos internos, suponiendo el 50 % de los casos restantes. La mediana de tiempo desde el trasplante hasta el diagnóstico de cáncer fue de 1337 (729 – 2124) días para el grupo CCB, 1664 (1208 – 2588) para CCE y 1315 (728 – 1686) para TNC.

Tabla 15. Clasificación de las neoplasias desarrolladas por los RTR

Tipo neoplasia	n (%)
Carcinoma Cutáneo Basocelular (epitelioma)	12 (26,09 %)
Carcinoma Cutáneo Epidermoide (escamoso)	11 (23,91 %)
Adenocarcinoma de páncreas	4 (8,70 %)
Adenocarcinoma Pulmón	3 (6,52 %)
Carcinoma Páncreas (de células acinosas)	3 (6,52 %)
Carcinoma Colón	2 (4,35 %)
Carcinoma Renal de células claras	2 (4,35 %)
Adenocarcinoma Intestino grueso	1 (2,17 %)
Carcinoma Pulmón (microcítico)	1 (2,17 %)
Carcinoma Pulmón (no microcítico)	1 (2,17 %)
Carcinoma Urotelial	1 (2,17 %)
Hepatocarcinoma	1 (2,17 %)
Hipoplasia de células germinales	1 (2,17 %)
Mieloma múltiple	1 (2,17 %)
Tumor carcinoide de duodeno	1 (2,17 %)
Adenocarcinoma Sitio primario desconocido	1 (2,17 %)

Para cada tumor, se incluye el número de pacientes (n) y el porcentaje (%) con respecto al total de RTR con neoplasia post-trasplante.

Se evaluaron primero las tasas de M-MDSC (porcentaje dentro de la población mieloide) en los tres grupos de pacientes. Los receptores con CCB mostraron valores similares al grupo sin neoplasia durante todo el primer año post-trasplante. Por el contrario, los pacientes con CCE o TNC presentaron niveles significativamente más elevados en comparación con el grupo sin cáncer en la medición pre-trasplante. En el grupo CCE, las M-MDSC se encontraron elevadas también al mes post-trasplante. A los seis meses, los pacientes con CCE presentaron niveles de M-MDSC significativamente más bajos que el grupo TNC de tumores internos (**Figura 33A**).

Cuando los niveles de M-MDSC se analizaron en valores absolutos, se observó que los pacientes con CCE presentaban concentraciones significativamente más altas en el pre-trasplante frente al grupo sin neoplasia, así como niveles superiores a los del grupo CCB a los 14 días post-trasplante. Nuevamente, a los seis meses post-trasplante, los niveles de M-MDSC en el grupo CCE fueron significativamente inferiores a los observados en el grupo TNC (**Figura 33B**).

En conjunto este análisis sugiere que el riesgo que confieren las M-MDSC elevadas en el peritransplante para la aparición de cáncer, favorece, principalmente, la aparición de CCE y TNC, pero no la de CCB.

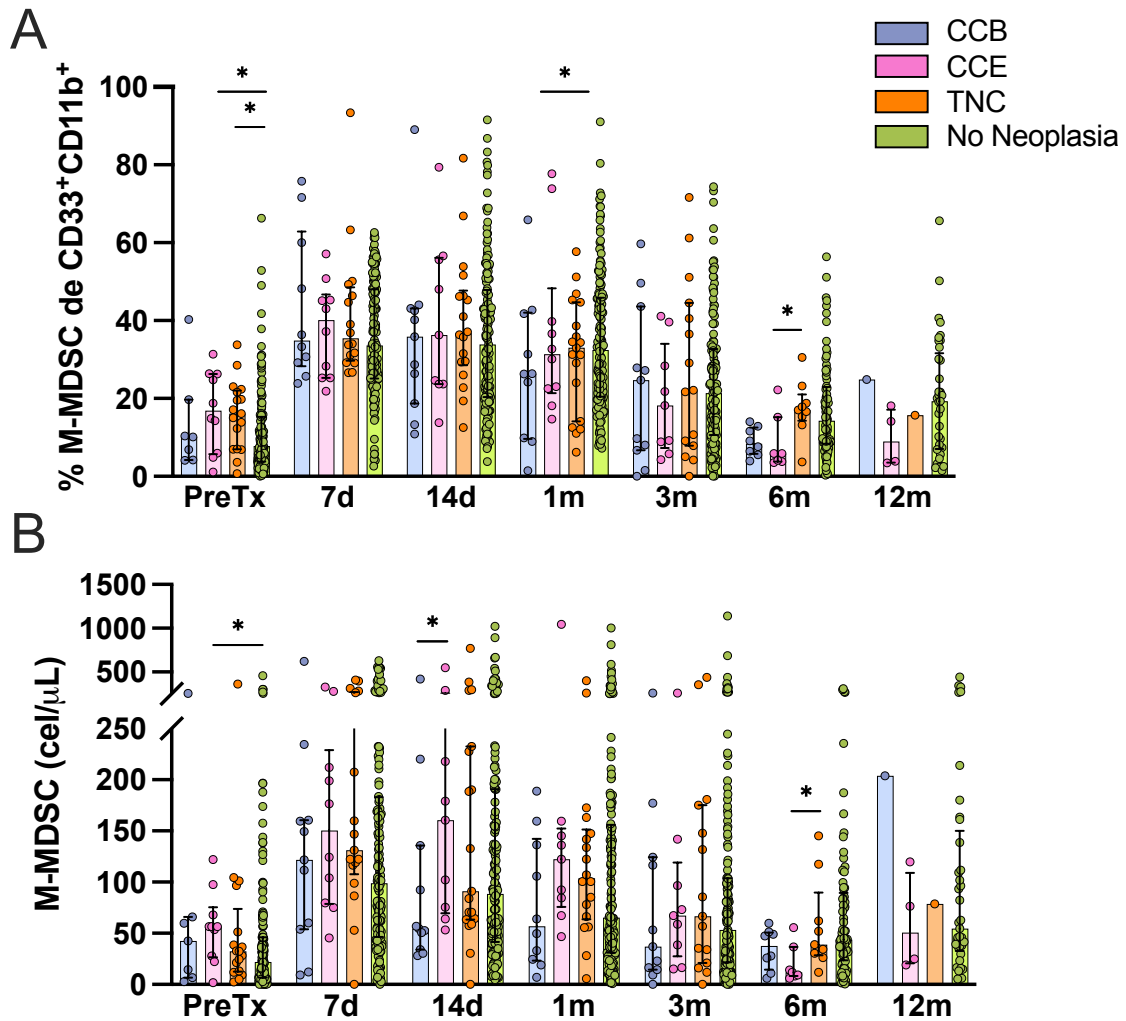


Figura 33. Dinámica de las M-MDSC en RTR clasificados en función del tipo de tumor desarrollado post-trasplante. (A) Porcentaje sobre células mieloides y (B) recuento absoluto de M-MDSC en RTR durante el primer año post-trasplante. Todos los parámetros se muestran como mediana y rango intercuartílico. La evolución temporal de las poblaciones celulares se analizó mediante un modelo de regresión de efectos mixtos para datos continuos. Las comparaciones entre grupos se realizaron con el estadístico U de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$. Pre, pre-trasplante; 7d, 7 días post-trasplante; 14d, 14 días post-trasplante; 1m, 1 mes post-trasplante; 3m, 3 meses post-trasplante; 6m, 6 meses post-trasplante; 12m, 12 meses post-trasplante.

3.7. La edad es el único factor de riesgo independiente para la aparición de carcinoma cutáneo basocelular en RTR

Los pacientes que desarrollaron CCB durante el seguimiento post-trasplante tenían mayor edad y más antecedentes oncológicos previos al trasplante, en comparación con los receptores sin tumores. Asimismo, se observó una mayor proporción de pacientes que recibieron basiliximab como terapia de inducción, mientras que la ATG fue el tratamiento más frecuente en el grupo sin neoplasia. No se encontraron diferencias significativas en el resto de las variables analizadas (Tabla 16).

Tabla 16. Características de los RTR con carcinoma cutáneo basocelular.

	CCB (n=12)	No Neoplasia (n=180)	P
Características demográficas e historia clínica			
Edad, mediana (IQR)	67 (58 – 78)	54 (42 – 63)	0,005
Sexo, mujer	3 (25 %)	56 (31,11 %)	0,90
Enfermedad de Base			0,78
Amiloidosis	0	2 (1,11 %)	
Glomerulonefritis focal y segmentaria	0	12 (6,67 %)	
Glomerulonefritis membranoproliferativa	0	7 (3,89 %)	
Otra Glomerulonefritis	1 (8,33 %)	11 (6,11 %)	
Nefroangioesclerosis hipertensiva	0	13 (7,22 %)	
Nefropatía diabética	3 (25 %)	41 (22,78 %)	
Nefropatía IgA	0	15 (8,33 %)	
Nefropatía reflujo	0	7 (3,89 %)	
Otra Nefropatía	0	7 (3,89 %)	
Poliquistosis	3 (25 %)	23 (12,78 %)	
Vasculitis	1 (8,33 %)	7 (3,89 %)	
Tubulointersticial	1 (8,33 %)	7 (3,89 %)	
Otra	2 (16,67 %)	17 (9,44 %)	
Desconocida	1 (8,33 %)	19 (10,56 %)	
Hepatitis Crónica	1 (8,33 %)	16 (8,89 %)	1
Cáncer previo al trasplante	3 (25 %)	8 (4,44 %)	0,02
Diálisis previa al trasplante			0,99
No	1 (8,33 %)	17 (9,44 %)	
Diálisis Peritoneal	2 (16,67 %)	30 (16,57 %)	
Hemodiálisis	8 (66,67 %)	132 (73,48 %)	
Días en Diálisis	240 (135 – 510)	510 (240 – 960)	0,12
Características del trasplante			
Tipo de Donante			0,40
Asistolia	2 (16,67 %)	47 (26,11 %)	
Muerte Encefálica	7 (58,33 %)	111 (61,67 %)	
Donante Vivo	3 (25 %)	22 (12,22 %)	
Trasplante Previo, no	12 (100 %)	153 (85 %)	0,31

Tipo de Trasplante			0,65
Renal	12 (100 %)	168 (93,33 %)	
Hepato-Renal	0	8 (4,44 %)	
Páncreas-Riñón	0	4 (2,22 %)	
Anti-HLA Pre-trasplante, si	2 (16,67 %)	36 (20 %)	1
Disparidad HLA (ABDR)			0,49
< 3	3 (25 %)	24 (13,13 %)	
≥ 3	9 (75 %)	156 (86,67 %)	
Disparidad HLA-B			
0	1 (8,33 %)	15 (8,33 %)	
1	5 (41,67 %)	63 (35 %)	
2	6 (50 %)	102 (56,67 %)	
Disparidad HLA-DR			
0	1 (8,33 %)	24 (13,13 %)	
1	7 (58,33 %)	69 (38,33 %)	
2	4 (33,33 %)	87 (48,33 %)	
Funcionalidad del Injerto			0,85
Inmediata	5 (41,67 %)	89 (48,44 %)	
Retrasada	7 (58,33%)	91 (50,56 %)	
Inmunosupresión			
Inducción			0,035
ATG	4 (33,33 %)	98 (54,44 %)	
Basiliximab	8 (66,67 %)	57 (31,67 %)	
No Inducción	0	25 (13,89 %)	
Mantenimiento¹			
Tac	1 (8,33 %)	7 (3,89 %)	1
Tac+MMF+Corticoides	9 (75 %)	115 (63,89 %)	0,64
Tac+MMF	1 (8,33 %)	15 (8,30 %)	1
Tac+Corticoides	1 (8,33 %)	27 (15 %)	0,52
Tac+Corticoides+Otros [#]	0	16 (8,89 %)	0,59
Evolución post-trasplante			
DSA <i>de novo</i> post-trasplante, si	1 (8,33 %)	16 (8,89 %)	1
Perdida del injerto	0	22 (12,22 %)	0,39
Rechazo	1 (8,33 %)	29 (16,11 %)	0,71
Exitus	5 (41,67 %)	47 (26,11 %)	0,42

Las variables numéricas se representan como mediana y rango intercuartílico. Las variables categóricas se representan como tamaño y porcentaje. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney para las variables numéricas y con la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas.

CCB, carcinoma cutáneo basocelular; IQR, rango intercuartílico; GN, glomerulonefritis; ATG, globulina anti-timocítica; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato.

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. [#]Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)

En la regresión de Cox para la aparición de CCB, la edad fue el único factor de riesgo independiente identificado. En concreto, cada incremento de un año se asoció con un aumento del 8 % en el riesgo de aparición de este tipo de carcinoma. El antecedente de cáncer previo al trasplante también emergió como un factor de riesgo relevante en el análisis univariante, con un HR de 5,87 (IC 95 %: 1,58–21,7); sin embargo, esta asociación no se mantuvo en el modelo

multivariante ni en el análisis de riesgos competitivos. De forma similar, los pacientes que recibieron basiliximab como terapia de inducción presentaron un riesgo 3,49 veces mayor de desarrollar CCB en comparación con aquellos tratados con ATG. Esta asociación fue consistente en el análisis de riesgos competitivos, aunque no alcanzó significación estadística en los modelos multivariantes. No encontramos una asociación significativa con la presencia de niveles elevados de M-MDSC en ninguno de los tiempos evaluados (**Tabla 17**).

Tabla 17. Hazard Ratio (HR) e intervalo de confianza al 95 % para la aparición de carcinoma cutáneo basocelular en el post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes

	Log-Rank		Riesgos Competitivos (Fine + Gray)	
	Univariante	Multivariante	Univariante	Multivariante
Características Clínicas				
Edad	1,08 (1,03 – 1,14), p=0,002	1,07 (1,01 – 1,12), p=0,02	1,05 (1,01 – 1,11), p=0,04	1,03 (0,98 – 1,08), p=0,21
Sexo (mujer)	0,71 (0,19 – 2,62), p=0,60	-	0,84 (0,22 – 3,21), p=0,80	-
Hepatitis Crónica	0,91 (0,12 – 7,04), p=0,93	-	0,99 (0,13 – 7,56), p=0,99	-
Cáncer previo	5,87 (1,58 – 21,7), p=0,008	4,80 (0,95 – 19,15), p=0,07	3,84 (0,84 – 17,4), p=0,08	-
Diálisis				
Hemodiálisis	1,10 (0,14 – 8,76), p=0,93	-	0,88 (0,11 – 7,15), p=0,90	-
Peritoneal	1,09 (0,10 – 12,05), p=0,94	-	1,05 (0,10 – 11,6), p=0,97	-
Días en diálisis	0,99 (0,99 – 1), p=0,40	-	1 (-), p=0,49	-
Características del Trasplante				
Tipo Donante (vs vivo)				
Asistolia	0,35 (0,06 – 2,13), p=0,26	-	0,31 (0,05 – 1,80), p=0,19	-
Muerte Encefálica	0,56 (0,14 – 2,13), p=0,39	-	0,41 (0,10 – 1,65), p=0,21	-
Trasplante Previo	0,01 (0 – Inf), p=1	-	-	-
Anti-HLA pre-trasplante	0,86 (0,19 – 3,93), p=0,85	-	0,42 (0,05 – 3,33), p=0,41	-
Mismatch < 3	2,05 (0,56 – 7,59), p=0,28	-	2,41 (0,64 – 9,03), p=0,19	-
Disparidad B				
1	0,41 (0,05 – 3,97), p=0,43	-	0,40 (0,04 – 4,07), p=0,44	-
2	0,36 (0,04 – 3,05), p=0,35	-	0,43 (0,05 – 3,93), p=0,45	-
Disparidad DR				
1	1,70 (0,21 – 14,17), p=0,62	-	1,36 (0,16 – 11,70), p=0,78	-
2	0,84 (0,09 – 8,11), p=0,88	-	0,77 (0,08 – 7,36), p=0,82	-

Immunosupresión				
Inducción (vs ATG)				
No Inducción	0 (0 – Inf), p=1	-	-	-
Basiliximab	3,49 (1,05 – 11,6), p=0,04	2,75 (0,64 – 15,4), p=0,13	4,36 (1,16 – 16,4), p=0,03	3,17 (0,76 – 13,3), p=0,11
Mantenimiento¹				
Tac	1,82 (0,23 – 14,18), p=0,57	-	2,30 (0,30 – 17,8), p=0,42	-
Tac + MMF + Corticoides	1,77 (0,48 – 6,53), p=0,39	-	2,60 (0,56 – 12), p=0,22	-
Tac + MMF	1,02 (0,13 – 7,89), p=0,99	-	1,08 (0,14 – 8,06), p=0,94	-
Tac + Corticoides	0,36 (0,05 – 2,74), p=0,32	-	-	-
Evolución post-trasplante				
DSA post-trasplante				
Clase I	4 (0,85 – 18,81), p=0,08	-	1,90 (0,23 – 15,4), p=0,55	-
Clase II	0,44 (0,06 – 3,45), p=0,43	-	0,46 (0,06 – 3,70), p=0,47	-
Rechazo	0,44 (0,06 – 3,38), p=0,43	-	-	-
M-MDSC				
M-MDSC Pre-trasplante				
> 12,30 % de CD33⁺	1,11 (0,21 – 5,76), p=0,90	-	0,51 (0,06 – 4,36), p=0,54	-
> 28 cel/μL	1,68 (0,38 – 7,54), p=0,49	-	1,29 (0,27 – 6,08), p=0,75	-
M-MDSC 7d Post-trasplante				
> 63,3 % de CD33⁺	1,07 (0,33 – 3,52), p=0,91	-	1,32 (0,37 – 4,74), p=0,67	-
> 111,6 cel/μL	1,99 (0,58 – 6,83), p=0,27	-	2,76 (0,71 – 10,70), p=0,14	-
M-MDSC 14d Post-trasplante				
> 23,7 % de CD33⁺	1,46 (0,44 – 4,80), p=0,53	-	1,14 (0,32 – 4,10), p=0,84	-
> 50,8 cel/μL	0,48 (0,14 – 1,65), p=0,24	-	0,54 (0,16 – 1,87), p=0,33	-
M-MDSC 1m Post-trasplante				
> 22,5 % de CD33⁺	0,62 (0,18 – 2,22), p=0,47	-	0,45 (0,11 – 1,80), p=0,26	-
> 84,6 cel/μL	0,87 (0,25 – 3,08), p=0,83	-	1,05 (0,28 – 3,87), p=0,95	-

Para el análisis multivariante se consideraron las variables significativas en el análisis univariante.
ATG, globulina anti-timocítica; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. #Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)

3.8. Las M-MDSC elevadas predicen la aparición de carcinoma cutáneo epidermoide en RTR

En cuanto a las características clínicas de los pacientes que desarrollaron CCE, se observó que la mayoría habían sido tratados con basiliximab como terapia de inducción, en comparación con los RTR sin cáncer, quienes fueron tratados mayoritariamente con ATG. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en el resto de las variables clínicas o inmunológicas evaluadas (Tabla 18).

Tabla 18. Características de los RTR con carcinoma cutáneo epidermoide

	CCE (n=11)	No Neoplasia (n=180)	p
Características demográficas e historia clínica			
Edad, mediana (IQR)	66 (57 – 68)	54 (42 – 63)	0,054
Sexo, mujer	3 (27,27 %)	56 (31,11 %)	1
Enfermedad de Base			0,59
Amiloidosis	0	2 (1,11 %)	
Glomerulonefritis focal y segmentaria	0	12 (6,67 %)	
Glomerulonefritis membranoproliferativa	0	7 (3,89 %)	
Otra Glomerulonefritis	3 (27,27 %)	11 (6,11 %)	
Nefroangioesclerosis hipertensiva	1 (9,09 %)	13 (7,22 %)	
Nefropatía diabética	1 (9,09 %)	41 (22,78 %)	
Nefropatía IgA	2 (18,18 %)	15 (8,33 %)	
Nefropatía reflujo	1 (9,09 %)	7 (3,89 %)	
Otra Nefropatía	0	7 (3,89 %)	
Poliquistosis	1 (9,09 %)	23 (12,78 %)	
Vasculitis	0	7 (3,89 %)	
Tubulointerstial	0	7 (3,89 %)	
Otra	1 (9,09 %)	17 (9,44 %)	
Desconocida	1 (9,09 %)	19 (10,56 %)	
Hepatitis Crónica	2 (18,18 %)	16 (8,89 %)	0,62
Cáncer previo al trasplante	0	8 (4,44 %)	1
Diálisis previa al trasplante			0,79
No	1 (9,09 %)	17 (9,44 %)	
Diálisis Peritoneal	1 (9,09 %)	30 (16,57 %)	
Hemodiálisis	9 (81,82 %)	132 (73,48 %)	
Días en Diálisis	225 (210 - 638)	510 (240 – 960)	0,18
Características del trasplante			
Tipo de Donante			0,14
Asistolia	1 (9,09 %)	47 (26,11 %)	
Muerte Encefálica	10 (90,91 %)	111 (61,67 %)	
Donante Vivo	0	22 (12,22 %)	
Trasplante Previo, no	11 (100 %)	153 (85 %)	0,35
Tipo de Trasplante			0,68
Renal	11 (100 %)	168 (93,33 %)	
Hepato-Renal	0	8 (4,44 %)	
Páncreas-Riñón	0	4 (2,22 %)	
Anti-HLA Pre-trasplante, si	0	36 (20 %)	0,22

			0,45
Disparidad HLA (ABDR)			
< 3	0	24 (13,13 %)	
≥ 3	11 (100 %)	156 (86,67 %)	
Disparidad HLA-B			0,73
0	0	15 (8,33 %)	
1	4 (36,36 %)	63 (35 %)	
2	7 (63,64 %)	102 (56,67 %)	
Disparidad HLA-DR			0,41
0	1 (9,09 %)	24 (13,13 %)	
1	7 (63,64 %)	69 (38,33 %)	
2	3 (27,27 %)	87 (48,33 %)	
Funcionalidad del Injerto			0,53
Inmediata	7 (63,64 %)	89 (48,44 %)	
Retrasada	4 (36,36 %)	91 (50,56 %)	
Inmunosupresión			
Inducción			0,019
ATG	2 (18,18 %)	98 (54,44 %)	
Basiliximab	8 (72,73 %)	57 (31,67 %)	
No Inducción	1 (9,09 %)	25 (13,89 %)	
Mantenimiento¹			
Tac	2 (18,18 %)	7 (3,89 %)	0,15
Tac+MMF+Corticoides	4 (36,36 %)	115 (63,89 %)	0,13
Tac+MMF	1 (9,09 %)	15 (8,30 %)	1
Tac+Corticoides	3 (27,27 %)	27 (15 %)	0,88
Tac+Corticoides+Otros [#]	1 (9,09 %)	16 (8,89 %)	1
Evolución post-trasplante			
DSA <i>de novo</i> post-trasplante, si	0	16 (8,89 %)	0,62
Perdida del injerto	0	22 (12,22 %)	0,43
Rechazo	1 (9,09 %)	29 (16,11 %)	0,80
Exitus	3 (27,27 %)	47 (26,11 %)	1

Las variables numéricas se representan como mediana y rango intercuartílico. Las variables categóricas se representan como tamaño y porcentaje. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney para las variables numéricas y con la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas.

CCE, carcinoma cutáneo epidermoide; IQR, rango intercuartílico; GN, glomerulonefritis; ATG, globulina anti-timocítica; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. [#]Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)

Al analizar la asociación de las diferentes variables al riesgo de desarrollar CCE, tanto la edad como los niveles elevados de M-MDSC en el pre-trasplante emergieron como los únicos factores de riesgo independientes. En el modelo multivariante, la edad presentó un HR de 1,08 (IC 95 %: 1,02 – 1,15), lo que implica un incremento del 8 % del riesgo por cada año adicional. M-MDSC altas, en porcentaje sobre células mieloides y como recuento total en el pre-trasplante se asociaron con HR de 4,29 (IC 95 %: 1,10 – 16,76), y 3,80 (IC 95 %: 1,15 – 17,99), respectivamente (**Tabla 13**). Asimismo, M-MDSC altas al mes post-trasplante se asociaron con un HR de 5,66 (IC 95 %: 1,09 – 29,34) en el modelo univariante, aunque esta asociación no alcanzó significación estadística en el modelo multivariante (**Tabla 19, Figura 34**).

De nuevo, el uso de basiliximab como terapia de inducción se asoció con un aumento significativo del riesgo en el análisis univariante (6,59 (1,40 – 31,07)), aunque esta asociación perdió significación tras el ajuste multivariante. A pesar de ello, el análisis de Kaplan-Meier mostró diferencias en la SLM según el tipo de inducción, con una SLM significativamente menor en los pacientes tratados con basiliximab frente a aquellos que recibieron ATG (**Figura 35A**). A los 9 años, la SLM fue del 89 % (82–97) en los pacientes tratados con basiliximab, en comparación con el 99 % (96–100) en los tratados con ATG.

El análisis de riesgos competitivos mostró resultados concordantes con los obtenidos mediante regresión de Cox, con la excepción de las M-MDSC > 84,6 células/μL al mes post-trasplante, que sí se confirmaron como un factor de riesgo independiente significativo en el modelo multivariante (**Tabla 19**).

Cabe señalar que la enfermedad de base, el historial de cáncer previo, el tipo de donante, la presencia de anticuerpos anti-HLA pre-trasplante, las incompatibilidades en HLA-B y la presencia de DSA post-trasplante no pudieron ser incluidas en este análisis por tener HR no interpretables (0 o infinito), resultado de la ausencia de eventos en alguno de los niveles de dichas variables.

Tabla 19. Hazard Ratio (HR) e intervalo de confianza al 95 % para la aparición de carcinoma cutáneo epidermoide en el post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes

	Log-Rank		Riesgos Competitivos (Fine + Gray)	
	Univariante	Multivariante	Univariante	Multivariante
Características Clínicas				
Edad	1,06 (1,01 – 1,11), p=0,02	1,08 (1,02 – 1,15), p=0,005	1,03 (1,01 – 1,08), p=0,006	1,03 (1,01 – 1,06), p=0,04
Sexo (mujer)	0,83 (0,22 – 3,13), p=0,78	-	0,96 (0,25 – 3,66), p=0,95	-
Hepatitis Crónica	2,07 (0,45 – 9,61), p=0,35	-	1,02 (0,13 – 8,15), p=0,99	-
Diálisis				
Hemodiálisis	1,33 (0,17 – 10,49), p=0,79	-	1,04 (0,14 – 7,59), p=0,97	-
Peritoneal	0,61 (0,04 – 9,72), p=0,73	-	0,56 (0,03 – 8,94), p=0,68	-
Días en diálisis	0,99 (0,99 – 1), p=0,24	-	1 (-), p=0,10	-
Características del Trasplante				
Disparidad DR				
1	2,02 (0,25 – 16,43), p=0,51	-	1,87 (0,24 – 14,7), p=0,55	-
2	0,87 (0,09 – 8,43), p=0,91	-	0,51 (0,05 – 5,62), p=0,59	-

Immunosupresión				
Inducción (vs ATG)				
No Inducción	1,68 (0,15 – 18,61), p=0,67	-	1,82 (0,17 – 20,1), p=0,62	-
Basiliximab	6,59 (1,40 – 31,07), p=0,02	8,79 (0,99 – 77,40), p=0,05	5,30 (1,12 – 25,10), p=0,04	5,41 (0,99 – 12), p=0,13
Mantenimiento¹				
Tac	3,84 (0,83 – 17,82), p=0,09	-	4,90 (0,95 – 22,2), p=0,08	-
Tac + MMF + Corticoides	0,36 (0,1 – 1,22), p=0,1	-	0,26 (0,07 – 1), p=0,06	-
Tac + MMF	1,12 (0,15 – 8,72), p=0,92	-	1,15 (0,17 – 7,66), p=0,89	-
Tac + Corticoides	1,42 (0,38 – 5,38), p=0,60	-	1,61 (0,41 – 6,37), p=0,50	-
Tac + Corticoides + Otro*	3,31 (0,88 – 12,48), p=0,08	-	4,16 (0,96 – 16,3), p=0,06	-
Evolución post-trasplante				
Rechazo	0,49 (0,06 – 3,79), p=0,49	-	-	-
M-MDSC				
M-MDSC Pre-trasplante				
> 12,30 % de CD33 ⁺	5,31 (1,37 – 20,56), p=0,02	4,29 (1,10 – 16,76), p=0,03	4,22 (1,08 – 16,5), p=0,03	3,82 (1,08 – 13,5), p=0,04
> 28 cel/μL	4,54 (1,12 – 21,39), p=0,03	3,80 (1,15 – 17,99), p=0,04	4,02 (1,05 – 19), p=0,02	3,59 (1,07 – 16,5), p=0,03
M-MDSC 7d Post-trasplante				
> 63,3 % de CD33 ⁺	1,28 (0,36 – 4,54), p=0,70	-	1,07 (0,29 – 3,89), p=0,92	-
> 111,6 cel/μL	1,70 (0,48 – 6,04), p=0,41	-	2,49 (0,66 – 9,43), p=0,18	-
M-MDSC 14d Post-trasplante				
> 23,7 % de CD33 ⁺	1,62 (0,43 – 6,08), p=0,48	-	2,02 (0,51 – 7,92), p=0,31	-
> 50,8 cel/μL	5,99 (0,75 – 47,93), p=0,09	-	6,15 (0,80 – 56,41), p=0,13	-
M-MDSC 1m Post-trasplante				
> 22,5 % de CD33 ⁺	1,49 (0,98 – 5,34), p=0,05	-	1,20 (0,34 – 4,28), p=0,78	-
> 84,6 cel/μL	5,66 (1,09 – 29,34), p=0,04	5,25 (0,99 – 28,04), p=0,05	4,61 (1,07 – 19,9), p=0,04	4,09 (1,04 – 17,2), p=0,04

Para el análisis multivariante se consideraron las variables significativas en el análisis univariante.

ATG, globulina anti-timocítica; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. #Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)

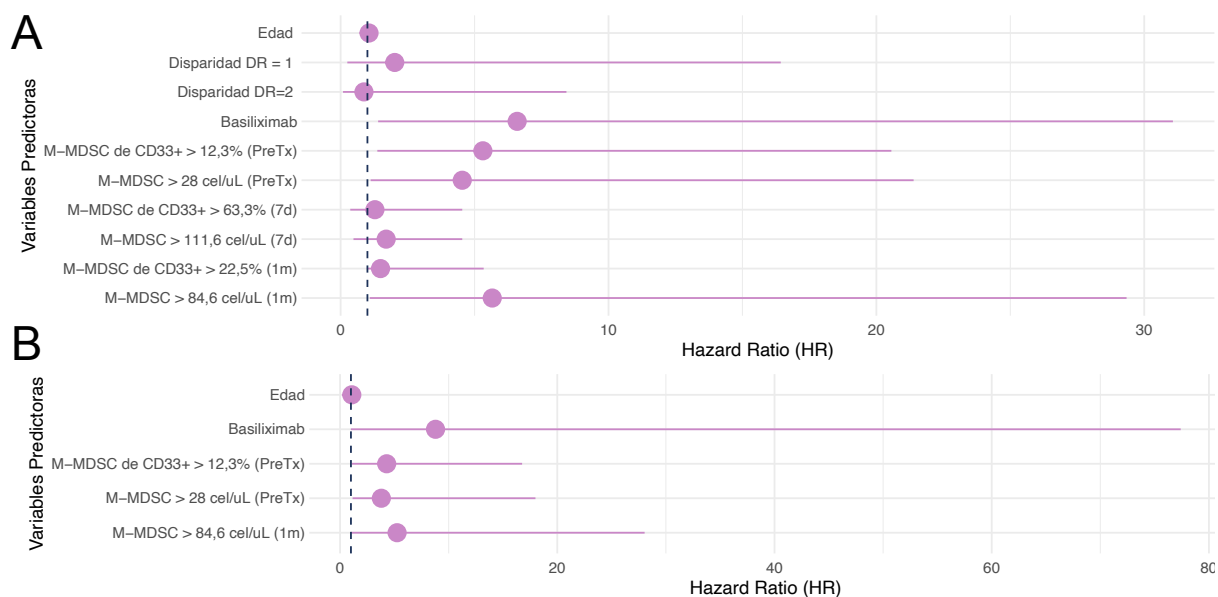


Figura 34. Forest plot de los Hazard Ratio (HR) para la aparición de carcinoma cutáneo epidermoide en el post-trasplante. (A) HR correspondientes a la regresión de cox univariante y (B) multivariante. Se muestra el HR con el intervalo de confianza al 95 % correspondientes a la edad, incompatibilidades en HLA-DR, basiliximab como terapia de inducción, y el porcentaje sobre células mieloides y recuento de M-MDSC pre-trasplante (PreTx), a los 7 días (7d) y al mes (1m) post-trasplante.

Finalmente, el análisis de Kaplan-Meier también confirmó que los pacientes con M-MDSC altas también presentaban una menor SLM en comparación con aquellos con niveles bajos. A los 9 años, la SLM fue del 88 % (79–98) para niveles de M-MDSC > 12,3 % dentro de las células mieloides en el pre-trasplante, 90 % (83–98) para > 28 células/ μ L en el pre-trasplante, y 89 % (82–96) para > 84,6 células/ μ L al mes post-trasplante, mientras que los pacientes con niveles por debajo de estos puntos de corte presentaron tasas de SLM superiores al 97 % en todos los casos (**Figura 35B-D**).

En resumen, la edad y los niveles elevados de M-MDSC en el pre-trasplante fueron los únicos factores de riesgo independientes para la aparición de CCE. El valor del riesgo aportado por las M-MDSC elevadas pre-trasplante fue superior al de la edad.

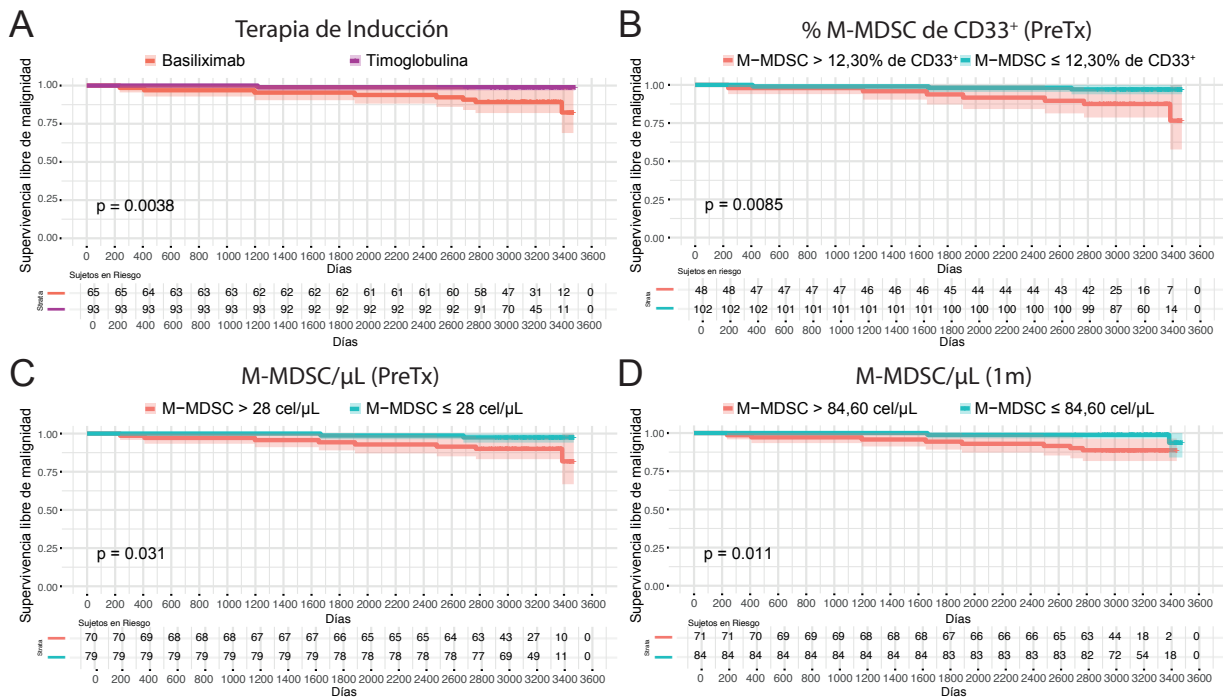


Figura 35. RTR con niveles altos de M-MDSC presentan menor supervivencia libre de malignidad. Gráficas Kaplan Meier estratificando a los pacientes en función de (A) la terapia de inducción, (B) los niveles de M-MDSC sobre células mieloides CD33⁺ en el pre-trasplante, (C) recuento de M-MDSC en el pre-trasplante (D) y recuento de M-MDSC un mes post-trasplante. El color sombreado representa el intervalo de confianza al 95 %. El tiempo se representa en días.

3.9. Las M-MDSC elevadas son un factor de riesgo independiente para la aparición de tumores profundos en pacientes con trasplante renal

En comparación con los pacientes que no hicieron neoplasias, aquellos clasificados como TNC, con tumores en órganos profundos, durante el seguimiento post-trasplante, tenían significativamente mayor edad, eran sobre todo hombres y con mayor frecuencia habían recibido basiliximab como terapia de inducción. Además, el grupo de TNC presentó una mayor tasa de mortalidad (Tabla 20).

Tabla 20. Características de los RTR con tumores no cutáneos en el post-trasplante.

	TNC (n=23)	No Neoplasia (n=180)	p
Características demográficas e historia clínica			
Edad, mediana (IQR)	62 (53 – 72)	54 (42 – 63)	0,009
Sexo, mujer	2 (8,70 %)	56 (31,11 %)	0,046
Enfermedad de Base			0,71
Amiloidosis	1 (4,35 %)	2 (1,11 %)	
Glomerulonefritis focal y segmentaria	1 (4,35 %)	12 (6,67 %)	
Glomerulonefritis membranoproliferativa	1 (4,35 %)	7 (3,89 %)	
Otra Glomerulonefritis	0	11 (6,11 %)	
Nefroangioesclerosis hipertensiva	3 (13,04 %)	13 (7,22 %)	
Nefropatía diabética	6 (26,09 %)	41 (22,78 %)	
Nefropatía IgA	2 (17,39 %)	15 (8,33 %)	
Nefropatía reflujo	0	7 (3,89 %)	
Otra Nefropatía	1 (4,35 %)	7 (3,89 %)	
Poliquistosis	1 (4,35 %)	23 (12,78 %)	
Vasculitis	0	7 (3,89 %)	
Tubulointersticial	2 (8,70 %)	7 (3,89 %)	
Otra	1 (4,35 %)	17 (9,44 %)	
Desconocida	4 (17,39 %)	19 (10,56 %)	
Hepatitis Crónica	4 (17,39 %)	16 (8,89 %)	0,36
Cáncer previo al trasplante	2 (8,70 %)	8 (4,44 %)	0,71
Diálisis previa al trasplante			0,38
No	1 (4,35 %)	17 (9,44 %)	
Diálisis Peritoneal	2 (8,70 %)	30 (16,57 %)	
Hemodiálisis	20 (87 %)	132 (73,48 %)	
Días en Diálisis	450 (240 – 660)	510 (240 – 960)	0,74
Características del trasplante			
Tipo de Donante			
Asistolia	3 (13,04 %)	47 (26,11 %)	
Muerte Encefálica	18 (78,26 %)	111 (61,67 %)	
Donante Vivo	2 (8,70 %)	22 (12,22 %)	
Trasplante Previo, no	22 (95,65 %)	153 (85 %)	0,28
Tipo de Trasplante			0,45
Renal	23 (100 %)	168 (93,33 %)	
Hepato-Renal	0	8 (4,44 %)	
Páncreas-Riñón	0	4 (2,22 %)	
Anti-HLA Pre-trasplante, si	1 (4,35 %)	36 (20 %)	0,12
Disparidad HLA (ABDR)			0,12
< 3	0	24 (13,13 %)	
≥ 3	23 (100 %)	156 (86,67 %)	
Disparidad HLA-B			0,55
0	0	15 (8,33 %)	
1	10 (43,58 %)	63 (35 %)	
2	13 (56,52 %)	102 (56,67 %)	
Disparidad HLA-DR			0,33
0	1 (4,35 %)	24 (13,13 %)	
1	14 (60,87 %)	69 (38,33 %)	
2	8 (34,78 %)	87 (48,33 %)	
Funcionalidad del Injerto			1
Inmediata	11 (47,83 %)	89 (48,44 %)	
Retrasada	12 (52,17 %)	91 (50,56 %)	

Inmunosupresión			
Inducción			0,038
ATG	6 (26,09 %)	98 (54,44 %)	
Basiliximab	12 (52,17 %)	57 (31,67 %)	
No Inducción	5 (21,74 %)	25 (13,89 %)	
Mantenimiento¹			
Tac	1 (4,35 %)	7 (3,89 %)	1
Tac+MMF+Corticoides	11 (47,83 %)	115 (63,89 %)	0,21
Tac+MMF	4 (17,39 %)	15 (8,30 %)	0,40
Tac+Corticoides	5 (21,74 %)	27 (15 %)	1
Tac+Corticoides+Otros [#]	2 (8,70 %)	16 (8,89 %)	1
Evolución post-trasplante			
DSA <i>de novo</i> post-trasplante, si	1 (4,35 %)	16 (8,89 %)	0,74
Pérdida del injerto	1 (4,35 %)	22 (12,22 %)	0,44
Rechazo	4 (17,39 %)	29 (16,11 %)	1
Exitus	13 (56,52 %)	47 (26,11 %)	0,006

Las variables numéricas se representan como mediana y rango intercuartílico. Las variables categóricas se representan como tamaño y porcentaje. La significación entre grupos se determinó con el estadístico U de Mann-Whitney para las variables numéricas y con la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas.

TNC, tumores no cutáneos; IQR, rango intercuartílico; GN, glomerulonefritis; ATG, globulina anti-timocítica; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. [#]Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)

La **Tabla 21** muestra los HR obtenidos en los análisis univariante y multivariante para las variables evaluadas, mientras que la **Figura 36** presenta un *forest plot* con los HR de las variables más relevantes.

Entre las variables clínicas, la edad se asoció con un incremento del 5 % en el riesgo de desarrollar TNC por cada año adicional, HR = 1,05 (IC 95 %: 1,01–1,10). Por el contrario, el sexo femenino junto con la nefropatía diabética y la poliquistosis renal como causas de la ERC se asociaron con un menor riesgo de aparición de TNC. De estos factores, únicamente la edad y la nefropatía diabética se mantuvieron como variables significativamente asociadas en el modelo multivariante, como factores de susceptibilidad y protección, respectivamente.

Por otro lado, el tratamiento con basiliximab, comparado con ATG, se asoció con un mayor riesgo de aparición de TNC en el análisis univariante, HR = 3,25 (IC 95 %: 1,21 – 8,65), aunque esta asociación no se mantuvo como significativa en el modelo multivariante. Sin embargo, el análisis de Kaplan-Meier mostró una menor SLM en los pacientes tratados con basiliximab, con una tasa de SLM a los 9 años del 83 %, en comparación con el 94 % en el grupo tratado con ATG (**Figura 37A**).

Los niveles elevados de M-MDSC se asociaron con un mayor riesgo de aparición de TNC, así, M-MDSC altas sobre el total de células mieloides en el pre-trasplante, y en recuento total a los 7 días y al mes post-trasplante (**Tabla 13**) emergieron como factores de riesgo independientes con HR de 2,95 (IC 95 %: 1,07 – 8,16), 3,43 (IC 95 %: 1,04 – 11,29) y 2,12 (IC 95 %: 1,05 – 6,68), respectivamente (**Tabla 21**). En cuanto al recuento absoluto de M-MDSC en el pre-trasplante, aunque mostró una tendencia hacia la significación, solo resultó significativo en el análisis univariante.

Tabla 21. Hazard Ratio (HR) e intervalo de confianza al 95 % para la aparición de tumores no cutáneos en el post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes

	Log-Rank		Riesgos Competitivos (Fine + Gray)	
	Univariante	Multivariante	Univariante	Multivariante
Características Clínicas				
Edad	1,05 (1,02 – 1,09), p=0,002	1,05 (1,01 – 1,09), p=0,008	1,05 (1,02 – 1,09), p=0,003	1,05 (1,01 – 1,10), p=0,02
Sexo (mujer)	0,22 (0,05 – 0,92), p=0,04	0,25 (0,06 – 1,08), p=0,06	0,30 (0,07 – 1,33), p=0,11	-
Enfermedad de Base				
Nefropatía diabética	0,25 (0,09 – 0,57), p=0,006	0,48 (0,02 – 0,54), p=0,02	0,19 (0,02 – 0,83), p=0,04	0,27 (0,02 – 4,19), p=0,35
Poliquistosis	0,05 (0,01 – 0,80), p=0,04	0,08 (0,01 – 1,50), p=0,09	0,09 (0,01 – 1,72), p=0,11	-
Hepatitis Crónica	2,03 (0,69 – 5,96), p=0,20	-	2,80 (0,93 – 8,45), p=0,07	-
Cáncer previo	1,79 (0,42 – 7,64), p=0,43	-	2,42 (0,60 – 9,70), p=0,21	-
Diálisis				
Hemodiálisis	2,59 (0,35 – 19,33), p=0,35	-	1,83 (0,25 – 13,6), p=0,55	-
Peritoneal	1,2 (0,11 – 13,23), p=0,88	-	1,14 (0,11 – 12,3), p=0,92	-
Días en diálisis	0,99 (0,99 – 1), p=0,49	-	1 (0,99 – 1), p=0,65	-
Características del Trasplante				
Tipo Donante (vs vivo)				
Asistolia	0,81 (0,14 – 4,87), p=0,82	-	0,73 (0,13 – 4,19), p=0,72	-
Muerte Encefálica	1,95 (0,45 – 8,40), p=0,37	-	1,26 (0,29 – 5,37), p=0,76	-
Trasplante Previo	0,28 (0,04 – 2,08), p=0,21	-	0,36 (0,05 – 2,73), p=0,32	-
Anti-HLA pre-trasplante	0,19 (0,03 – 1,45), p=0,11	-	0,26 (0,03 – 1,94), p=0,19	-
Disparidad DR				
1	2,96 (0,38 – 22,92), p=0,30	-	-	-
2	1,71 (0,21 – 14,21), p=0,62	-	-	-

Immunosupresión				
Inducción (vs ATG)				
No Inducción	2,99 (0,91 – 9,78), p=0,07	-	3,02 (0,79 – 11,5), p=0,10	-
Basiliximab	3,25 (1,21 – 8,65), p=0,02	2,04 (0,71 – 5,89), p=0,19	2,77 (0,94 – 8,20), p=0,05	-
Mantenimiento¹				
Tac	0,97 (0,13 – 7,18), p=0,97	-	1,39 (0,20 – 9,44), p=0,74	-
Tac + MMF + Corticoides	0,57 (0,25 – 1,28), p=0,17	-	0,60 (0,24 – 1,52), p=0,28	-
Tac + MMF	1,77 (0,93 – 7,47), p=0,12	-	2,84 (0,93 – 8,62), p=0,07	-
Tac + Corticoides	1,07 (0,39 – 2,87), p=0,89	-	0,76 (0,22 – 2,60), p=0,66	-
Tac + Corticoides + Otro*	1,41 (0,42 – 4,73), p=0,58	-	0,54 (0,08 – 3,86), p=0,54	-
Evolución post-trasplante				
DSA post-trasplante				
Clase I	0,88 (0,12 – 6,57), p=0,90	-	-	-
Clase II	1,16 (0,16 – 8,62), p=0,88	-	1,36 (0,17 – 10,6), p=0,77	-
Rechazo	1,07 (0,36 – 3,16), p=0,91	-	-	-
M-MDSC				
M-MDSC Pre-trasplante				
> 12,30 % de CD33⁺	2,55 (1,08 – 6,61), p=0,03	2,95 (1,07 – 8,16), p=0,04	3,32 (1,19 – 9,30), p=0,02	3,11 (1,11 – 8,68), p=0,03
> 28 cel/μL	2,69 (1,13 – 7,43), p=0,02	1,91 (0,92 – 5,03), p=0,09	1,77 (0,63 – 4,94), p=0,04	1,66 (0,79 – 4,69), p=0,14
M-MDSC 7d Post-trasplante				
> 63,3 % de CD33⁺	0,94 (0,36 – 2,43), p=0,19	-	0,70 (0,24 – 2,08), p=0,53	-
> 111,6 cel/μL	3,55 (1,16 – 10,88), p=0,03	3,43 (1,04 – 11,29), p=0,04	3,58 (0,99 – 13), p=0,05	-
M-MDSC 14d Post-trasplante				
> 23,7 % de CD33⁺	1,61 (0,65 – 4), p=0,31	-	1,62 (0,58 – 4,52), p=0,35	-
> 50,8 cel/μL	2,04 (0,73 – 5,65), p=0,17	-	2,79 (0,79 – 9,86), p=0,11	-
M-MDSC 1m Post-trasplante				
> 22,5 % de CD33⁺	2,48 (0,98 – 4,94), p=0,07	-	1,66 (0,57 – 4,84), p=0,35	-
> 84,6 cel/μL	2,84 (1,15 – 6,49), p=0,02	2,12 (1,05 – 6,68), p=0,03	4,53 (1,28 – 16,1), p=0,01	3,78 (1,07 – 13,3), p=0,03

Para el análisis multivariante se consideraron las variables significativas en el análisis univariante.

ATG, globulina anti-timocítica; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. #Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)

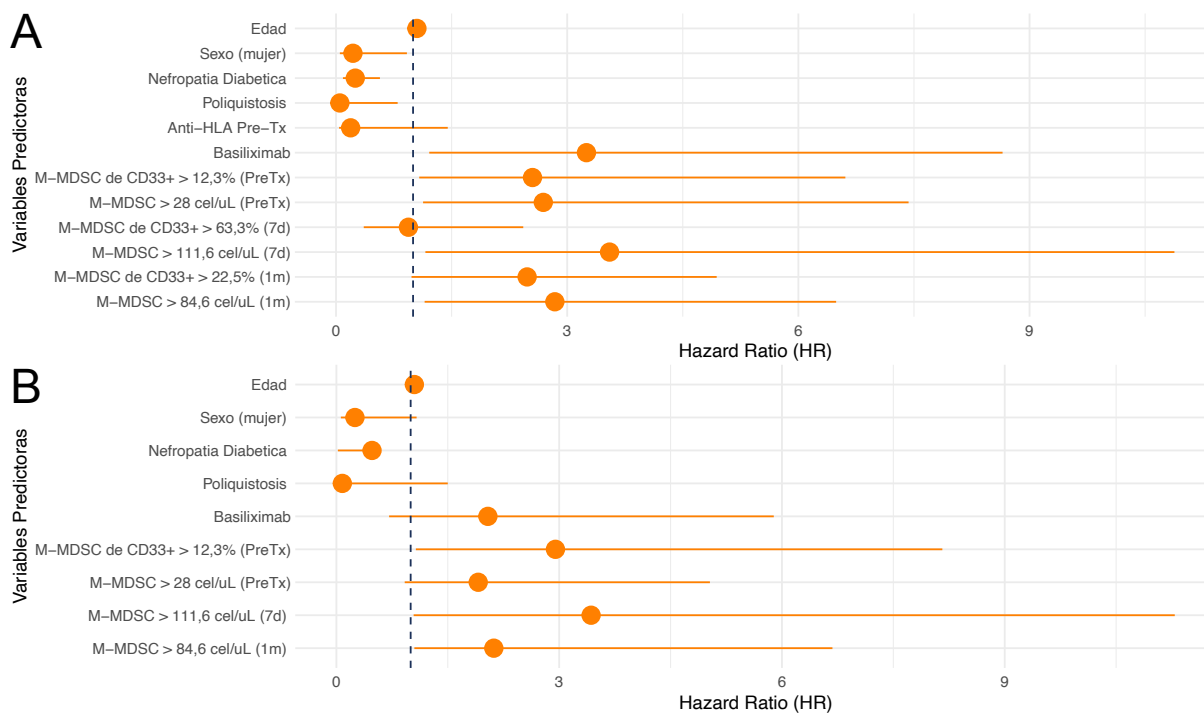


Figura 36. Forest plot de los Hazard Ratio (HR) para la aparición de tumores de órganos profundos en el post-trasplante. (A) HR correspondientes a la regresión de cox univariante y (B) multivariante. Se muestra el HR con el intervalo de confianza al 95 % correspondiente a la edad, sexo, nefropatía diabética, poliquistosis, anticuerpos anti-HLA pre-trasplante, basiliximab como terapia de inducción, y el porcentaje sobre células mieloides y recuento de M-MDSC pre-trasplante (PreTx), a los 7 días (7d) y al mes (1m) post-trasplante

El análisis de riesgos competitivos fue más restrictivo en sus resultados. Variables como el sexo, el tratamiento con basiliximab y los niveles de M-MDSC a los 7 días post-trasplante, que fueron significativas en la regresión de Cox, no alcanzaron significación estadística en este modelo. La edad, la proporción de M-MDSC superior a 12,30 % pre-trasplante y el número de M-MDSC superior a 84,6 células por microlitro de sangre al mes fueron los tres únicos factores, independientes, asociados con la aparición de TNC, mostrando, el segundo y el tercero de ellos, cifras de riesgo superiores a las de la edad.

El análisis de Kaplan-Meier, de nuevo, permitió separar a los RTR en función del punto de corte en los niveles de M-MDSC de forma que los pacientes con niveles de M-MDSC superiores al punto de corte en el pre-trasplante y a los 7 días post-trasplante, pero no al mes post-trasplante, presentaron significativamente menor supervivencia libre de aparición de un tumor profundo que aquellos con menor concentración de M-MDSC (**Figura 37B-D**). A los 9 años, la SLM fue de 79 % (68–93) para tasas de M-MDSC altas (M-MDSC > 12,30 %) en el pre-trasplante y

83 % (74–92) para recuentos de M-MDSC > 111,6 células/μL 7 días post-trasplante, mientras que los pacientes con niveles M-MDSC bajas presentaron tasas de SLM superiores al 92 % en los dos casos.

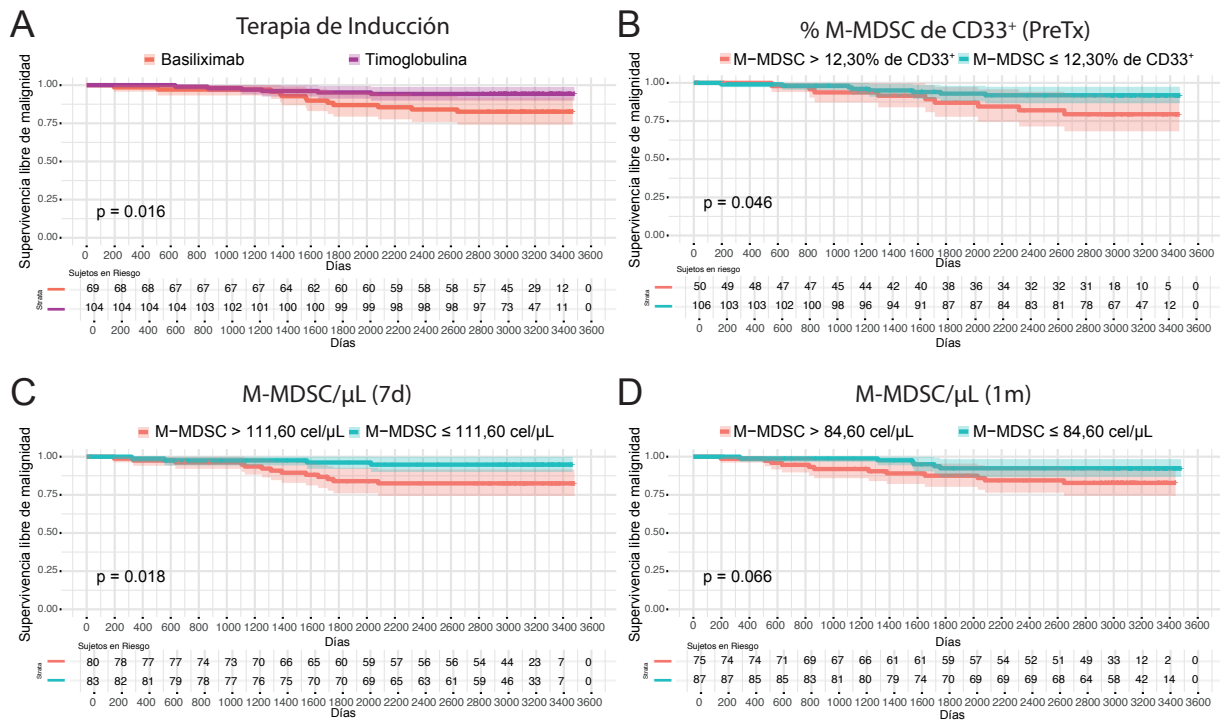


Figura 37. RTR con niveles altos de M-MDSC presentan menor supervivencia libre de malignidad. Gráficas Kaplan Meier estratificando a los pacientes en función de (A) la terapia de inducción, (B) los niveles de M-MDSC sobre células mieloides CD33⁺ en el pre-trasplante, (C) el recuento de M-MDSC a los 7 días y (D) un mes post-trasplante. El color sombreado representa el intervalo de confianza al 95 %. El tiempo se representa en días.

Resumiendo, la edad, basiliximab y niveles elevados de M-MDSC en el pre-trasplante, a los 7 días y al mes post-trasplante resultaron factores de riesgo para la aparición de TNC. Por el contrario, el sexo femenino junto nefropatía diabética o poliquistosis emergieron como factores protectores. De entre estos factores, la edad, niveles elevados de M-MDSC y la nefropatía diabética fueron los únicos factores independientes.

3.10. Las M-MDSC altas protegen del rechazo

La alosensibilización y los rechazos empeoran la evolución y supervivencia tanto del injerto renal como de los RTR. Por tanto, adicionalmente a los análisis anteriores se estudió el impacto de las M-MDSC sobre esos eventos.

La edad actuó como factor protector de la aparición de anticuerpos anti-HLA *de novo* post-trasplante, con un HR de 0,98 (IC 95 %: 0,96 – 0,99). Por el contrario, el sexo femenino, haber recibido trasplantes previos, la presencia de anticuerpos anti-HLA preexistentes y la existencia de dos incompatibilidades en HLA-DR se asociaron con un mayor riesgo de desarrollo de anticuerpos *de novo*, con HR de 2,23 (IC 95 %: 1,37 – 3,62), 5,53 (IC 95 %: 3,30 – 9,27), 8,58 (IC 95 %: 5,25 – 14) y 1,42 (IC 95 %: 1,19 – 1,93), respectivamente (**Tabla 22**).

En el análisis multivariante, únicamente la presencia de anticuerpos anti-HLA pre-trasplante se mantuvo como un factor de riesgo independiente, aumentando en más de cinco veces la probabilidad de desarrollar anticuerpos *de novo* frente a los pacientes sin sensibilización previa. Ninguna de las demás variables evaluadas, incluido el régimen inmunosupresor y los niveles elevados de M-MDSC en las diferentes mediciones mostraron asociación significativa con el riesgo de alosensibilización (**Tabla 22**).

El análisis de riesgos competitivos reportó resultados similares a la regresión de Cox a excepción de las incompatibilidades en HLA-DR que no resultaron significativas.

Tabla 22. Hazard Ratio (HR) e intervalo de confianza al 95 % para el desarrollo de anticuerpos anti-HLA en el post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes

	Log-Rank		Riesgos Competitivos (Fine + Gray)	
	Univariante	Multivariante	Univariante	Multivariante
Características Clínicas				
Edad	0,98 (0,96 – 0,99), p=0,04	0,99 (0,97 – 1,01), p=0,27	0,98 (0,97 – 0,99), p=0,002	0,98 (0,97 - 1), p=0,05
Sexo (mujer)	2,23 (1,37 – 3,62), p=0,001	1,64 (0,92 – 2,93), p=0,09	1,86 (1,14 – 3,04), p=0,013	1,10 (0,64 – 1,87), p=0,74
Díálisis				
Hemodiálisis	1,80 (0,65 – 4,97), p=0,26	-	1,52 (0,58 – 4,02) , p=0,32	-
Peritoneal	1,03 (0,30 – 3,51), p=0,97	-	0,67 (0,21 – 2,18) , p=0,51	-

Características del Trasplante				
Tipo Donante (vs vivo)				
Asistolia	0,76 (0,31 – 1,89), p=0,62	-	0,66 (0,27 – 1,64) , p=0,37	-
Muerte encefálica	1,21 (0,57 – 2,57), p=0,56	-	1 (0,47 – 2,14) , p>0,99	-
Trasplante Previo	5,53 (3,30 – 9,27), p<0,0001	1,79 (0,88 – 3,66), p=0,11	4,38 (2,63 – 7,28), p<0,0001	1,17 (0,60 – 2,27), p=0,64
Anti-HLA pre-trasplante	8,58 (5,25 – 14) , p<0,0001	5,20 (2,64 – 10,22), p<0,0001	6,54 (4 – 10,7) , p<0,0001	5,52 (2,76 – 11) , p<0,0001
Disparidad HLA < 3	1,86 (1,02 – 3,43), p=0,05	-	1,61 (0,85 – 3,06) , p=0,14	-
Disparidad B				
1	0,78 (0,23 – 2,60), p=0,69	-	0,82 (0,22 – 3,02) , p=0,77	-
2	0,59 (0,18 – 1,93), p=0,38	-	0,59 (0,16 – 2,13) , p=0,42	-
Disparidad DR				
1	0,61 (0,30 – 1,26), p=0,18	-	0,77 (0,39 – 1,52) , p=0,45	-
2	1,42 (1,19 – 1,93), p=0,03	0,68 (0,29 – 1,57), p=0,37	0,45 (0,21 – 0,95) , p=0,37	-
Inmunosupresión				
Inducción (vs No)				
Basiliximab	1,77 (0,83 – 3,76), p=0,14	-	0,56 (0,24 – 1,31) , p=0,18	-
ATG	0,62 (0,26 – 1,47), p=0,28	-	1,45 (0,70 – 2,99) , p=0,32	-
Mantenimiento¹				
Tac	1,22 (0,44 – 3,36), p=0,70	-	0,98 (0,35 – 2,77) , p=0,97	-
Tac + MMF + Corticoides	1,34 (0,80 – 2,23), p=0,27	-	1,63 (0,95 – 2,81) , p=0,17	-
Tac + MMF	0,75 (0,30 – 1,87), p=0,54	-	0,71 (0,27 – 1,90) , p=0,50	-
Tac + Corticoides	0,63 (0,32 – 1,23), p=0,17	-	0,48 (0,23 – 1,52) , p=0,15	-
Tac + MMF + Otro [#]	0,79 (0,34 – 1,82), p=0,58	-	0,71 (0,27 – 1,92) , p=0,50	-
M-MDSC				
M-MDSC 1m Post-trasplante				
> 22,5 % de CD33 ⁺	0,99 (0,58 – 1,69), p=0,96	-	1,02 (0,59 – 1,77), p=0,95	-
> 84,6 cel/ μ L	0,79 (0,46 – 1,35), p=0,39	-	1,09 (0,63 – 1,88), p=0,76	-

Para el análisis multivariante se consideraron las variables significativas en el análisis univariante.

ATG, globulina anti-timocítica; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. [#]Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)

En lo relativo a la aparición de DSA *de novo*, se identificó nuevamente que el sexo femenino, la historia de trasplantes previos y la sensibilización HLA preexistente se asociaron con un mayor riesgo de alosensibilización, con HR de 2,31 (IC 95 %: 1,16 – 4,64), 3,96 (IC 95 %: 1,88 – 8,37) y 3,87 (IC 95 %: 1,91 – 7,84), respectivamente. Entre estos, la presencia de anticuerpos anti-HLA pre-trasplante se mantuvo como el único factor de riesgo independiente en el modelo multivariante. El resto de las variables evaluadas no mostraron asociaciones significativas en el análisis de regresión de Cox (**Tabla 23**). El análisis de riesgos competitivos reprodujo los resultados del análisis de regresión de Cox.

Tabla 23. Hazard Ratio (HR) e intervalo de confianza al 95 % para el desarrollo de anticuerpos anti-HLA donante-específicos (DSA) post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes.

	Log-Rank		Riesgos Competitivos (Fine + Gray)	
	Univariante	Multivariante	Univariante	Multivariante
Características Clínicas				
Edad	0,99 (0,97 – 1,02), p=0,66	-	0,99 (0,97 – 1,01), p=0,38	-
Sexo (mujer)	2,31 (1,16 – 4,64), p=0,02	2,03 (0,99 – 4,19), p=0,05	2,02 (1,05 – 4,10), p=0,04	1,47 (0,71 – 3,04), p=0,31
Diálisis				
Hemodiálisis	1,83 (0,44 – 7,69), p=0,41	-	1,59 (0,42 – 6,09), p=0,50	-
Peritoneal	0,60 (0,08 – 4,24), p=0,61	-	0,23 (0,02 – 2,28), p=0,21	-
Características del Trasplante				
Tipo Donante (vs vivo)				
Asistolia	0,84 (0,24 – 3), p=0,80	-	0,85 (0,23 – 3,19), p=0,81	-
Muerte encefálica	1,13 (0,39 – 3,29), p=0,82	-	1,15 (0,36 – 3,65), p=0,81	-
Trasplante Previo	3,96 (1,88 – 8,37), p=0,0003	2,38 (0,91 – 6,20), p=0,08	4,09 (1,95 – 8,57), p=0,001	1,99 (0,86 – 4,62), p=0,11
Anti-HLA pre-trasplante	3,87 (1,91 – 7,84), p=0,0002	2,46 (1,15 – 6,27), p=0,03	4,24 (2,09 – 8,58), p<0,0001	2,54 (1,08 – 5,99), p=0,03
Disparidad HLA < 3	0,43 (0,10 – 1,83), p=0,26	-	0,25 (0,03 – 1,86), p=0,18	-
Disparidad B				
1	1 (0 – Inf), p=0,99	-	-	-
2	1 (0 – Inf), p=0,99	-	-	-
Disparidad DR				
1	1,47 (0,43 – 5,01), p=0,54	-	1,46 (0,46 – 4,66), p=0,52	-
2	0,77 (0,21 – 2,92), p=0,70	-	0,69 (0,19 – 2,48), p=0,57	-

Inmunosupresión				
Inducción (vs No)				
Basiliximab	2,02 (0,60 – 6,81), p=0,26	-	0,52 (0,23 – 1,16), p=0,11	-
ATG	1,13 (0,31 – 4,19), p=0,85	-	0,56 (0,17 – 1,88), p=0,35	-
Mantenimiento¹				
Tac	3 (0,94 – 8,58), p=0,14	-	2,08 (0,72 – 5,96), p=0,17	-
Tac + MMF + Corticoides	0,70 (0,35 – 1,41), p=0,32	-	0,94 (0,46 – 1,91), p=0,86	-
Tac + MMF	0,61 (0,15 – 2,57), p=0,50	-	0,58 (0,13 – 2,50), p=0,46	-
Tac + Corticoides	1,31 (0,59 – 2,92), p=0,51	-	1,02 (0,44 – 2,37), p=0,97	-
Tac + MMF + Otro[#]	1,66 (0,64 – 4,30), p=0,30	-	1,55 (0,56 – 4,31), p=0,40	-
M-MDSC				
M-MDSC 1m post-trasplante				
> 22,5 % de CD33⁺	1,12 (0,49 – 2,55), p=0,79	-	1,09 (0,47 – 2,21), p=0,84	-
> 84,6 cel/μL	0,68 (0,30 – 1,59), p=0,37	-	0,42 (0,37 – 1,95), p=0,70	-

Para el análisis multivariante se consideraron las variables significativas en el análisis univariante.

ATG, globulina anti-timocítica; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. [#]Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)

En cuanto a los episodios de rechazo, como era de esperar, la presencia de dos incompatibilidades en HLA-DR se asoció con un riesgo superior a cuatro veces en comparación con los pacientes sin incompatibilidades en este locus. Además, la aparición de anticuerpos anti-HLA clase I y clase II, y de DSA de clase I y clase II, en el post-trasplante, se identificaron como factores de riesgo independientes significativos para el rechazo con HR de 2,55 (IC 95 %: 1,21 – 5,39), 2,91 (IC 95 %: 1,17 – 7,28), 3,67 (IC 95 %: 1,39 – 9,72) y 4,22 (IC 95 %: 1,81 – 9,86), respectivamente. Los diferentes tratamientos inmunosupresores, tanto de inducción como de mantenimiento, no resultaron significativos en el modelo.

Por otro lado, niveles de M-MDSC > 22,5 % dentro de las células mieloides CD33⁺ o > 84,6 cel/ μ L, al mes post-trasplante, se asociaron de forma independiente con una reducción del riesgo de rechazo del 61 % y 31 %, respectivamente, en el modelo multivariante (**Tabla 24**).

En el análisis de riesgos competitivos las incompatibilidades en HLA-DR y los anticuerpos anti-HLA post-trasplante no resultaron factores pronósticos significativos. Finalmente, tanto por el análisis de regresión de Cox como por el de riesgos competitivos, la presencia de DSA post-trasplante surgió como el único factor independiente que confería riesgo para rechazo, mientras que niveles elevados de M-MDSC al mes post-trasplante fueron el único factor que de forma independiente protegía del rechazo (**Tabla 24**).

Tabla 24. Hazard Ratio (HR) e intervalo de confianza al 95 % para la aparición de eventos de rechazo post-trasplante calculados por regresión de Cox y modelo de riesgos competitivos univariantes y multivariantes.

	Log-Rank		Riesgos Competitivos (Fine + Gray)	
	Univariante	Multivariante	Univariante	Multivariante
Características Clínicas				
Edad	0,99 (0,96 – 1,01), p=0,17	-	0,98 (0,97 – 1), p=0,13	-
Sexo (mujer)	0,58 (0,25 – 1,32), p=0,19	-	0,62 (0,28 – 1,42), p=0,26	-
Diálisis				
Hemodiálisis	0,77 (0,39 – 4,23), p=0,67	-	1,21 (0,36 – 4,05), p=0,75	-
Peritoneal	5,40 (0,02 – 1,78), p=0,14	-	0,17 (0,02 – 1,68), p=0,13	-
Características del Trasplante				
Tipo Donante (vs vivo)				
Asistolia	0,52 (0,17 – 1,61), p=0,26	-	0,47 (0,15 – 1,46), p=0,19	-
Muerte encefálica	0,7 (0,29 – 1,74), p=0,46	-	0,66 (0,27 – 1,64), p=0,37	-
Trasplante Previo	0,68 (0,61 – 3,54), p=0,39	-	1,49 (0,63 – 3,53), p=0,36	-
Anti-HLA pre-trasplante	1,17 (0,51 – 2,68), p=0,71	-	1,22 (0,53 – 2,77), p=0,64	-
Disparidad HLA < 3	1,56 (0,19 – 2,09), p=0,46	-	0,65 (0,20 – 2,10), p=0,48	-
Disparidad B				
1	0,33 (0,09 – 1,21), p=0,10	-	0,36 (0,09 – 1,41), p=0,14	-
2	0,34 (0,1 – 1,17), p=0,09	-	0,36 (0,10 – 1,37), p=0,13	-
Disparidad DR				
1	3,9 (0,89 – 29,69), p=0,08	-	3,70 (0,48 – 28,40), p=0,21	-
2	4,3 (1,56 – 32,70), p=0,04	5,56 (0,72 – 42,83), p=0,07	3,94 (0,51 – 30,40), p=0,19	-
Inmunosupresión				
Inducción (vs No)				
Basiliximab	1,52 (0,25 – 1,71), p=0,39	-	1,41 (0,68 – 2,92), p=0,35	-
ATG	1,08 (0,36 – 2,38), p=0,87	-	1,58 (0,61 – 4,12), p=0,35	-
Mantenimiento¹				
Tac	0,51 (0,07 – 3,76), p=0,51	-	0,56 (0,08 – 4,04), p=0,56	-
Tac + MMF + Corticoides	1,14 (0,57 – 2,25), p=0,72	-	1,07 (0,54 – 2,11), p=0,85	-
Tac + MMF	1,17 (0,41 – 3,30), p=0,77	-	1,24 (0,43 – 3,52), p=0,69	-
Tac + Corticoides	0,75 (0,31 – 1,80), p=0,51	-	0,78 (0,33 – 1,87), p=0,58	-
Tac + MMF + Otro[#]	1,16 (0,41 – 3,29), p=0,78	-	1,18 (0,43 – 3,27), p=0,74	-

Evolución post-trasplante				
Anti-HLA post-trasplante				
Clase I	2,53 (1,29 – 4,99), p=0,007	2,55 (1,21 – 5,39), p=0,014	2,66 (1,36 – 5,21), p=0,004	0,68 (0,20 – 2,36), p=0,55
Clase II	2,06 (1,04 – 4,10), p=0,038	2,91 (1,17 – 7,28), p=0,023	2,17 (1,11 – 4,26), p=0,024	1,03 (0,32 – 3,33), p=0,96
DSA post-trasplante				
Clase I	3,98 (1,74 – 9,13), p=0,001	3,67 (1,39 – 9,72), p=0,009	3,91 (1,74 – 8,78), p<0,0001	2,36 (0,87 – 6,39), p=0,09
Clase II	4,52 (2,17 – 9,41), p<0,0001	4,22 (1,81 – 9,86), p=0,0008	4,48 (2,24 – 8,96), p<0,0001	3,45 (1,48 – 8,02), p=0,003
Neoplasia post-trasplante	0,77 (0,32 – 1,85), p=0,56	-	1,91 (0,45 – 8,05), p=0,38	-
M-MDSC				
M-MDSC 1m post-trasplante				
> 22,5 % de CD33 ⁺	0,43 (0,21 – 0,90), p=0,027	0,39 (0,19 – 0,84), p=0,015	0,45 (0,22 – 0,94), p=0,034	0,40 (0,19 – 0,84), p=0,016
> 84,6 cel/μL	0,60 (0,29 – 0,94), p=0,031	0,69 (0,29 – 0,94), p=0,04	0,59 (0,29 – 1,24), p=0,16	-

Para el análisis multivariante se consideraron las variables significativas en el análisis univariante.

ATG, globulina anti-timocítica; Tac, tacrolimus; MMF, micofenolato

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. [#]Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)

El análisis Kaplan-Meier mostró que los pacientes con niveles de M-MDSC sobre células mieloides por encima del punto de corte (22,50 %), al mes post-trasplante, presentaban significativamente mayor SLR que aquellos con M-MDSC por debajo del punto de corte (**Figura 38A**). Esto no se observó al clasificar a los pacientes de acuerdo con el recuento de M-MDSC al mes post-trasplante (**Figura 38B**).

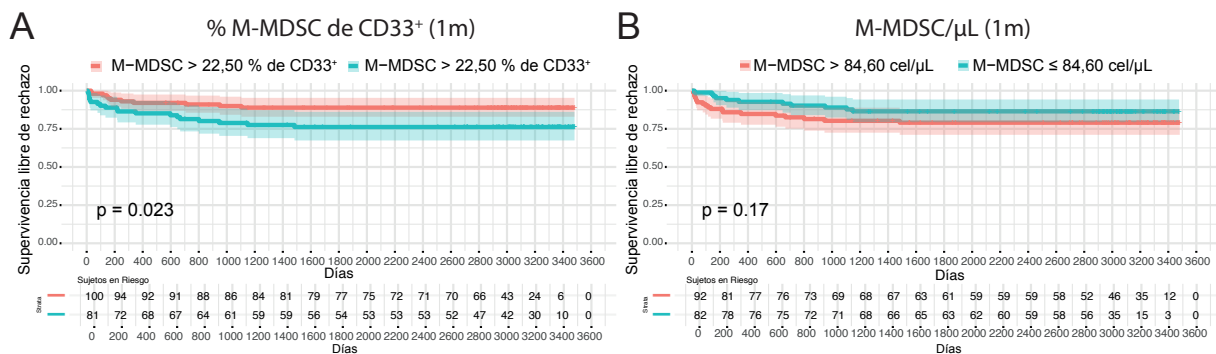


Figura 38. RTR con niveles altos de M-MDSC presentan mayor supervivencia libre de rechazo. Gráficas Kaplan Meier estratificando a los pacientes en función de (A) los niveles de M-MDSC sobre células mieloides CD33⁺ y el (B) recuento de M-MDSC un mes post-trasplante. El color sombreado representa el intervalo de confianza al 95 %. El tiempo se representa en días.

3.11. Factores de riesgo asociados a la muerte en receptores renales

La **Tabla 25** muestra que, entre las variables clínicas estudiadas, la edad, el tipo de donante y el tratamiento de inducción con basiliximab se asociaron con mayor riesgo de muerte en los RTR. En concreto, la edad presentó un HR de 1,09 (IC 95 %: 1,06–1,11), lo que implica un aumento del 9 % en el riesgo de fallecimiento por cada año adicional. Los pacientes que recibieron un injerto de donante en muerte encefálica presentaron un riesgo casi seis veces superior (HR: 5,98; IC 95 %: 1,45–24,6), y aquellos tratados con basiliximab como terapia de inducción presentaron un HR de 2,44 (IC 95 %: 1,03–5,80).

El resto de las variables clínicas, así como los esquemas de mantenimiento inmunosupresor, no mostraron asociación significativa con el riesgo de mortalidad. Tampoco se observaron asociaciones significativas con eventos inmunológicos post-trasplante como la alosensibilización o el rechazo.

Sin embargo, el desarrollo de neoplasias tras el trasplante se asoció con un riesgo casi duplicado de mortalidad en comparación con los pacientes que no desarrollaron cáncer. Este riesgo se explicó fundamentalmente por la presencia de TNC, que presentaron un HR de 2,74 (IC 95 %: 1,48–5,10) frente a los pacientes libres de neoplasias.

A pesar de esto, el único factor independiente en el modelo multivariante fue la edad asociando un incremento del 10 % en el riesgo de muerte por cada año adicional.

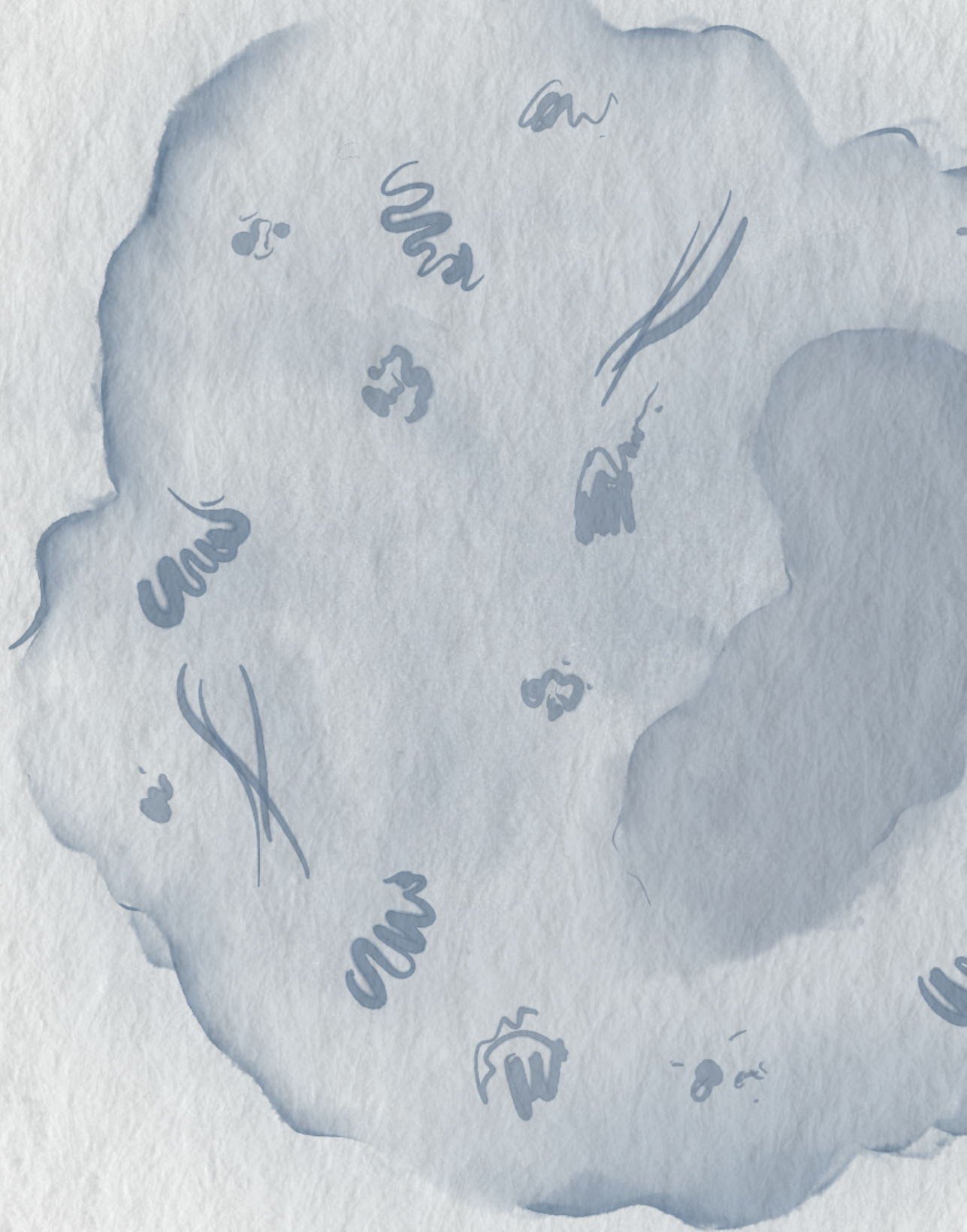
Los niveles elevados de M-MDSC no se asociaron de manera significativa con la mortalidad, sin evidenciar un rol pronóstico, ya sea como factor de riesgo o de protección, en ninguno de los momentos analizados.

Tabla 25. Hazard Ratio (HR) e intervalo de confianza al 95 % para los exitus post-trasplante calculados por regresión de Cox univariante y multivariante.

	Univariante		Multivariante	
	HR (IC 95 %)	p-value	HR (IC 95 %)	p-value
Características Clínicas				
Edad	1,09 (1,06 – 1,11)	< 0,0001	1,10 (1,07 – 1,14)	< 0,0001
Sexo (mujer)	0,88 (0,52 – 1,50)	0,63	-	-
Diálisis				
Hemodiálisis	2,62 (0,82 – 8,35)	0,11	-	-
Peritoneal	1,16 (0,29 – 4,65)	0,83	-	-
Características del Trasplante				
Tipo Donante (vs vivo)				
Asistolia	3,99 (0,89 – 17,6)	0,07	1,87 (0,38 – 9,21)	0,44
Muerte encefálica	5,98 (1,45 – 24,6)	0,01	1,74 (0,40 – 7,66)	0,46
Trasplante Previo	1,15 (0,57 – 2,32)	0,70	-	-
Anti-HLA pre-trasplante	0,97 (0,51 – 1,86)	0,93	-	-
Disparidad HLA < 3	0,43 (0,15 – 1,18)	0,10	-	-
Disparidad B				
1	0,74 (0,22 – 2,46)	0,62	-	-
2	0,77 (0,24 – 2,51)	0,67	-	-
Disparidad DR				
1	1,71 (0,60 – 4,91)	0,32	-	-
2	2,15 (0,76 – 6,12)	0,15	-	-
Inmunosupresión				
Inducción (vs No)				
Basiliximab	2,44 (1,03 – 5,80)	0,04	0,99 (0,39 – 2,55)	0,59
ATG	1,38 (0,57 – 3,35)	0,48	-	-
Mantenimiento¹				
Tac	0,24 (0,03 – 1,72)	0,16	-	-
Tac + MMF + Corticoides	0,69 (0,43 – 1,11)	0,13	-	-
Tac + MMF	1,81 (0,93 – 3,56)	0,08	-	-
Tac + Corticoides	1,54 (0,90 – 2,62)	0,11	-	-
Tac + Corticoides + Otro*	0,69 (0,28 – 1,71)	0,42	-	-
Evolución post-trasplante				
Anti-HLA post-trasplante				
Clase I	0,54 (0,27 – 1,08)	0,08	-	-
Clase II	0,51 (0,25 – 1,02)	0,06	-	-
DSA post-trasplante				
Clase I	0,58 (0,18 – 1,84)	0,35	-	-
Clase II	0,78 (0,31 – 1,94)	0,59	-	-
Rechazo	0,70 (0,33 – 1,47)	0,35	-	-
Neoplasia post-trasplante				
Basocelular	1,96 (1,16 – 3,28)	0,02	0,91 (0,51 – 1,60)	0,73
Espinocelular	1,54 (0,61 – 3,89)	0,35	-	-
No cutáneos	0,95 (0,30 – 3,07)	0,97	-	-
	2,74 (1,48 – 5,10)	0,001	1,51 (0,79 – 2,89)	0,21
M-MDSC				
M-MDSC 1m post-trasplante				
> 22,5 % de CD33 ⁺	1,45 (0,84 – 2,49)	0,19	-	-
> 84,6 cel/μL	1,28 (0,78 – 2,22)	0,39	-	-

Para el análisis multivariante se consideraron las variables significativas en el análisis univariante.

¹En el momento de consulta: durante el año previo al diagnóstico de cáncer o de acuerdo con la aleatorización. # Azatioprina o inhibidores de mTOR (everolimus/sirolimus)





Discusión



1. Las eMDSC expresan CD25 y presentan un receptor de IL-2 funcional

El estudio inicial sobre la dinámica del compartimento mieloide en RTR reveló que, si bien los niveles de MDSC totales aumentaban a los 7 y 14 días post-trasplante, la subpoblación de eMDSC disminuía específicamente en aquellos RTR que habían recibido basiliximab como terapia de inducción. Este fenómeno no se observó en los pacientes tratados con ATG ni en aquellos que no recibieron tratamiento de inducción.

Basiliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico recombinante de tipo IgG1 dirigido frente a CD25, cadena α del IL-2R³⁹². Dado el perfil de disminución selectiva de las eMDSC observado, postulamos que esas células podrían expresar CD25. En efecto, se observó una reducción de eMDSC CD25⁺ en RTR tratados con basiliximab post-trasplante y ensayos *in vitro* demostraron que basiliximab impedía la detección de CD25 en estas células, confirmando la presencia de CD25 en la membrana celular de las eMDSC.

Basiliximab actúa bloqueando IL-2R α , presente en linfocitos T activados y en muy bajo grado en linfocitos T en reposo, inhibiendo competitivamente la unión de la IL-2 a su receptor, proceso esencial para la proliferación de los linfocitos T^{393,394}. Aunque está clasificado como un anticuerpo bloqueante no deplecionante debido a la ausencia de un dominio señalizador intracelular en IL-2R α ³⁹⁵, su estructura de IgG1 humana³⁹² le confiere la capacidad potencial de inducir citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), ADCC y citotoxicidad celular dependiente de fagocitosis (ADCP, *Antibody-dependent Cellular Phagocytosis*)³⁹⁶ lo que podría explicar que la disminución de eMDSC observada se debe a la depleción mediada por basiliximab. En este estudio, se descartó que la depleción de eMDSC por basiliximab se deba a activación del complemento, ya que la adición de basiliximab no indujo muerte celular en ensayos de activación del complemento. Sin embargo, no se ha podido descartar la implicación de mecanismos como ADCC o ADCP, que deberán evaluarse en futuros estudios.

El receptor de IL-2 es un complejo heterotrimérico compuesto por tres cadenas independientes cuya asociación da lugar a receptores con diferente afinidad por la IL-2. IL-2R α , o CD25 – presente en timocitos tempranos, linfocitos T activados de forma transitoria y, principalmente, en linfocitos Treg³⁹⁷ – se une a la IL-2 con baja afinidad (Constante de disociación, $K_d \sim 10^{-8}$ M). El receptor de afinidad intermedia ($K_d \sim 10^{-9}$ M) está formado por las cadenas β , CD122 y

γ , CD132. Solo la asociación de las tres cadenas genera un receptor de alta afinidad ($K_d \sim 10^{-11}$ M)³⁹⁸. Aunque tanto el receptor de afinidad intermedia como el de alta afinidad son funcionales, estudios en ratones *knockout* para CD25 han demostrado que la función de la IL-2 está mediada en la mayoría de los casos por el receptor de alta afinidad³⁹⁹. En este complejo, la IL-2 se une inicialmente a IL-2R α , seguidamente se recluta IL-2R β y finalmente IL-2R γ ⁴⁰⁰. La unión de la IL-2 provoca la activación y fosforilación de JAK1 y JAK3 en las cadenas β y γ , respectivamente, activándose así: i) la fosforilación de STAT5 y su correspondiente traslocación al núcleo donde regula la transcripción de los genes dianas; ii) la vía de Ras/Raf/MAPK; y iii) la ruta de PI3K/AKT/mTOR⁴⁰¹.

En concordancia con lo publicado anteriormente, se detectó expresión de las cadenas β y γ en todas las poblaciones mieloides estudiadas. IL-2R γ , también denominada cadena γ común (γ_c), se expresa de forma ubicua en la mayoría de células hematopoyéticas ya que forma parte de los receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 mientras que IL-2R β está presente en linfocitos T y B, células NK y monocitos⁴⁰²⁻⁴⁰⁴. La expresión de CD25 resultó exclusiva de eMDSC, ya que no se detectó CD25 por citometría en monocitos, M-MDSC o PMN-MDSC. Este hallazgo resultó inesperado, ya que CD25 es una molécula típicamente asociada a poblaciones celulares linfoides, y no a células de origen mieloides. Estos resultados sugieren que las células CD14⁺ y las PMN-MDSC podrían presentar el IL-2R de afinidad intermedia o que las cadenas β y γ formarán parte de otros receptores de IL, mientras que las eMDSC presentarían el de alta afinidad.

Tras confirmar la presencia de las tres cadenas en las eMDSC, se evaluó su funcionalidad mediante fosforilación de STAT5 por citometría de flujo. La adición de IL-2 indujo la fosforilación de STAT5, que se bloqueaba si antes se añadía basiliximab, confirmando que las eMDSC presentan un IL-2R funcional, formado por α , β y γ , que señala intracelularmente.

Otros estudios han descrito la expresión de CD25 en células mieloides asociadas a tumores, como DC y macrófagos⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁷, de acuerdo con lo cual CD25 se postula no solo como una molécula clave en la activación de los linfocitos T sino como un mecanismo inmunosupresor mediando el secuestro de la IL-2 y favoreciendo así la tolerancia inmunológica frente al tumor⁴⁰⁸. En línea con esto, la administración de dosis altas de IL-2 en ensayos clínicos de melanoma metastásico y carcinoma renal se asoció con un aumento de MDSC⁴⁰⁹, sugiriendo un posible papel de la señalización IL-2 en el mantenimiento de estas células de fenotipo inmaduro y supresor. Asimismo, el hecho de que las eMDSC presenten el receptor funcional implica que la

IL-2 podría modular la funcionalidad de estas células potenciando o impidiendo su actividad inmunorreguladora. En este sentido, se ha sugerido que basiliximab tendría potencial terapéutico en tumores con alta expresión de CD25 o infiltración de eMDSC y linfocitos Treg. En modelos *in vitro* y en pacientes oncológicos, se ha demostrado que dosis bajas de basiliximab reducen la proporción de linfocitos Treg CD4⁺CD25^{hi} sin afectar a los linfocitos T efectores CD4⁺CD25^{low}, los cuales incluso mejoran su capacidad antitumoral^{410,411}. En este momento, estamos trabajando en el análisis transcriptómico de las eMDSC expuestas a IL-2 para determinar el efecto de su señalización en la población de eMDSC.

En conclusión, este trabajo aporta conocimiento sobre la naturaleza de las eMDSC humanas, una subpoblación mieloide muy poco estudiada. Se demuestra que las eMDSC presentan un receptor completo y funcional de IL-2, compuesto por las cadenas α , β y γ , y que basiliximab impide la señal desencadenada por IL-2. Asimismo, CD25 se identifica como un nuevo marcador fenotípico de esta población. No obstante, se requiere más investigación para dilucidar el papel funcional de la señalización de IL-2 en la biología de las eMDSC.

La observación de la importante fracción de eMDSC CD25⁺ existente en los pacientes sometidos a trasplante hepático por hepatocarcinoma, y de su expansión post-trasplante, promovió el estudio de la relación entre esta población celular y el cáncer de hígado.

2. Papel de las MDSC en la progresión tumoral del HCC

Entre las células inmunosupresoras del TME, las MDSC han emergido como una población clave en la progresión tumoral y, por tanto, en el pronóstico clínico. Diversos estudios han demostrado un aumento de MDSC en sangre periférica y en el TME en diferentes neoplasias, incluido el HCC^{122,144,245,246,412-414}. No obstante, dichos estudios se han centrado en una subpoblación específica siendo todavía desconocida la distribución de las MDSC en pacientes con HCC. Por este motivo, el principal objetivo de este capítulo fue estudiar las subpoblaciones de MDSC en su conjunto y su relación con la progresión tumoral.

En este trabajo, se demostró que las tres subpoblaciones de MDSC, M-MDSC, PMN-MDSC y eMDSC, están expandidas en la sangre periférica de los pacientes con HCC en comparación con CS, mientras que las células presentadoras de antígeno clásicas, monocitos identificados como CD14⁺ HLA-DR^{hi} en este trabajo, estaban disminuidas. El estudio solo incluyó dos pacientes con CCA, por lo que no fue posible evaluar si existían diferencias significativas entre HCC y

CCA. No obstante, el PCA separó en dos agrupaciones discretas los pacientes con HCC y con CCA, observándose, en concordancia con estudios previos, que no había una expansión de MDSC en los pacientes con CCA⁴¹³. Además de una expansión de células mieloides inmunosupresoras, en nuestra cohorte de HCC, también se encontró aumento de la actividad Arg-1 y de los niveles circulantes de IL-10, mecanismos inmunosupresores ampliamente asociados a las MDSC. Previamente, en pacientes con adenocarcinoma gástrico, mostraron que las células, tanto intratumorales como circulantes, positivas para Arg-1 correspondían mayoritariamente a M-MDSC y eMDSC⁴¹⁵.

Al evaluar la capacidad inmunosupresora *in vitro*, comprobamos que la fracción mioide de los pacientes con HCC, enriquecida en células CD33⁺ HLA-DR^{-low}, reducía la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, así como la producción de IL-2, cumpliendo así con la definición funcional de MDSC⁶⁷. El co-cultivo de las MDSC con linfocitos T autólogos aumentó la producción de IL-10, TNF- α e IL-6. La IL-10 es un conocido mediador de la capacidad inmunosupresora de las células mieloides con efecto autocrino sobre las propias MDSC e implicada en la diferenciación de linfocitos Treg y macrófagos con fenotipo inmunosupresor^{116,416,417}. En el caso de las citoquinas mieloides, TNF- α e IL-6, aunque típicamente pro-inflamatorias, son también necesarias para la función de las MDSC. La secreción autocrina de TNF- α favorece la supervivencia, acumulación y función supresora de las MDSC, probablemente a través de la señalización del receptor 2 de TNF- α (TNFR-2)^{418,419}. La acumulación de IL-6, por su parte, se ha asociado a expansión de las MDSC, enriquecimiento de su capacidad inmunosupresora e inhibición de la diferenciación de linfocitos T anti-tumorales^{372,420-422}.

Las MDSC impiden la inmunidad antitumoral gracias a múltiples mecanismos que favorecen tanto la progresión tumoral como la resistencia a la terapia antitumoral. La capacidad inmunosupresora varía entre los distintos subtipos de MDSC. En nuestra cohorte de HCC, las M-MDSC resultaron ser la principal subpoblación inmunosupresora ya que la inhibición de la proliferación de linfocitos T correlacionó directamente tanto con las M-MDSC como con la ratio M-MDSC/eMDSC. Estos resultados coinciden con investigaciones anteriores que identifican a las M-MDSC como los principales mediadores de inmunosupresión en el HCC^{244,247,412}. Por otra parte, la falta de asociación entre las PMN-MDSC y la supresión de linfocitos T podrían deberse a limitaciones metodológicas en la separación de PBMC y células CD33⁺, dado que las PMN-MDSC son particularmente sensibles a variaciones técnicas durante el procesamiento de muestras⁴²³.

La población de eMDSC en humanos se identificó inicialmente en pacientes con cáncer de mama^{102,159,160,424}, donde se ha asociado a progresión tumoral, metástasis y mal pronóstico. Posteriormente, se han descrito en leucemia mieloide aguda⁴²⁵, mieloma, linfoma no Hodgkin¹⁶¹, carcinoma de células renales¹⁶² y cáncer epitelial de ovario⁴²⁶. Un trabajo previo reportó que las eMDSC no estaban aumentadas en pacientes con HCC ni se asociaban a ninguna característica clínica, mientras que en el presente trabajo se encontró una expansión significativa de esta población en comparación con controles sanos. Esta población estaba además expandida en pacientes con enfermedad más avanzada, medida como número de nódulos y estadio TNM. Hasta donde se sabe, este es el primer estudio que documenta la expansión de las eMDSC en pacientes con HCC y su asociación con el estadio en la enfermedad. Los resultados sugieren que las eMDSC circulantes en HCC no están relacionadas con la capacidad inmunosupresora. Se trata de un hallazgo interesante puesto que en la literatura previa las eMDSC se han considerado la subpoblación más inmadura y con mayor capacidad supresora^{87,102,160,424}. Sin embargo, cabe destacar que la capacidad inhibitoria de la expansión de linfocitos T o la polarización hacia linfocitos Th1 así como la inducción de la apoptosis de linfocitos T ha sido demostrada para eMDSC intratumorales^{87,102} o para células con fenotipo CD33⁺CD13⁺CD14⁻CD15⁻ derivadas del cultivo de células CD33⁺ de sangre de cordón umbilical con la línea de cáncer de mama MDA-MB-231^{160,424}, pero no para eMDSC de sangre periférica como las que describimos en este trabajo. En línea con los resultados del presente trabajo, un estudio en neoplasia de cabeza y cuello y en cáncer urológico mostró que las eMDSC circulantes presentaban escasa o nula capacidad inhibitoria¹⁴⁰.

Continuando con lo descrito en el capítulo I, en los pacientes con HCC se evaluó también la nueva población de eMDSC CD25⁺. En el análisis de correlación, observamos que las eMDSC CD25⁺ mostraban aún menos asociación con la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que las eMDSC en general. De hecho, la inhibición linfocitaria era inversamente proporcional al nivel de expresión de CD25 en las eMDSC. Así, la expresión de CD25 en la superficie de las células mieloides CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁻HLA-DR⁻ podría definir una nueva población de eMDSC sin capacidad inmunosupresora. El significado biológico de la cadena IL-2R α en las eMDSC es por el momento desconocido y merece ser investigado en mayor profundidad.

En el contexto del análisis clínico de la cohorte de HCC, encontramos que los pacientes con diabetes, tanto tipo I como tipo II, presentaban una expansión de M-MDSC, en concordancia con lo reportado anteriormente^{427,428}. También se exploró la posible influencia de la hepatitis,

dado que el 54 % de los pacientes presentaban infección crónica por VHB o VHC y estudios previos han descrito que dichas infecciones promueven la expansión de MDSC^{429,430}. No obstante, en nuestro estudio únicamente se observó una expansión significativa de PMN-MDSC, sin diferencias en los niveles de M-MDSC ni eMDSC, lo cual podría atribuirse al número limitado de sujetos incluidos en la cohorte.

En cuanto a la relación entre MDSC y la progresión tumoral, observamos que mayor número de nódulos de tumor, estadio TNM más avanzado y los niveles séricos aumentados de aFP se asociaron con mayores cantidades de M-MDSC y eMDSC. Aunque en el estudio no se incluyeron pacientes en los estadios más avanzados de la enfermedad, ya que las muestras se obtuvieron en el momento de la resección hepática, que no está indicada en estadios avanzados, se encontró, no obstante, que las M-MDSC, eMDSC y las eMDSC CD25⁺ eran más abundantes en las formas más avanzadas de la enfermedad. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas ni en PMN-MDSC ni en monocitos. Niveles elevados de M-MDSC se han asociado con anterioridad a recurrencia y progresión del HCC tras ablación por radiofrecuencia⁴¹², menor supervivencia tras radioterapia¹⁴⁴ y reducción de la supervivencia global después de radioembolización con Itrio-90²⁴⁸. Estos resultados, junto con los datos del presente trabajo, apoyan un papel de las M-MDSC en la progresión del HCC, mediado, al menos en parte por su capacidad para inhibir la proliferación de linfocitos T.

Por el contrario, eMDSC y eMDSC CD25⁺ están relacionados con formas avanzadas de HCC, pero, puesto que no se asocian a inhibición de la linfoproliferación, cabe pensar que su contribución a la progresión tumoral ocurre probablemente a través de mecanismos distintos a la inhibición de la respuesta inmune adaptativa, como la supresión de la inmunidad innata, células NK y macrófagos M1, o la contribución a la angiogénesis, la transición epitelio-mesénquima y la invasividad^{159,431-433}.

Dado que las MDSC se asocian con la progresión tumoral y desempeñan un papel clave en la formación del nicho premetastásico^{134,434}, además de conferir resistencia a las terapias antitumorales⁴³⁵, se han desarrollado estrategias anti-oncológicas basadas en el bloqueo de su funcionalidad, con el fin de mejorar el pronóstico de los pacientes. Se ha reportado previamente que las M-MDSC pueden ser moduladas por la radioterapia^{122,245,412}. No obstante, en nuestro estudio no fue posible evaluar este efecto debido a que los pacientes recibieron esquemas combinados de tratamiento, lo que impidió aislar el impacto específico de la radioterapia. Actualmente, diversas estrategias terapéuticas dirigidas a eliminar las MDSC están en desarrollo

y siendo evaluadas en ensayos clínicos, con el objetivo de revertir el entorno inmunosupresor y favorecer una respuesta inmunitaria antitumoral efectiva⁴³⁶⁻⁴⁴¹.

Entre las limitaciones de este estudio destaca el tamaño reducido de la cohorte y la modesta representación de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad o con CCA. El análisis de las MDSC intratumorales sería también necesario para obtener una visión más completa de las subpoblaciones de MDSC presentes en el microambiente del HCC y de sus propiedades funcionales.

En conclusión, en este capítulo, demostramos que las M-MDSC, eMDSC y eMDSC CD25⁺ están expandidas en la circulación de pacientes con HCC y se asocian a formas avanzadas de la enfermedad. Sin embargo, la capacidad para inhibir la inmunidad adaptativa varía entre los subtipos de MDSC y parece concentrarse principalmente en las M-MDSC. Se requiere más investigación para entender plenamente las propiedades inmunosupresoras y pro-tumorales de las MDSC circulantes e intratumorales en HCC, información que será crucial para diseñar estrategias terapéuticas dirigidas a estas células que mejoren las inmunoterapias actuales y futuras para el cáncer de hígado.

3. Las M-MDSC son un factor de riesgo de la aparición de neoplasia en el post-trasplante renal

El trasplante renal es el tratamiento de elección para pacientes con ERCA, mejorando su supervivencia y calidad de vida con respecto a la permanencia en diálisis. Si bien la terapia inmunosupresora mejora notablemente la supervivencia del injerto a corto y medio plazo, la inmunosupresión crónica contribuye al aumento de aparición de cáncer en los pacientes trasplantados, de forma que la neoplasia representa la segunda causa de morbilidad en RTR por detrás de los eventos cardiovasculares³⁴⁵.

En este contexto, la identificación de biomarcadores predictivos de cáncer en pacientes trasplantados adquiere una relevancia crucial. Contar con herramientas que permitan predecir qué individuos presentan un mayor riesgo de desarrollar neoplasias facilitaría un seguimiento clínico más estrecho y eficiente, permitiría establecer recomendaciones personalizadas de cribado oncológico, y, especialmente, abriría la posibilidad de ajustar de forma individualizada el tratamiento inmunosupresor.

En trabajos previos, nuestro grupo identificó que niveles elevados de M-MDSC a los 14 días post-trasplante eran un factor de riesgo de aparición de neoplasia *de novo* durante los dos primeros años post-trasplante³⁸⁶. En el presente estudio, se ha evaluado qué factores contribuyen a la aparición de cáncer en esa misma cohorte de RTR, ampliando el seguimiento clínico a nueve años tras el trasplante.

Se evaluaron 226 RTR, de los cuales 46 (20,4 %) desarrollaron neoplasia durante el periodo de seguimiento. Esta incidencia es ligeramente superior a la descrita en la literatura, que, aunque variable según la región y el estudio, se estima entre el 10 % y el 15 % a los 10 años post-trasplante^{344,345,350,442-445}. Sin embargo, en múltiples estudios los CCB no se consideran para la estadística lo que podría explicar la incidencia ligeramente superior reportada en este trabajo. En comparación con la población general, los tumores más frecuentes en receptores renales son el sarcoma de Kaposi, los CCNM y los PTLD^{344-347,352,360,445-447}. En nuestra cohorte, no se registraron casos de PTLD o sarcoma de Kaposi, siendo los carcinomas cutáneos los más frecuentes, que aparecieron en el 10 % del total de la cohorte y representaron el 50% de los casos de cáncer.

Entre los factores de riesgo asociados a la aparición de neoplasia post-trasplante, se identificó la edad como un factor independiente significativo, y el único predictor cuando se consideraron únicamente los pacientes con CCB. Esta asociación no es exclusiva de la población trasplantada³⁴⁹ dado que el riesgo de cáncer aumenta con la edad en la población general⁴⁴⁸. El antecedente de cáncer previo solo se asoció a la aparición de CCB, aunque no alcanzó significación estadística en el análisis multivariante. Otros factores comúnmente asociados a la aparición de cáncer – tabaquismo o exposición solar, en el caso de los cánceres cutáneos, – no han podido ser analizados en este estudio. Debido a las características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio tampoco se ha podido evaluar la influencia de la raza.

Por otro lado, encontramos que la diabetes *mellitus* como causa de la ERC era un factor protector, e incluso un factor pronóstico independiente en los TNC. En la población general, la diabetes se asocia a un mayor riesgo de cáncer hepático, pancreático o colorrectal. Sin embargo, estudios observacionales en trasplantados de Estados Unidos, Australia o Nueva Zelanda han reportado una reducción de hasta un 20 % en el riesgo de cáncer en el post-trasplante, en coincidencia con los resultados del presente trabajo^{349,350}. La enfermedad renal poliquística también se ha descrito como un factor protector con una reducción del 20 % en el riesgo de la aparición de cáncer^{449,450}.

En este estudio, la poliquistosis renal solo resultó un factor protector en los pacientes con TNC, aunque esta asociación no se mantuvo en el modelo multivariante.

La presencia de anticuerpos anti-HLA pre-trasplante y el antecedente de trasplante previo mostraron una tendencia no significativa como posibles factores protectores. Es posible que la sensibilización previa favorezca una mayor inmunovigilancia por activación del sistema inmunitario.

El exceso de cáncer observado en población trasplantada suele atribuirse a la inmunosupresión crónica necesaria para evitar el rechazo del injerto. Se ha observado que los pacientes tratados con agentes deplecionantes de linfocitos T presentan mayor riesgo de desarrollar tumores sólidos. RTR que recibieron ATG como inducción presentaban un aumento del 24 % de riesgo de aparición de tumores sólidos en comparación con aquellos que no recibieron inducción⁴⁵¹. De forma similar, en otra cohorte de trasplante renal, el uso de estos agentes para el tratamiento del rechazo agudo se asoció con un incremento del 42 % en el riesgo de neoplasias sólidas respecto a pacientes que no presentaron. Cabe destacar que el tratamiento del rechazo conlleva habitualmente un aumento en la dosis de inmunosupresores de mantenimiento, lo cual también podría contribuir a la aparición de cáncer. En ese mismo estudio, en el grupo de pacientes que sufrieron rechazo pero no fueron tratados con agentes deplecionantes como ATG, no se observó un riesgo significativamente elevado de tumores sólidos³⁶².

En nuestra cohorte no se observó una asociación entre el uso de ATG como terapia de inducción y un mayor riesgo de cáncer. Curiosamente, los pacientes que recibieron basiliximab presentaron un riesgo significativamente mayor de desarrollar neoplasias: 3,45 y 3,25 veces en el grupo general y TNC, respectivamente, y hasta 6,59 veces en los casos de CCE, en comparación con los tratados con ATG en el modelo univariante, no así en el modelo multivariante corregido. En la literatura, el uso de anticuerpos anti-IL-2R no se ha asociado con mayor riesgo de aparición de cáncer³⁶². Dado que la asociación de basiliximab se pierde en el modelo multivariante, es probable que esté influida por factores como la edad o el riesgo inmunológico, trasplantes previos y sensibilización anti-HLA, dado que basiliximab suele utilizarse en pacientes con bajo riesgo inmunológico⁴⁵².

Los resultados de los capítulos I y II de este trabajo sugieren que CD25 es funcional en las eMDSC, y que la población de eMDSC CD25⁺, por tener reducida capacidad inmunosupresora, se asociaría con mejor inmunovigilancia antitumoral. Si fuera así, la administración de basiliximab podría impedir la función de estas eMDSC no supresoras, alterando el equilibrio

hacia el predominio de las MDSC inmunosupresoras favorecedoras de la aparición de procesos neoplásicos. Esto se alinea con lo hallado en este capítulo, donde se reporta un mayor riesgo de aparición de neoplasias en pacientes trasplantados tratados con basiliximab. Aunque esta asociación se pierde en el modelo multivariante, el potencial efecto del bloqueo de la señal de la IL-2 en el fenotipo de las MDSC merece una evaluación más profunda.

En cuanto a la inmunosupresión de mantenimiento, se ha descrito que la azatioprina incrementa hasta 9 veces el riesgo de CCE en comparación con MMF⁴⁵³, mientras que los inhibidores de mTOR se asocian con un menor riesgo de cáncer en comparación con tacrolimus^{325,366,454-456}. No obstante, en nuestra cohorte, ninguno de los esquemas de inmunosupresión evaluados mostró una asociación significativa con la aparición de neoplasia.

Otros factores de riesgo descritos en la literatura, como haber recibido un órgano procedente de un donante cadáver en comparación con uno de donante de vivo³⁵⁸, tiempo prolongado en diálisis antes del trasplante³⁵⁴ e incompatibilidades en HLA-DR³⁵⁴, no se asociaron de manera significativa con el riesgo de cáncer en nuestro modelo de regresión.

Relativo a las M-MDSC, en línea con estudios previos³⁷⁹, los niveles de M-MDSC aumentaron significativamente a los 7 días tras el trasplante renal y se mantenían elevados durante el primer año post-trasplante. Los pacientes que posteriormente desarrollaron neoplasias presentaban niveles basales de M-MDSC más altos que aquellos que no desarrollaron cáncer. Esta diferencia también fue evidente en las mediciones realizadas a los 7 días post-trasplante. Estratificando los RTR según el tipo de tumor, encontramos que los pacientes con CCB presentaban niveles pre-trasplante de M-MDSC comparables a los pacientes sin cáncer. En cambio, aquellos que desarrollaron CCE o TNC mostraban una expansión significativa de M-MDSC en comparación con el grupo sin neoplasia.

El análisis de regresión puso de manifiesto que niveles elevados de M-MDSC, estratificados según curvas ROC, en el pre-trasplante, a los 7 días y al mes post-trasplante se asociaban con más del doble de riesgo de desarrollar neoplasia durante el seguimiento. Esta asociación no se observó para CCB pero se mantuvo en CCE y en TNC. Niveles elevados de M-MDSC en el pre-trasplante se mantuvieron como factor de riesgo independiente en los modelos de aparición de cáncer general, CCE y TNC mientras que la asociación con los niveles de M-MDSC al mes post-trasplante se perdió en el modelo multivariante.

Hasta la fecha, solo dos trabajos han reportado la relación entre M-MDSC y la aparición de neoplasia post-trasplante. El primero realizó un seguimiento prospectivo durante dos años desde el trasplante³⁸⁶ y el segundo incluyó RTR estables, con y sin historial de malignidad previa, seguidos durante un año³⁸⁷. Ambos trabajos identificaron un aumento de M-MDSC – o la disminución de HLA-DR en monocitos, característica de M-MDSC – como factor de riesgo independiente para el desarrollo de cáncer. Los resultados presentes aportan un seguimiento clínico mínimo de 9 años de la cohorte analizada en A. Utrero-Rico *et al*³⁸⁶. Si bien la falta de determinaciones de MDSC más allá del primer año post-trasplante constituye una limitación del trabajo, es muy importante señalar que fueron las mediciones de M-MDSC más próximas al trasplante las que resultaron ser las más útiles para la estratificación del riesgo oncológico.

Las M-MDSC han sido ampliamente implicadas en la progresión tumoral y, más recientemente, en la preparación del nicho pre-metastásico¹³⁴. En ratones con adenocarcinoma mamario las MDSC se acumulan en los pulmones antes de la llegada de las células tumorales⁴⁵⁷. Además, promueven la expansión de linfocitos Treg, reforzando el microambiente inmunosupresor³⁷⁹. Específicamente en el CCE, el eje monocito-macrófago desempeña un rol clave en la mutagénesis y progresión tumoral⁴⁵⁸. El análisis transcriptómico *single-cell* de pacientes con CCE de cabeza y cuello reveló que las MDSC mediaban la supresión de linfocitos T CD8⁺, facilitaban el reclutamiento de TAM y se correlacionaban con progresión tumoral y peor supervivencia⁴⁵⁹. En un modelo de ratón de este mismo tumor, las MDSC favorecían la progresión tumoral y estaban implicadas en la angiogénesis⁴⁶⁰. En este trabajo, son las M-MDSC en el peritrasplante, entre el pre-trasplante y el mes post-trasplante, y no en tiempos más lejanos las que se asociaban a aparición de tumores. De acuerdo con esto, el aumento temprano de M-MDSC tras el trasplante, quizás inducido por las señales inflamatorias de la cirugía, contribuiría, junto con muchos otros factores, al establecimiento de tumores en los pacientes trasplantados al condicionar un ambiente inmunosupresor favorecedor de aparición de tumores. Nuestras mediciones corresponden a las M-MDSC circulantes en sangre periférica pero es esperable pensar que son un reflejo del perfil encontrado en tejidos, donde quedan retenidas mediando el ambiente inmunosupresor favoreciendo además la expansión de otras poblaciones tolerogénicas como los linfocitos Treg o los TAM.

Así, las M-MDSC emergen como biomarcador prometedor para identificar pacientes con alto riesgo de desarrollar neoplasias post-trasplante, lo que permitiría intensificar el seguimiento clínico o ajustar a la baja la carga inmunosupresora. Esto resulta particularmente relevante, considerando que la inmunosupresión crónica compromete la inmunovigilancia antitumoral, con

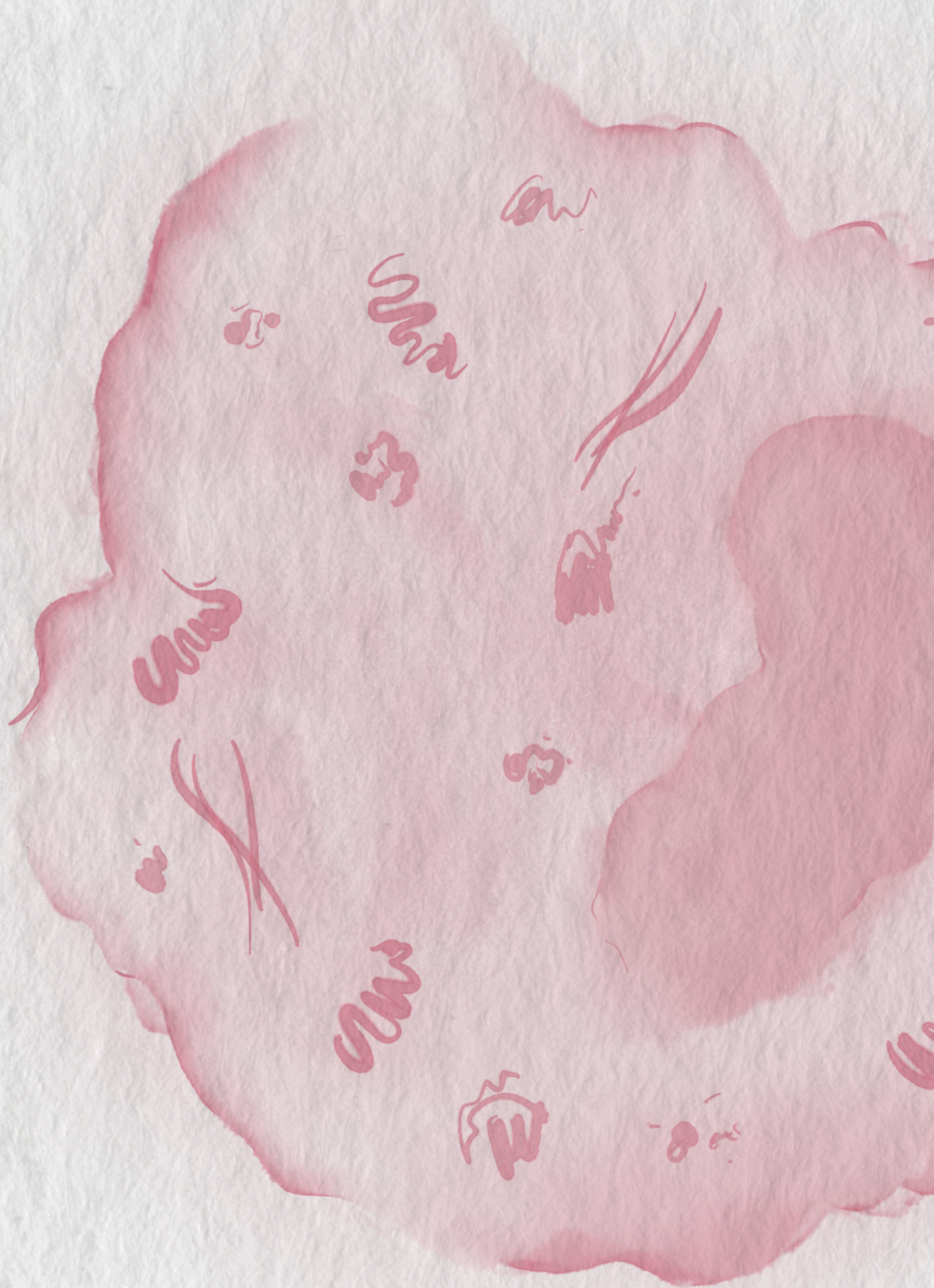
efectos que incluyen la reducción de linfocitos T CD8⁺ 461 y células NK⁴⁶² así como el aumento de linfocitos Treg^{463,464}.

No obstante, las M-MDSC también han demostrado propiedades tolerogénicas en el contexto del trasplante de órganos sólidos, actuando como una población inmunorreguladora beneficiosa³⁷⁷⁻³⁸¹.

En este contexto, la presencia de anticuerpos anti-HLA pre-trasplante surgió como el único factor de riesgo independiente para la aparición de anticuerpos anti-HLA y DSA *de novo* post-trasplante. Además, los pacientes que desarrollaron anticuerpos post-trasplante, especialmente DSA de clase II, mostraron un riesgo significativamente mayor de eventos de rechazo, en línea con publicaciones anteriores⁴⁶⁵⁻⁴⁶⁷. Por otro lado, niveles elevados de M-MDSC al mes post-trasplante actuaron como factor protector independiente frente al rechazo, reduciendo el riesgo entre un 40 % y un 60 % con respecto a los pacientes con M-MDSC bajas.

Múltiples evidencias experimentales refuerzan el rol tolerogénico de las MDSC. En un modelo de ratón de trasplante de córnea, la infusión de MDSC derivadas de médula ósea prolongaba la supervivencia del injerto⁴⁶⁸, y en uno de trasplante cardiaco, las MDSC migraban al órgano trasplantado e inhibían la respuesta adaptativa generando tolerancia al injerto³⁶⁷. Además, la expansión de MDSC se ha asociado a mayor supervivencia del injerto en diferentes estudios de trasplante renal³⁷⁹⁻³⁸¹, intestinal³⁸² o pulmonar³⁸³. Así, las MDSC se postulan como una potencial herramienta terapéutica celular, gracias a su capacidad de modular la respuesta aloinmune. En este trabajo, M-MDSC elevadas se asocian independientemente de otros factores a mayor aparición de neoplasia en el post-trasplante, pero a su vez son un factor protector de los eventos de rechazo debido en ambos casos al ambiente inmunosupresor que propician tras el trasplante.

Dado su carácter inmunosupresor, las MDSC constituyen un arma de doble filo en el contexto del trasplante, por un lado, favorecen la tolerancia al injerto al limitar la respuesta aloinmune; por otro, su persistencia o expansión excesiva puede comprometer la inmunovigilancia antitumoral y facilitar el desarrollo de neoplasias. Por tanto, futuros estudios deberían enfocarse en definir el rango óptimo de M-MDSC en pacientes trasplantados. La validación de nuestras observaciones permitiría establecer puntos de corte estandarizados para el uso de M-MDSC como biomarcador de estratificación de riesgo clínico en el seguimiento post-trasplante.





Conclusiones



De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, se puede concluir:

1. La expresión de CD25 define una nueva subpoblación de eMDSC, eMDSC CD25⁺. Basiliximab depleciona las eMDSC y las eMDSC CD25⁺ e impide la detección de CD25 *in vitro*. La depleción de las eMDSC no está mediada por citotoxicidad dependiente de complemento.
2. Solo las eMDSC, no los monocitos, M-MDSC ni PMN-MDSC, expresan las tres cadenas, α , β y γ , del receptor completo de IL-2, y presentan un receptor funcional que fosforila STAT5.
3. Los receptores de trasplante hepático con hepatocarcinoma presentan eMDSC CD25⁺ y estas aumentan en el post-trasplante.
4. Los pacientes con hepatocarcinoma presentan mayor ambiente inmunosupresor que los controles sanos y pacientes con colangiocarcinoma mostrando expansión de las tres subpoblaciones de MDSC: M-MDSC, PMN-MDSC y eMDSC, y niveles elevados de actividad Arg-1 e IL-10 séricos.
5. Las MDSC aisladas de pacientes con hepatocarcinoma presentan capacidad inmunosupresora *in vitro*. Las M-MDSC resultaron la subpoblación con mayor capacidad inhibitoria.
6. Las M-MDSC, eMDSC y eMDSC CD25⁺ se encontraron más elevadas en pacientes con hepatocarcinoma más avanzado, de acuerdo con el mayor número de nódulos, estadio TNM más avanzado y mayores niveles de alfa-fetoproteína.
7. Los receptores de trasplante renal que desarrollaron cáncer en el seguimiento post-trasplante presentaban niveles elevados de M-MDSC en el pre-trasplante y a los 7 días post-trasplante. Las M-MDSC aumentadas en el peritrasplante son un factor de riesgo independiente de aparición de neoplasia hasta 9 años post-trasplante.
8. La edad resultó el único factor de riesgo independiente para la aparición de neoplasia en el post-trasplante entre las variables clínicas o demográficas.
9. La edad emergió como el único factor de riesgo independiente para la aparición de carcinoma cutáneo basocelular.

10. La edad y niveles elevados de M-MDSC en el pre-trasplante fueron los únicos factores de riesgo independientes para la aparición de carcinoma cutáneo epidermoide.
11. La edad y niveles elevados de M-MDSC peritrasplante fueron los únicos factores de riesgo independientes para la aparición de tumores de órganos profundos. La nefropatía diabética resultó el único factor protector independiente.
12. La presencia de anticuerpos anti-HLA donante-específicos post-trasplante resultó un factor de riesgo independiente para la aparición de eventos de rechazo. Por su parte, niveles elevados de M-MDSC al mes post-trasplante surgieron como un factor protector independiente.





Bibliografía



- 1 Abul K. Abbas, A. H. L., Shiv Pillai. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier (2022).
- 2 Medzhitov, R. & Janeway, C. A., Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**, 4-9, doi:10.1016/s0952-7915(97)80152-5 (1997).
- 3 Liu, J. & Cao, X. Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. *Cell Mol Immunol* **13**, 711-721, doi:10.1038/cmi.2016.58 (2016).
- 4 Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* **248**, 701-702, doi:10.1038/248701a0 (1974).
- 5 Davis, M. M. & Bjorkman, P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**, 395-402, doi:10.1038/334395a0 (1988).
- 6 Lafferty, K. J. & Cunningham, A. J. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* **53**, 27-42, doi:10.1038/icb.1975.3 (1975).
- 7 Burnet, F. M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin* **26**, 119-121, doi:10.3322/canjclin.26.2.119 (1976).
- 8 Schwartz, R. H. Historical overview of immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a006908, doi:10.1101/cshperspect.a006908 (2012).
- 9 Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S. *et al.* Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**, 676-682, doi:10.1038/334676a0 (1988).
- 10 Pike, B. L., Boyd, A. W. & Nossal, G. J. Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2013-2017, doi:10.1073/pnas.79.6.2013 (1982).
- 11 Pircher, H., Burki, K., Lang, R., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* **342**, 559-561, doi:10.1038/342559a0 (1989).
- 12 Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J. *et al.* Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* **2**, 301-306, doi:10.1038/86302 (2001).
- 13 Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151-1164 (1995).
- 14 Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330-336, doi:10.1038/ni904 (2003).
- 15 Schwartz, R. H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* **248**, 1349-1356, doi:10.1126/science.2113314 (1990).

- 16 Jenkins, M. K. & Schwartz, R. H. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* **165**, 302-319, doi:10.1084/jem.165.2.302 (1987).
- 17 Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* **192**, 1027-1034, doi:10.1084/jem.192.7.1027 (2000).
- 18 Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y. *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1**, 405-413, doi:10.1016/1074-7613(94)90071-x (1994).
- 19 Thomas, L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* **55**, 329-333 (1982).
- 20 Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* **29**, 235-271, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324 (2011).
- 21 Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991-998, doi:10.1038/ni1102-991 (2002).
- 22 Jiang, Y., Li, Y. & Zhu, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis* **6**, e1792, doi:10.1038/cddis.2015.162 (2015).
- 23 Hicklin, D. J., Wang, Z., Arienti, F. *et al.* beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest* **101**, 2720-2729, doi:10.1172/JCI498 (1998).
- 24 Algarra, I., Collado, A. & Garrido, F. Altered MHC class I antigens in tumors. *Int J Clin Lab Res* **27**, 95-102, doi:10.1007/BF02912442 (1997).
- 25 Waldman, A. D., Fritz, J. M. & Lenardo, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* **20**, 651-668, doi:10.1038/s41577-020-0306-5 (2020).
- 26 Morotti, M., Albukhari, A., Alsaadi, A. *et al.* Promises and challenges of adoptive T-cell therapies for solid tumours. *Br J Cancer* **124**, 1759-1776, doi:10.1038/s41416-021-01353-6 (2021).
- 27 Saxena, M., van der Burg, S. H., Melief, C. J. M. & Bhardwaj, N. Therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Cancer* **21**, 360-378, doi:10.1038/s41568-021-00346-0 (2021).
- 28 Mayoux, M., Roller, A., Pulko, V. *et al.* Dendritic cells dictate responses to PD-L1 blockade cancer immunotherapy. *Sci Transl Med* **12**, doi:10.1126/scitranslmed.aav7431 (2020).
- 29 Garcia-Diaz, N., Wei, Q. & Tasken, K. Small molecule inhibitors targeting regulatory T cells for cancer treatment. *Eur J Immunol* **54**, e2350448, doi:10.1002/eji.202350448 (2024).

- 30 Highfill, S. L., Cui, Y., Giles, A. J. *et al.* Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD1 efficacy. *Sci Transl Med* **6**, 237ra267, doi:10.1126/scitranslmed.3007974 (2014).
- 31 Zhu, Y., Knolhoff, B. L., Meyer, M. A. *et al.* CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res* **74**, 5057-5069, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3723 (2014).
- 32 Ries, C. H., Cannarile, M. A., Hoves, S. *et al.* Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell* **25**, 846-859, doi:10.1016/j.ccr.2014.05.016 (2014).
- 33 Barry, S. T., Gabrilovich, D. I., Sansom, O. J., Campbell, A. D. & Morton, J. P. Therapeutic targeting of tumour myeloid cells. *Nat Rev Cancer* **23**, 216-237, doi:10.1038/s41568-022-00546-2 (2023).
- 34 Nywening, T. M., Wang-Gillam, A., Sanford, D. E. *et al.* Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *Lancet Oncol* **17**, 651-662, doi:10.1016/S1470-2045(16)00078-4 (2016).
- 35 Pienta, K. J., Machiels, J. P., Schrijvers, D. *et al.* Phase 2 study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 (CCL2), in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Invest New Drugs* **31**, 760-768, doi:10.1007/s10637-012-9869-8 (2013).
- 36 Brana, I., Calles, A., LoRusso, P. M. *et al.* Carlumab, an anti-C-C chemokine ligand 2 monoclonal antibody, in combination with four chemotherapy regimens for the treatment of patients with solid tumors: an open-label, multicenter phase 1b study. *Target Oncol* **10**, 111-123, doi:10.1007/s11523-014-0320-2 (2015).
- 37 Mayrdorfer, M., Liefeldt, L., Wu, K. *et al.* Exploring the Complexity of Death-Censored Kidney Allograft Failure. *J Am Soc Nephrol* **32**, 1513-1526, doi:10.1681/ASN.2020081215 (2021).
- 38 Xie, B., Chen, J., Wang, F. *et al.* Monoclonal antibody treatment to prolong the secondary cardiac allograft survival in alloantigen-primed mice. *Scand J Immunol* **71**, 345-352, doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02387.x (2010).
- 39 Kirk, A. D., Burkly, L. C., Batty, D. S. *et al.* Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* **5**, 686-693, doi:10.1038/9536 (1999).
- 40 Larsen, C. P., Elwood, E. T., Alexander, D. Z. *et al.* Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* **381**, 434-438, doi:10.1038/381434a0 (1996).
- 41 Pierson, R. N., 3rd, Chang, A. C., Blum, M. G. *et al.* Prolongation of primate cardiac allograft survival by treatment with ANTI-CD40 ligand (CD154) antibody. *Transplantation* **68**, 1800-1805, doi:10.1097/00007890-199912150-00026 (1999).

- 42 Kirk, A. D., Harlan, D. M., Armstrong, N. N. *et al.* CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8789-8794, doi:10.1073/pnas.94.16.8789 (1997).
- 43 Kirk, A. D., Adams, A. B., Durrbach, A. *et al.* Optimization of de novo belatacept-based immunosuppression administered to renal transplant recipients. *Am J Transplant* **21**, 1691-1698, doi:10.1111/ajt.16386 (2021).
- 44 Schroder, P. M., Fitch, Z. W., Schmitz, R. *et al.* The past, present, and future of costimulation blockade in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **24**, 391-401, doi:10.1097/MOT.0000000000000656 (2019).
- 45 Duran-Struuck, R., Sondermeijer, H. P., Buhler, L. *et al.* Effect of Ex Vivo-Expanded Recipient Regulatory T Cells on Hematopoietic Chimerism and Kidney Allograft Tolerance Across MHC Barriers in Cynomolgus Macaques. *Transplantation* **101**, 274-283, doi:10.1097/TP.0000000000001559 (2017).
- 46 Scandling, J. D., Busque, S., Shizuru, J. A. *et al.* Chimerism, graft survival, and withdrawal of immunosuppressive drugs in HLA matched and mismatched patients after living donor kidney and hematopoietic cell transplantation. *Am J Transplant* **15**, 695-704, doi:10.1111/ajt.13091 (2015).
- 47 Kawai, T., Sachs, D. H., Sprangers, B. *et al.* Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am J Transplant* **14**, 1599-1611, doi:10.1111/ajt.12731 (2014).
- 48 Leventhal, J., Abecassis, M., Miller, J. *et al.* Tolerance induction in HLA disparate living donor kidney transplantation by donor stem cell infusion: durable chimerism predicts outcome. *Transplantation* **95**, 169-176, doi:10.1097/TP.0b013e3182782fc1 (2013).
- 49 Kawai, T., Cosimi, A. B., Spitzer, T. R. *et al.* HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* **358**, 353-361, doi:10.1056/NEJMoa071074 (2008).
- 50 Podesta, M. A. & Sykes, M. Chimerism-Based Tolerance to Kidney Allografts in Humans: Novel Insights and Future Perspectives. *Front Immunol* **12**, 791725, doi:10.3389/fimmu.2021.791725 (2021).
- 51 Lu, X., Yang, X., Zhou, Q. *et al.* Cardiac allograft tolerance induced by isogeneic CD4+CD25+ regulatory T cells. *Exp Clin Transplant* **12**, 133-138 (2014).
- 52 Ezzelarab, M. B., Zahorchak, A. F., Lu, L. *et al.* Regulatory dendritic cell infusion prolongs kidney allograft survival in nonhuman primates. *Am J Transplant* **13**, 1989-2005, doi:10.1111/ajt.12310 (2013).
- 53 Hill, M., Thebault, P., Segovia, M. *et al.* Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. *Am J Transplant* **11**, 2036-2045, doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03651.x (2011).

- 54 Cai, S., Choi, J. Y., Borges, T. J. *et al.* Donor myeloid derived suppressor cells (MDSCs) prolong allogeneic cardiac graft survival through programming of recipient myeloid cells in vivo. *Sci Rep* **10**, 14249, doi:10.1038/s41598-020-71289-z (2020).
- 55 Bernaldo-de-Quiros, E., Camino, M., Martinez-Bonet, M. *et al.* First-in-human therapy with Treg produced from thymic tissue (thyTreg) in a heart transplant infant. *J Exp Med* **220**, doi:10.1084/jem.20231045 (2023).
- 56 Mathew, J. M., J, H. V., LeFever, A. *et al.* A Phase I Clinical Trial with Ex Vivo Expanded Recipient Regulatory T cells in Living Donor Kidney Transplants. *Sci Rep* **8**, 7428, doi:10.1038/s41598-018-25574-7 (2018).
- 57 Sawitzki, B., Harden, P. N., Reinke, P. *et al.* Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *Lancet* **395**, 1627-1639, doi:10.1016/S0140-6736(20)30167-7 (2020).
- 58 Shi, M., Liu, Z., Wang, Y. *et al.* A Pilot Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Acute Liver Allograft Rejection. *Stem Cells Transl Med* **6**, 2053-2061, doi:10.1002/sctm.17-0134 (2017).
- 59 Lappat, E. J. & Cawein, M. A Study of the Leukemoid Response to Transplantable a-280 Tumor in Mice. *Cancer Res* **24**, 302-311 (1964).
- 60 Duwe, A. K. & Singhal, S. K. The immunoregulatory role of bone marrow. I. Suppression of the induction of antibody responses to T-dependent and T-independent antigens by cells in the bone marrow. *Cell Immunol* **43**, 362-371, doi:10.1016/0008-8749(79)90180-1 (1979).
- 61 Bennett, J. A., Rao, V. S. & Mitchell, M. S. Systemic bacillus Calmette-Guerin (BCG) activates natural suppressor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 5142-5144, doi:10.1073/pnas.75.10.5142 (1978).
- 62 Mielcarek, M., Martin, P. J. & Torok-Storb, B. Suppression of alloantigen-induced T-cell proliferation by CD14⁺ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Blood* **89**, 1629-1634 (1997).
- 63 Pak, A. S., Wright, M. A., Matthews, J. P. *et al.* Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* **1**, 95-103 (1995).
- 64 Bronte, V., Chappell, D. B., Apolloni, E. *et al.* Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8⁺ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol* **162**, 5728-5737 (1999).
- 65 Almand, B., Clark, J. I., Nikitina, E. *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* **166**, 678-689, doi:10.4049/jimmunol.166.1.678 (2001).

- 66 Gabrilovich, D. I., Bronte, V., Chen, S. H. *et al.* The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* **67**, 425; author reply 426, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3037 (2007).
- 67 Bronte, V., Brandau, S., Chen, S. H. *et al.* Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* **7**, 12150, doi:10.1038/ncomms12150 (2016).
- 68 Bayik, D., Lee, J. & Lathia, J. D. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Growth and Metastasis. *Exp Suppl* **113**, 189-217, doi:10.1007/978-3-030-91311-3_7 (2022).
- 69 Li, K., Shi, H., Zhang, B. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 362, doi:10.1038/s41392-021-00670-9 (2021).
- 70 Veglia, F., Perego, M. & Gabrilovich, D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* **19**, 108-119, doi:10.1038/s41590-017-0022-x (2018).
- 71 Tavukcuoglu, E., Horzum, U., Yanik, H. *et al.* Human splenic polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSC) are strategically located immune regulatory cells in cancer. *Eur J Immunol* **50**, 2067-2074, doi:10.1002/eji.202048666 (2020).
- 72 Nan, J., Xing, Y. F., Hu, B. *et al.* Endoplasmic reticulum stress induced LOX-1(+) CD15(+) polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma. *Immunology* **154**, 144-155, doi:10.1111/imm.12876 (2018).
- 73 Condamine, T., Dominguez, G. A., Youn, J. I. *et al.* Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol* **1**, doi:10.1126/sciimmunol.aaf8943 (2016).
- 74 Zhang, W., Jiang, M., Chen, J. *et al.* SOCS3 Suppression Promoted the Recruitment of CD11b(+)Gr-1(-)F4/80(-)MHCII(-) Early-Stage Myeloid-Derived Suppressor Cells and Accelerated Interleukin-6-Related Tumor Invasion via Affecting Myeloid Differentiation in Breast Cancer. *Front Immunol* **9**, 1699, doi:10.3389/fimmu.2018.01699 (2018).
- 75 Alshetaiwi, H., Pervolarakis, N., McIntyre, L. L. *et al.* Defining the emergence of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer using single-cell transcriptomics. *Sci Immunol* **5**, doi:10.1126/sciimmunol.aay6017 (2020).
- 76 Pettinella, F., Mariotti, B., Lattanzi, C. *et al.* Surface CD52, CD84, and PTGER2 mark mature PMN-MDSCs from cancer patients and G-CSF-treated donors. *Cell Rep Med* **5**, 101380, doi:10.1016/j.xcrm.2023.101380 (2024).
- 77 Lewinsky, H., Gunes, E. G., David, K. *et al.* CD84 is a regulator of the immunosuppressive microenvironment in multiple myeloma. *JCI Insight* **6**, doi:10.1172/jci.insight.141683 (2021).
- 78 Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**, 762-774, doi:10.1038/nri3070 (2011).

- 79 Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N. *et al.* Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog* **11**, e1004651, doi:10.1371/journal.ppat.1004651 (2015).
- 80 Yan, D., Yang, Q., Shi, M. *et al.* Polyunsaturated fatty acids promote the expansion of myeloid-derived suppressor cells by activating the JAK/STAT3 pathway. *Eur J Immunol* **43**, 2943-2955, doi:10.1002/eji.201343472 (2013).
- 81 Dolcetti, L., Peranzoni, E., Ugel, S. *et al.* Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol* **40**, 22-35, doi:10.1002/eji.200939903 (2010).
- 82 Condamine, T., Mastio, J. & Gabrilovich, D. I. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol* **98**, 913-922, doi:10.1189/jlb.4RI0515-204R (2015).
- 83 Karin, N. The Development and Homing of Myeloid-Derived Suppressor Cells: From a Two-Stage Model to a Multistep Narrative. *Front Immunol* **11**, 557586, doi:10.3389/fimmu.2020.557586 (2020).
- 84 Okuma, A., Hanyu, A., Watanabe, S. & Hara, E. p16(Ink4a) and p21(Cip1/Waf1) promote tumour growth by enhancing myeloid-derived suppressor cells chemotaxis. *Nat Commun* **8**, 2050, doi:10.1038/s41467-017-02281-x (2017).
- 85 Steele, C. W., Karim, S. A., Leach, J. D. G. *et al.* CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **29**, 832-845, doi:10.1016/j.ccell.2016.04.014 (2016).
- 86 Cortez-Retamozo, V., Etzrodt, M., Newton, A. *et al.* Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2491-2496, doi:10.1073/pnas.1113744109 (2012).
- 87 Jackson, C., Cherry, C., Bom, S. *et al.* Distinct myeloid-derived suppressor cell populations in human glioblastoma. *Science* **387**, eabm5214, doi:10.1126/science.abm5214 (2025).
- 88 Trovato, R., Fiore, A., Sartori, S. *et al.* Immunosuppression by monocytic myeloid-derived suppressor cells in patients with pancreatic ductal carcinoma is orchestrated by STAT3. *J Immunother Cancer* **7**, 255, doi:10.1186/s40425-019-0734-6 (2019).
- 89 Kumar, V., Cheng, P., Condamine, T. *et al.* CD45 Phosphatase Inhibits STAT3 Transcription Factor Activity in Myeloid Cells and Promotes Tumor-Associated Macrophage Differentiation. *Immunity* **44**, 303-315, doi:10.1016/j.immuni.2016.01.014 (2016).
- 90 Marvel, D. & Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest* **125**, 3356-3364, doi:10.1172/JCI80005 (2015).
- 91 Pico de Coana, Y., Poschke, I., Gentilcore, G. *et al.* Ipilimumab treatment results in an early decrease in the frequency of circulating granulocytic myeloid-derived suppressor

- cells as well as their Arginase1 production. *Cancer Immunol Res* **1**, 158-162, doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0016 (2013).
- 92 Wang, L., Jia, B., Claxton, D. F. *et al.* VISTA is highly expressed on MDSCs and mediates an inhibition of T cell response in patients with AML. *Oncoimmunology* **7**, e1469594, doi:10.1080/2162402X.2018.1469594 (2018).
- 93 Sakuishi, K., Jayaraman, P., Behar, S. M., Anderson, A. C. & Kuchroo, V. K. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. *Trends Immunol* **32**, 345-349, doi:10.1016/j.it.2011.05.003 (2011).
- 94 Harjunpaa, H. & Guillerey, C. TIGIT as an emerging immune checkpoint. *Clin Exp Immunol* **200**, 108-119, doi:10.1111/cei.13407 (2020).
- 95 Wu, L., Mao, L., Liu, J. F. *et al.* Blockade of TIGIT/CD155 Signaling Reverses T-cell Exhaustion and Enhances Antitumor Capability in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res* **7**, 1700-1713, doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0725 (2019).
- 96 Le Mercier, I., Chen, W., Lines, J. L. *et al.* VISTA Regulates the Development of Protective Antitumor Immunity. *Cancer Res* **74**, 1933-1944, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1506 (2014).
- 97 Cimen Bozkus, C., Elzey, B. D., Crist, S. A., Ellies, L. G. & Ratliff, T. L. Expression of Cationic Amino Acid Transporter 2 Is Required for Myeloid-Derived Suppressor Cell-Mediated Control of T Cell Immunity. *J Immunol* **195**, 5237-5250, doi:10.4049/jimmunol.1500959 (2015).
- 98 Rodriguez, P. C. & Ochoa, A. C. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* **222**, 180-191, doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00608.x (2008).
- 99 Zea, A. H., Rodriguez, P. C., Culotta, K. S. *et al.* L-Arginine modulates CD3zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes. *Cell Immunol* **232**, 21-31, doi:10.1016/j.cellimm.2005.01.004 (2004).
- 100 Rodriguez, P. C., Ernstoff, M. S., Hernandez, C. *et al.* 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 (2009).
- 101 Srivastava, M. K., Sinha, P., Clements, V. K., Rodriguez, P. & Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res* **70**, 68-77, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2587 (2010).
- 102 Yu, J., Du, W., Yan, F. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol* **190**, 3783-3797, doi:10.4049/jimmunol.1201449 (2013).
- 103 Nagaraj, S., Schrum, A. G., Cho, H. I., Celis, E. & Gabrilovich, D. I. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* **184**, 3106-3116, doi:10.4049/jimmunol.0902661 (2010).

- 104 Mazzone, A., Bronte, V., Visintin, A. *et al.* Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol* **168**, 689-695, doi:10.4049/jimmunol.168.2.689 (2002).
- 105 Corzo, C. A., Cotter, M. J., Cheng, P. *et al.* Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* **182**, 5693-5701, doi:10.4049/jimmunol.0900092 (2009).
- 106 Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V. *et al.* Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8⁺ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* **13**, 828-835, doi:10.1038/nm1609 (2007).
- 107 Lu, T., Ramakrishnan, R., Altiok, S. *et al.* Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J Clin Invest* **121**, 4015-4029, doi:10.1172/JCI45862 (2011).
- 108 Molon, B., Ugel, S., Del Pozzo, F. *et al.* Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med* **208**, 1949-1962, doi:10.1084/jem.20101956 (2011).
- 109 Li, J., Wang, L., Chen, X. *et al.* CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF-beta-mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* **6**, e1320011, doi:10.1080/2162402X.2017.1320011 (2017).
- 110 Vijayan, D., Young, A., Teng, M. W. L. & Smyth, M. J. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat Rev Cancer* **17**, 709-724, doi:10.1038/nrc.2017.86 (2017).
- 111 Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C. & Stagg, J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev* **276**, 121-144, doi:10.1111/imr.12528 (2017).
- 112 Ryzhov, S., Novitskiy, S. V., Goldstein, A. E. *et al.* Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b⁺Gr1⁺ cells. *J Immunol* **187**, 6120-6129, doi:10.4049/jimmunol.1101225 (2011).
- 113 Hanson, E. M., Clements, V. K., Sinha, P., Ilkovitch, D. & Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol* **183**, 937-944, doi:10.4049/jimmunol.0804253 (2009).
- 114 Schoupe, E., Mommer, C., Movahedi, K. *et al.* Tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subsets exert either inhibitory or stimulatory effects on distinct CD8⁺ T-cell activation events. *Eur J Immunol* **43**, 2930-2942, doi:10.1002/eji.201343349 (2013).
- 115 Gehad, A. E., Lichtman, M. K., Schmults, C. D. *et al.* Nitric oxide-producing myeloid-derived suppressor cells inhibit vascular E-selectin expression in human squamous cell carcinomas. *J Invest Dermatol* **132**, 2642-2651, doi:10.1038/jid.2012.190 (2012).
- 116 Hart, K. M., Byrne, K. T., Molloy, M. J., Usherwood, E. M. & Berwin, B. IL-10 immunomodulation of myeloid cells regulates a murine model of ovarian cancer. *Front Immunol* **2**, 29, doi:10.3389/fimmu.2011.00029 (2011).

- 117 Azzaoui, I., Uhel, F., Rossille, D. *et al.* T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood* **128**, 1081-1092, doi:10.1182/blood-2015-08-662783 (2016).
- 118 Ren, J. P., Zhao, J., Dai, J. *et al.* Hepatitis C virus-induced myeloid-derived suppressor cells regulate T-cell differentiation and function via the signal transducer and activator of transcription 3 pathway. *Immunology* **148**, 377-386, doi:10.1111/imm.12616 (2016).
- 119 Rastad, J. L. & Green, W. R. Myeloid-derived suppressor cells in murine AIDS inhibit B-cell responses in part via soluble mediators including reactive oxygen and nitrogen species, and TGF-beta. *Virology* **499**, 9-22, doi:10.1016/j.virol.2016.08.031 (2016).
- 120 Chikamatsu, K., Sakakura, K., Toyoda, M. *et al.* Immunosuppressive activity of CD14+ HLA-DR- cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci* **103**, 976-983, doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02248.x (2012).
- 121 Brudecki, L., Ferguson, D. A., McCall, C. E. & El Gazzar, M. Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infect Immun* **80**, 2026-2034, doi:10.1128/IAI.00239-12 (2012).
- 122 Hoechst, B., Voigtlaender, T., Ormandy, L. *et al.* Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology* **50**, 799-807, doi:10.1002/hep.23054 (2009).
- 123 Stiff, A., Trikha, P., Mundy-Bosse, B. *et al.* Nitric Oxide Production by Myeloid-Derived Suppressor Cells Plays a Role in Impairing Fc Receptor-Mediated Natural Killer Cell Function. *Clin Cancer Res* **24**, 1891-1904, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0691 (2018).
- 124 Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M. & Cao, X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* **182**, 240-249, doi:10.4049/jimmunol.182.1.240 (2009).
- 125 Ugolini, A., Tyurin, V. A., Tyurina, Y. Y. *et al.* Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells limit antigen cross-presentation by dendritic cells in cancer. *JCI Insight* **5**, doi:10.1172/jci.insight.138581 (2020).
- 126 Poschke, I., Mao, Y., Adamson, L. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells impair the quality of dendritic cell vaccines. *Cancer Immunol Immunother* **61**, 827-838, doi:10.1007/s00262-011-1143-y (2012).
- 127 Wang, Y., Schafer, C. C., Hough, K. P. *et al.* Myeloid-Derived Suppressor Cells Impair B Cell Responses in Lung Cancer through IL-7 and STAT5. *J Immunol* **201**, 278-295, doi:10.4049/jimmunol.1701069 (2018).
- 128 Shen, M., Wang, J., Yu, W. *et al.* A novel MDSC-induced PD-1(-)PD-L1(+) B-cell subset in breast tumor microenvironment possesses immuno-suppressive properties. *Oncoimmunology* **7**, e1413520, doi:10.1080/2162402X.2017.1413520 (2018).
- 129 Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S. & Bronte, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* **12**, 253-268, doi:10.1038/nri3175 (2012).

- 130 Schlecker, E., Stojanovic, A., Eisen, C. *et al.* Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol* **189**, 5602-5611, doi:10.4049/jimmunol.1201018 (2012).
- 131 Haist, M., Stege, H., Grabbe, S. & Bros, M. The Functional Crosstalk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells within the Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)* **13**, doi:10.3390/cancers13020210 (2021).
- 132 Siret, C., Collignon, A., Silvy, F. *et al.* Deciphering the Crosstalk Between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Front Immunol* **10**, 3070, doi:10.3389/fimmu.2019.03070 (2019).
- 133 Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P., Beury, D. W. & Clements, V. K. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin Cancer Biol* **22**, 275-281, doi:10.1016/j.semcancer.2012.01.011 (2012).
- 134 Wang, Y., Ding, Y., Guo, N. & Wang, S. MDSCs: Key Criminals of Tumor Pre-metastatic Niche Formation. *Front Immunol* **10**, 172, doi:10.3389/fimmu.2019.00172 (2019).
- 135 Lebrun, A., Lo Re, S., Chantry, M. *et al.* CCR2(+) monocytic myeloid-derived suppressor cells (M-MDSCs) inhibit collagen degradation and promote lung fibrosis by producing transforming growth factor-beta1. *J Pathol* **243**, 320-330, doi:10.1002/path.4956 (2017).
- 136 Cui, T. X., Kryczek, I., Zhao, L. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA101 and suppressing the corepressor CtBP2. *Immunity* **39**, 611-621, doi:10.1016/j.immuni.2013.08.025 (2013).
- 137 Peng, D., Tanikawa, T., Li, W. *et al.* Myeloid-Derived Suppressor Cells Endow Stem-like Qualities to Breast Cancer Cells through IL6/STAT3 and NO/NOTCH Cross-talk Signaling. *Cancer Res* **76**, 3156-3165, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2528 (2016).
- 138 Yang, Y., Li, C., Liu, T., Dai, X. & Bazhin, A. V. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumors: From Mechanisms to Antigen Specificity and Microenvironmental Regulation. *Front Immunol* **11**, 1371, doi:10.3389/fimmu.2020.01371 (2020).
- 139 Movahedi, K., Guillems, M., Van den Bossche, J. *et al.* Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* **111**, 4233-4244, doi:10.1182/blood-2007-07-099226 (2008).
- 140 Lang, S., Bruderek, K., Kaspar, C. *et al.* Clinical Relevance and Suppressive Capacity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets. *Clin Cancer Res* **24**, 4834-4844, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3726 (2018).
- 141 Gabitass, R. F., Annels, N. E., Stocken, D. D., Pandha, H. A. & Middleton, G. W. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother* **60**, 1419-1430, doi:10.1007/s00262-011-1028-0 (2011).

- 142 Deng, Y., Cheng, J., Fu, B. *et al.* Hepatic carcinoma-associated fibroblasts enhance immune suppression by facilitating the generation of myeloid-derived suppressor cells. *Oncogene* **36**, 1090-1101, doi:10.1038/onc.2016.273 (2017).
- 143 Zhou, J., Liu, M., Sun, H. *et al.* Hepatoma-intrinsic CCRK inhibition diminishes myeloid-derived suppressor cell immunosuppression and enhances immune-checkpoint blockade efficacy. *Gut* **67**, 931-944, doi:10.1136/gutjnl-2017-314032 (2018).
- 144 Wang, D., An, G., Xie, S., Yao, Y. & Feng, G. The clinical and prognostic significance of CD14(+)/HLA-DR(-/low) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients receiving radiotherapy. *Tumour Biol* **37**, 10427-10433, doi:10.1007/s13277-016-4916-2 (2016).
- 145 Solito, S., Falisi, E., Diaz-Montero, C. M. *et al.* A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood* **118**, 2254-2265, doi:10.1182/blood-2010-12-325753 (2011).
- 146 Jiang, H., Gebhardt, C., Umansky, L. *et al.* Elevated chronic inflammatory factors and myeloid-derived suppressor cells indicate poor prognosis in advanced melanoma patients. *Int J Cancer* **136**, 2352-2360, doi:10.1002/ijc.29297 (2015).
- 147 Sade-Feldman, M., Kanterman, J., Klieger, Y. *et al.* Clinical Significance of Circulating CD33+CD11b+HLA-DR- Myeloid Cells in Patients with Stage IV Melanoma Treated with Ipilimumab. *Clin Cancer Res* **22**, 5661-5672, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-3104 (2016).
- 148 Chevolet, I., Speckaert, R., Schreuer, M. *et al.* Clinical significance of plasmacytoid dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells in melanoma. *J Transl Med* **13**, 9, doi:10.1186/s12967-014-0376-x (2015).
- 149 Yang, G., Shen, W., Zhang, Y. *et al.* Accumulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) induced by low levels of IL-6 correlates with poor prognosis in bladder cancer. *Oncotarget* **8**, 38378-38388, doi:10.18632/oncotarget.16386 (2017).
- 150 Santegoets, S. J., Stam, A. G., Loughheed, S. M. *et al.* Myeloid derived suppressor and dendritic cell subsets are related to clinical outcome in prostate cancer patients treated with prostate GVAX and ipilimumab. *J Immunother Cancer* **2**, 31, doi:10.1186/s40425-014-0031-3 (2014).
- 151 de Goeje, P. L., Bezemer, K., Heuvers, M. E. *et al.* Immunoglobulin-like transcript 3 is expressed by myeloid-derived suppressor cells and correlates with survival in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* **4**, e1014242, doi:10.1080/2162402X.2015.1014242 (2015).
- 152 Tian, T., Gu, X., Zhang, B. *et al.* Increased circulating CD14(+)/HLA-DR(-/low) myeloid-derived suppressor cells are associated with poor prognosis in patients with small-cell lung cancer. *Cancer Biomark* **15**, 425-432, doi:10.3233/CBM-150473 (2015).
- 153 Gao, X. H., Tian, L., Wu, J. *et al.* Circulating CD14(+)/HLA-DR(-/low) myeloid-derived suppressor cells predicted early recurrence of hepatocellular carcinoma after surgery. *Hepatol Res* **47**, 1061-1071, doi:10.1111/hepr.12831 (2017).

- 154 Mizukoshi, E., Yamashita, T., Arai, K. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells correlate with patient outcomes in hepatic arterial infusion chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* **65**, 715-725, doi:10.1007/s00262-016-1837-2 (2016).
- 155 Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A. *et al.* Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med* **18**, 1254-1261, doi:10.1038/nm.2883 (2012).
- 156 Huang, H., Zhang, G., Li, G., Ma, H. & Zhang, X. Circulating CD14(+)HLA-DR(-/low) myeloid-derived suppressor cell is an indicator of poor prognosis in patients with ESCC. *Tumour Biol* **36**, 7987-7996, doi:10.1007/s13277-015-3426-y (2015).
- 157 Shoji, H., Tada, K., Kitano, S. *et al.* The peripheral immune status of granulocytic myeloid-derived suppressor cells correlates the survival in advanced gastric cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Oncotarget* **8**, 95083-95094, doi:10.18632/oncotarget.18297 (2017).
- 158 Wang, L., Chang, E. W., Wong, S. C. *et al.* Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *J Immunol* **190**, 794-804, doi:10.4049/jimmunol.1202088 (2013).
- 159 Chen, G., Li, X., Ji, C. *et al.* Early myeloid-derived suppressor cells accelerate epithelial-mesenchymal transition by downregulating ARID1A in luminal A breast cancer. *Front Bioeng Biotechnol* **10**, 973731, doi:10.3389/fbioe.2022.973731 (2022).
- 160 Jiang, M., Chen, J., Zhang, W. *et al.* Interleukin-6 Trans-Signaling Pathway Promotes Immunosuppressive Myeloid-Derived Suppressor Cells via Suppression of Suppressor of Cytokine Signaling 3 in Breast Cancer. *Front Immunol* **8**, 1840, doi:10.3389/fimmu.2017.01840 (2017).
- 161 Pu, L. F., Li, M. M., Feng, X. J. *et al.* Accumulation of circulating myeloid-derived suppressor cell subsets: predicting poor clinical efficacy and prognosis through T cell suppression in non-Hodgkin's lymphoma. *J Leukoc Biol* **115**, 1094-1107, doi:10.1093/jleuko/qiae032 (2024).
- 162 Kobayashi, Y., Yamada, D., Kawai, T. *et al.* Different immunological effects of the molecular targeted agents sunitinib, everolimus and temsirolimus in patients with renal cell carcinoma. *Int J Oncol* **56**, 999-1013, doi:10.3892/ijo.2020.4975 (2020).
- 163 Martens, A., Wistuba-Hamprecht, K., Geukes Foppen, M. *et al.* Baseline Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Clin Cancer Res* **22**, 2908-2918, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2412 (2016).
- 164 Weber, J., Gibney, G., Kudchadkar, R. *et al.* Phase I/II Study of Metastatic Melanoma Patients Treated with Nivolumab Who Had Progressed after Ipilimumab. *Cancer Immunol Res* **4**, 345-353, doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0193 (2016).
- 165 Pico de Coana, Y., Wolodarski, M., van der Haar Avila, I. *et al.* PD-1 checkpoint blockade in advanced melanoma patients: NK cells, monocytic subsets and host PD-L1 expression

- as predictive biomarker candidates. *Oncoimmunology* **9**, 1786888, doi:10.1080/2162402X.2020.1786888 (2020).
- 166 Limagne, E., Richard, C., Thibaudin, M. *et al.* Tim-3/galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients. *Oncoimmunology* **8**, e1564505, doi:10.1080/2162402X.2018.1564505 (2019).
- 167 Karzai, F., VanderWeele, D., Madan, R. A. *et al.* Activity of durvalumab plus olaparib in metastatic castration-resistant prostate cancer in men with and without DNA damage repair mutations. *J Immunother Cancer* **6**, 141, doi:10.1186/s40425-018-0463-2 (2018).
- 168 Zhuo, M., Chen, H., Zhang, T. *et al.* The potential predictive value of circulating immune cell ratio and tumor marker in atezolizumab treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biomark* **22**, 467-476, doi:10.3233/CBM-171089 (2018).
- 169 Jain, M. D., Zhao, H., Wang, X. *et al.* Tumor interferon signaling and suppressive myeloid cells are associated with CAR T-cell failure in large B-cell lymphoma. *Blood* **137**, 2621-2633, doi:10.1182/blood.2020007445 (2021).
- 170 Tumino, N., Weber, G., Besi, F. *et al.* Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells impair the anti-tumor efficacy of GD2.CAR T-cells in patients with neuroblastoma. *J Hematol Oncol* **14**, 191, doi:10.1186/s13045-021-01193-0 (2021).
- 171 Ibrahim, A., Mohamady Farouk Abdalsalam, N., Liang, Z. *et al.* MDSC checkpoint blockade therapy: a new breakthrough point overcoming immunosuppression in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther* **32**, 371-392, doi:10.1038/s41417-025-00886-9 (2025).
- 172 Forner, A., Reig, M. & Bruix, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* **391**, 1301-1314, doi:10.1016/S0140-6736(18)30010-2 (2018).
- 173 Ferlay J, E. M., Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F *Global Cancer Observatory: Cancer Today* (2024), <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/11-liver-and-intrahepatic-bile-ducts-fact-sheet.pdf> [Accessed June 2025].
- 174 European Association for the Study of the, L. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **69**, 182-236, doi:10.1016/j.jhep.2018.03.019 (2018).
- 175 Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). *Las cifras del cáncer en España* (2024), https://seom.org/images/publicaciones/informes-seom-de-evaluacion-de-farmacos/LAS_CIFRAS_2024.pdf [Accessed June 2025].
- 176 Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A. *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **7**, 6, doi:10.1038/s41572-020-00240-3 (2021).
- 177 Wang, J., Chenivresse, X., Henglein, B. & Brechot, C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* **343**, 555-557, doi:10.1038/343555a0 (1990).

- 178 Kew, M. C. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver Int* **23**, 405-409, doi:10.1111/j.1478-3231.2003.00869.x (2003).
- 179 Kanwal, F., Kramer, J., Asch, S. M. *et al.* Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology* **153**, 996-1005 e1001, doi:10.1053/j.gastro.2017.06.012 (2017).
- 180 Garuti, F., Neri, A., Avanzato, F. *et al.* The changing scenario of hepatocellular carcinoma in Italy: an update. *Liver Int* **41**, 585-597, doi:10.1111/liv.14735 (2021).
- 181 Lin, C. W., Lin, C. C., Mo, L. R. *et al.* Heavy alcohol consumption increases the incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-related cirrhosis. *J Hepatol* **58**, 730-735, doi:10.1016/j.jhep.2012.11.045 (2013).
- 182 Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z. & Sanyal, A. J. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* **67**, 123-133, doi:10.1002/hep.29466 (2018).
- 183 Wiemann, S. U., Satyanarayana, A., Tsahuridu, M. *et al.* Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* **16**, 935-942, doi:10.1096/fj.01-0977com (2002).
- 184 Muller, M., Bird, T. G. & Nault, J. C. The landscape of gene mutations in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **72**, 990-1002, doi:10.1016/j.jhep.2020.01.019 (2020).
- 185 Aguilar, F., Harris, C. C., Sun, T., Hollstein, M. & Cerutti, P. Geographic variation of p53 mutational profile in nonmalignant human liver. *Science* **264**, 1317-1319, doi:10.1126/science.8191284 (1994).
- 186 Ningarhari, M., Caruso, S., Hirsch, T. Z. *et al.* Telomere length is key to hepatocellular carcinoma diversity and telomerase addiction is an actionable therapeutic target. *J Hepatol* **74**, 1155-1166, doi:10.1016/j.jhep.2020.11.052 (2021).
- 187 Rialdi, A., Duffy, M., Scopton, A. P. *et al.* WNTinib is a multi-kinase inhibitor with specificity against beta-catenin mutant hepatocellular carcinoma. *Nat Cancer* **4**, 1157-1175, doi:10.1038/s43018-023-00609-9 (2023).
- 188 Zhou, Y., Xu, Q., Tao, L. *et al.* Enhanced SMARCD1, a subunit of the SWI/SNF complex, promotes liver cancer growth through the mTOR pathway. *Clin Sci (Lond)* **134**, 1457-1472, doi:10.1042/CS20200244 (2020).
- 189 Su, P. F., Lee, T. C., Lin, P. J. *et al.* Differential DNA methylation associated with hepatitis B virus infection in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **121**, 1257-1264, doi:10.1002/ijc.22849 (2007).
- 190 Deng, Y. B., Nagae, G., Midorikawa, Y. *et al.* Identification of genes preferentially methylated in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* **101**, 1501-1510, doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01549.x (2010).

- 191 Tumen, D., Heumann, P., Gulow, K. *et al.* Pathogenesis and Current Treatment Strategies of Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines* **10**, doi:10.3390/biomedicines10123202 (2022).
- 192 Tsoaris, A. & Marlar, C. A. *Use Of The Child Pugh Score In Liver Disease*. StatPearls Publishing (2023).
- 193 Kok, B. & Abraldes, J. G. Child-Pugh Classification: Time to Abandon? *Semin Liver Dis* **39**, 96-103, doi:10.1055/s-0038-1676805 (2019).
- 194 Malinchoc, M., Kamath, P. S., Gordon, F. D. *et al.* A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* **31**, 864-871, doi:10.1053/he.2000.5852 (2000).
- 195 Mahul B. Amin, S. B. E., Frederick L. Greene, David R. Byrd, Robert K. Brookland, Mary Kay Washington, Jeffrey E. Gershenwald, Carolyn C. Compton, Kenneth R. Hess, Daniel C. Sullivan, J. Milburn Jessup, James D. Brierley, Lauri E. Gaspar, Richard L. Schilsky, Charles M. Balch, David P. Winchester, Elliot A. Asare, Martin Madera, Donna M. Gress, Laura R. Meyer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th Edition edn, Springer (2017).
- 196 European Association For The Study Of The, L., European Organisation For, R. & Treatment Of, C. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **56**, 908-943, doi:10.1016/j.jhep.2011.12.001 (2012).
- 197 Reig, M., Forner, A., Rimola, J. *et al.* BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol* **76**, 681-693, doi:10.1016/j.jhep.2021.11.018 (2022).
- 198 Chapman, W. C., Klintmalm, G., Hemming, A. *et al.* Surgical treatment of hepatocellular carcinoma in North America: can hepatic resection still be justified? *J Am Coll Surg* **220**, 628-637, doi:10.1016/j.jamcollsurg.2014.12.030 (2015).
- 199 Brown, Z. J., Tsilimigras, D. I., Ruff, S. M. *et al.* Management of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *JAMA Surg* **158**, 410-420, doi:10.1001/jamasurg.2022.7989 (2023).
- 200 Tabrizian, P., Jibara, G., Shrager, B., Schwartz, M. & Roayaie, S. Recurrence of hepatocellular cancer after resection: patterns, treatments, and prognosis. *Ann Surg* **261**, 947-955, doi:10.1097/SLA.0000000000000710 (2015).
- 201 Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R. *et al.* Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* **334**, 693-699, doi:10.1056/NEJM199603143341104 (1996).
- 202 Yao, F. Y., Ferrell, L., Bass, N. M. *et al.* Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* **33**, 1394-1403, doi:10.1053/jhep.2001.24563 (2001).
- 203 Breen, D. J. & Lencioni, R. Image-guided ablation of primary liver and renal tumours. *Nat Rev Clin Oncol* **12**, 175-186, doi:10.1038/nrclinonc.2014.237 (2015).

- 204 Yu, J., Yu, X. L., Han, Z. Y. *et al.* Percutaneous cooled-probe microwave versus radiofrequency ablation in early-stage hepatocellular carcinoma: a phase III randomised controlled trial. *Gut* **66**, 1172-1173, doi:10.1136/gutjnl-2016-312629 (2017).
- 205 Tanaka, T., Takata, K., Miyayama, T. *et al.* Long-term outcome and eligibility of radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma over 3.0 cm in diameter. *Sci Rep* **13**, 16286, doi:10.1038/s41598-023-43516-w (2023).
- 206 Llovet, J. M., De Baere, T., Kulik, L. *et al.* Locoregional therapies in the era of molecular and immune treatments for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **18**, 293-313, doi:10.1038/s41575-020-00395-0 (2021).
- 207 Finn, R. S., Qin, S., Ikeda, M. *et al.* Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* **382**, 1894-1905, doi:10.1056/NEJMoa1915745 (2020).
- 208 Abou-Alfa, G. K., Lau, G., Kudo, M. *et al.* Tremelimumab plus Durvalumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *NEJM Evid* **1**, EVIDoa2100070, doi:10.1056/EVIDoa2100070 (2022).
- 209 Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V. *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **359**, 378-390, doi:10.1056/NEJMoa0708857 (2008).
- 210 Kudo, M., Finn, R. S., Qin, S. *et al.* Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* **391**, 1163-1173, doi:10.1016/S0140-6736(18)30207-1 (2018).
- 211 Gordan, J. D., Kennedy, E. B., Abou-Alfa, G. K. *et al.* Systemic Therapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol* **42**, 1830-1850, doi:10.1200/JCO.23.02745 (2024).
- 212 Gao, X., Huang, H., Wang, Y. *et al.* Tumor Immune Microenvironment Characterization in Hepatocellular Carcinoma Identifies Four Prognostic and Immunotherapeutically Relevant Subclasses. *Front Oncol* **10**, 610513, doi:10.3389/fonc.2020.610513 (2020).
- 213 Affo, S., Yu, L. X. & Schwabe, R. F. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer. *Annu Rev Pathol* **12**, 153-186, doi:10.1146/annurev-pathol-052016-100322 (2017).
- 214 Zhang, J., Gu, C., Song, Q. *et al.* Identifying cancer-associated fibroblasts as emerging targets for hepatocellular carcinoma. *Cell Biosci* **10**, 127, doi:10.1186/s13578-020-00488-y (2020).
- 215 Xu, Y., Zhao, W., Xu, J. *et al.* Activated hepatic stellate cells promote liver cancer by induction of myeloid-derived suppressor cells through cyclooxygenase-2. *Oncotarget* **7**, 8866-8878, doi:10.18632/oncotarget.6839 (2016).
- 216 Zhao, W., Zhang, L., Xu, Y. *et al.* Hepatic stellate cells promote tumor progression by enhancement of immunosuppressive cells in an orthotopic liver tumor mouse model. *Lab Invest* **94**, 182-191, doi:10.1038/labinvest.2013.139 (2014).

- 217 Li, Y., Kim, B. G., Qian, S. *et al.* Hepatic Stellate Cells Inhibit T Cells through Active TGF-beta1 from a Cell Surface-Bound Latent TGF-beta1/GARP Complex. *J Immunol* **195**, 2648-2656, doi:10.4049/jimmunol.1500139 (2015).
- 218 Yan, Y., Zeng, J., Xing, L. & Li, C. Extra- and Intra-Cellular Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation. *Biomedicines* **9**, doi:10.3390/biomedicines9081014 (2021).
- 219 Yang, M. & Zhang, C. The role of liver sinusoidal endothelial cells in cancer liver metastasis. *Am J Cancer Res* **11**, 1845-1860 (2021).
- 220 Baiocchini, A., Del Nonno, F., Taibi, C. *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) modifications in patients with chronic hepatitis C. *Sci Rep* **9**, 8760, doi:10.1038/s41598-019-45114-1 (2019).
- 221 Guizhen, Z., Guanchang, J., Liwen, L. *et al.* The tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma and its targeting strategy by CAR-T cell immunotherapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* **13**, 918869, doi:10.3389/fendo.2022.918869 (2022).
- 222 Sung, P. S. Crosstalk between tumor-associated macrophages and neighboring cells in hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol* **28**, 333-350, doi:10.3350/cmh.2021.0308 (2022).
- 223 Wu, K., Kryczek, I., Chen, L., Zou, W. & Welling, T. H. Kupffer cell suppression of CD8+ T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions. *Cancer Res* **69**, 8067-8075, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0901 (2009).
- 224 Dong, N., Shi, X., Wang, S. *et al.* M2 macrophages mediate sorafenib resistance by secreting HGF in a feed-forward manner in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* **121**, 22-33, doi:10.1038/s41416-019-0482-x (2019).
- 225 Zhang, W., Zhu, X. D., Sun, H. C. *et al.* Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects. *Clin Cancer Res* **16**, 3420-3430, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2904 (2010).
- 226 Yang, L. Y., Luo, Q., Lu, L. *et al.* Increased neutrophil extracellular traps promote metastasis potential of hepatocellular carcinoma via provoking tumorous inflammatory response. *J Hematol Oncol* **13**, 3, doi:10.1186/s13045-019-0836-0 (2020).
- 227 Zhang, Q., He, Y., Luo, N. *et al.* Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cell* **179**, 829-845 e820, doi:10.1016/j.cell.2019.10.003 (2019).
- 228 Wang, T., Dang, N., Tang, G. *et al.* Integrating bulk and single-cell RNA sequencing reveals cellular heterogeneity and immune infiltration in hepatocellular carcinoma. *Mol Oncol* **16**, 2195-2213, doi:10.1002/1878-0261.13190 (2022).
- 229 Nguyen, P. H. D., Wasser, M., Tan, C. T. *et al.* Trajectory of immune evasion and cancer progression in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* **13**, 1441, doi:10.1038/s41467-022-29122-w (2022).

- 230 Zhang, J. P., Yan, J., Xu, J. *et al.* Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* **50**, 980-989, doi:10.1016/j.jhep.2008.12.033 (2009).
- 231 Gao, Q., Qiu, S. J., Fan, J. *et al.* Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* **25**, 2586-2593, doi:10.1200/JCO.2006.09.4565 (2007).
- 232 Du, G., Dou, C., Sun, P. *et al.* Regulatory T cells and immune escape in HCC: understanding the tumor microenvironment and advancing CAR-T cell therapy. *Front Immunol* **15**, 1431211, doi:10.3389/fimmu.2024.1431211 (2024).
- 233 Zhang, S., Liu, Z., Wu, D., Chen, L. & Xie, L. Single-Cell RNA-Seq Analysis Reveals Microenvironmental Infiltration of Plasma Cells and Hepatocytic Prognostic Markers in HCC With Cirrhosis. *Front Oncol* **10**, 596318, doi:10.3389/fonc.2020.596318 (2020).
- 234 Zhang, Z., Ma, L., Goswami, S. *et al.* Landscape of infiltrating B cells and their clinical significance in human hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology* **8**, e1571388, doi:10.1080/2162402X.2019.1571388 (2019).
- 235 Li, Y. M., Liu, Z. Y., Wang, J. C. *et al.* Receptor-Interacting Protein Kinase 3 Deficiency Recruits Myeloid-Derived Suppressor Cells to Hepatocellular Carcinoma Through the Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1-Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 2 Axis. *Hepatology* **70**, 1564-1581, doi:10.1002/hep.30676 (2019).
- 236 He, Q., Huang, W., Liu, D. *et al.* Homeobox B5 promotes metastasis and poor prognosis in Hepatocellular Carcinoma, via FGFR4 and CXCL1 upregulation. *Theranostics* **11**, 5759-5777, doi:10.7150/thno.57659 (2021).
- 237 Chiu, D. K., Tse, A. P., Xu, I. M. *et al.* Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* **8**, 517, doi:10.1038/s41467-017-00530-7 (2017).
- 238 Chiu, D. K., Xu, I. M., Lai, R. K. *et al.* Hypoxia induces myeloid-derived suppressor cell recruitment to hepatocellular carcinoma through chemokine (C-C motif) ligand 26. *Hepatology* **64**, 797-813, doi:10.1002/hep.28655 (2016).
- 239 Hsieh, C. C., Hung, C. H., Chiang, M., Tsai, Y. C. & He, J. T. Hepatic Stellate Cells Enhance Liver Cancer Progression by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells through Interleukin-6 Signaling. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20205079 (2019).
- 240 Xu, Y., Fang, F., Jiao, H. *et al.* Activated hepatic stellate cells regulate MDSC migration through the SDF-1/CXCR4 axis in an orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* **68**, 1959-1969, doi:10.1007/s00262-019-02414-9 (2019).
- 241 Hu, C. E., Gan, J., Zhang, R. D., Cheng, Y. R. & Huang, G. J. Up-regulated myeloid-derived suppressor cell contributes to hepatocellular carcinoma development by impairing dendritic cell function. *Scand J Gastroenterol* **46**, 156-164, doi:10.3109/00365521.2010.516450 (2011).

- 242 Deng, X., Li, X., Guo, X. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells promote tumor growth and sorafenib resistance by inducing FGF1 upregulation and fibrosis. *Neoplasia* **28**, 100788, doi:10.1016/j.neo.2022.100788 (2022).
- 243 Liu, M., Zhou, J., Liu, X. *et al.* Targeting monocyte-intrinsic enhancer reprogramming improves immunotherapy efficacy in hepatocellular carcinoma. *Gut* **69**, 365-379, doi:10.1136/gutjnl-2018-317257 (2020).
- 244 Hoechst, B., Ormandy, L. A., Ballmaier, M. *et al.* A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* **135**, 234-243, doi:10.1053/j.gastro.2008.03.020 (2008).
- 245 Kalathil, S., Lugade, A. A., Miller, A., Iyer, R. & Thanavala, Y. Higher frequencies of GARP(+)CTLA-4(+)Foxp3(+) T regulatory cells and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients are associated with impaired T-cell functionality. *Cancer Res* **73**, 2435-2444, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3381 (2013).
- 246 Shen, P., Wang, A., He, M., Wang, Q. & Zheng, S. Increased circulating Lin(-/low) CD33(+) HLA-DR(-) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatol Res* **44**, 639-650, doi:10.1111/hepr.12167 (2014).
- 247 Zhang, X., Fu, X., Li, T. & Yan, H. The prognostic value of myeloid derived suppressor cell level in hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **14**, e0225327, doi:10.1371/journal.pone.0225327 (2019).
- 248 Boral, B., Balli, H. T., Sozutok, S., Pehlivan, U. A. & Aikimbaev, K. Clinical and prognostic significance of CD14 (+) HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells in patients with hepatocellular carcinoma received transarterial radioembolization with Yttrium-90. *Scand J Immunol* **95**, e13132, doi:10.1111/sji.13132 (2022).
- 249 Liu, H., Ling, C. C., Yeung, W. H. O. *et al.* Monocytic MDSC mobilization promotes tumor recurrence after liver transplantation via CXCL10/TLR4/MMP14 signaling. *Cell Death Dis* **12**, 489, doi:10.1038/s41419-021-03788-4 (2021).
- 250 Zhang, Z., Huang, W., Hu, D. *et al.* E-twenty-six-specific sequence variant 5 (ETV5) facilitates hepatocellular carcinoma progression and metastasis through enhancing polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cell (PMN-MDSC)-mediated immunosuppression. *Gut*, doi:10.1136/gutjnl-2024-333944 (2025).
- 251 He, Q., Liu, M., Huang, W. *et al.* IL-1beta-Induced Elevation of Solute Carrier Family 7 Member 11 Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis Through Up-regulating Programmed Death Ligand 1 and Colony-Stimulating Factor 1. *Hepatology* **74**, 3174-3193, doi:10.1002/hep.32062 (2021).
- 252 Li, B. H., Jiang, W., Zhang, S. *et al.* The spleen contributes to the increase in PMN-MDSCs in orthotopic H22 hepatoma mice. *Mol Immunol* **125**, 95-103, doi:10.1016/j.molimm.2020.07.002 (2020).
- 253 Yue, Y., Ren, Z., Wang, Y. *et al.* Impact of Microparticle Transarterial Chemoembolization (mTACE) on myeloid-derived suppressor cell subtypes in hepatocellular carcinoma: Clinical correlations and therapeutic implications. *Immun Inflamm Dis* **12**, e70007, doi:10.1002/iid3.70007 (2024).

- 254 Kidney Disease: Improving Global Outcomes, C. K. D. W. G. KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int* **105**, S117-S314, doi:10.1016/j.kint.2023.10.018 (2024).
- 255 Kalantar-Zadeh, K., Jafar, T. H., Nitsch, D., Neuen, B. L. & Perkovic, V. Chronic kidney disease. *Lancet* **398**, 786-802, doi:10.1016/S0140-6736(21)00519-5 (2021).
- 256 Chronic, Kidney, Disease & Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **395**, 709-733, doi:10.1016/S0140-6736(20)30045-3 (2020).
- 257 Sociedad Española de Nefrología. *La Enfermedad Renal Crónica en España* (2022), https://www.seden.org/files/courses/Informe_390a.pdf [Accessed June 2025].
- 258 Quiroga, B., Mahillo, B., Mazuecos, A. *et al.* Registro Español de Enfermos Renales (REER): informe del año 2022 y análisis evolutivo. *Nefrología* **45**, 312-328, doi:10.1016/j.nefro.2024.11.003 (2025).
- 259 Chen, T. K., Knicely, D. H. & Grams, M. E. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA* **322**, 1294-1304, doi:10.1001/jama.2019.14745 (2019).
- 260 Chaudhry, D., Chaudhry, A., Peracha, J. & Sharif, A. Survival for waitlisted kidney failure patients receiving transplantation versus remaining on waiting list: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **376**, e068769, doi:10.1136/bmj-2021-068769 (2022).
- 261 Registro Español de Enfermos Renales (REER), Organización Nacional de Trasplante (ONT). *Informe de Diálisis y Trasplante 2019* (2020), <https://www.ont.es/wp-content/uploads/2023/01/MEMORIA-REER-2019.pdf> [Accessed June 2025].
- 262 Registro Español de Diálisis y Trasplante (REDYT). *Informe anual 2022* (2024), https://www.ont.es/wp-content/uploads/2024/11/MEMORIA-REDYT_2022_nov2024.pdf [Accessed June 2025].
- 263 Abramowicz, D., Cochat, P., Claas, F. H. *et al.* European Renal Best Practice Guideline on kidney donor and recipient evaluation and perioperative care. *Nephrol Dial Transplant* **30**, 1790-1797, doi:10.1093/ndt/gfu216 (2015).
- 264 Pérez Tamajon, L. & Hernández Marrero, D. Evaluación del receptor de trasplante renal. *Nefrología al día*, 2659-2606.
- 265 de Groot, I. B., Veen, J. I., van der Boog, P. J. *et al.* Difference in quality of life, fatigue and societal participation between living and deceased donor kidney transplant recipients. *Clin Transplant* **27**, E415-423, doi:10.1111/ctr.12165 (2013).
- 266 Martín, P. & Errasti, P. Trasplante renal. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* **29**, 79-91 (2006).
- 267 Swai, J., Zhao, X., Noube, J. R. & Ming, G. Systematic review and meta-analysis of clinical outcomes comparison between different initial dialysis modalities in end-stage renal disease patients due to lupus nephritis prior to renal transplantation. *BMC Nephrol* **21**, 156, doi:10.1186/s12882-020-01811-y (2020).

- 268 Brook, N. R., White, S. A., Waller, J. R., Veitch, P. S. & Nicholson, M. L. Non-heart beating donor kidneys with delayed graft function have superior graft survival compared with conventional heart-beating donor kidneys that develop delayed graft function. *Am J Transplant* **3**, 614-618, doi:10.1034/j.1600-6143.2003.00113.x (2003).
- 269 Marino, J., Paster, J. & Benichou, G. Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. *Front Immunol* **7**, 582, doi:10.3389/fimmu.2016.00582 (2016).
- 270 Kotsias, F., Cebrian, I. & Alloatti, A. Antigen processing and presentation. *Int Rev Cell Mol Biol* **348**, 69-121, doi:10.1016/bs.ircmb.2019.07.005 (2019).
- 271 Siu, J. H. Y., Surendrakumar, V., Richards, J. A. & Pettigrew, G. J. T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* **9**, 2548, doi:10.3389/fimmu.2018.02548 (2018).
- 272 Herrera, O. B., Golshayan, D., Tibbott, R. *et al.* A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* **173**, 4828-4837, doi:10.4049/jimmunol.173.8.4828 (2004).
- 273 Macedo, C., Tran, L. M., Zahorchak, A. F. *et al.* Donor-derived regulatory dendritic cell infusion results in host cell cross-dressing and T cell subset changes in prospective living donor liver transplant recipients. *Am J Transplant* **21**, 2372-2386, doi:10.1111/ajt.16393 (2021).
- 274 Mastoridis, S., Londono, M. C., Kurt, A. *et al.* Impact of donor extracellular vesicle release on recipient cell "cross-dressing" following clinical liver and kidney transplantation. *Am J Transplant* **21**, 2387-2398, doi:10.1111/ajt.16123 (2021).
- 275 Callemeyn, J., Lamarthee, B., Koenig, A. *et al.* Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney Int* **101**, 692-710, doi:10.1016/j.kint.2021.11.029 (2022).
- 276 Cozzi, E., Colpo, A. & De Silvestro, G. The mechanisms of rejection in solid organ transplantation. *Transfus Apher Sci* **56**, 498-505, doi:10.1016/j.transci.2017.07.005 (2017).
- 277 Martinez, O. M., Ascher, N. L., Ferrell, L. *et al.* Evidence for a nonclassical pathway of graft rejection involving interleukin 5 and eosinophils. *Transplantation* **55**, 909-918, doi:10.1097/00007890-199304000-00041 (1993).
- 278 Louis, K., Macedo, C., Bailly, E. *et al.* Coordinated Circulating T Follicular Helper and Activated B Cell Responses Underlie the Onset of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol* **31**, 2457-2474, doi:10.1681/ASN.2020030320 (2020).
- 279 Cano-Romero, F. L., Laguna Goya, R., Utrero-Rico, A. *et al.* Longitudinal profile of circulating T follicular helper lymphocytes parallels anti-HLA sensitization in renal transplant recipients. *Am J Transplant* **19**, 89-97, doi:10.1111/ajt.14987 (2019).
- 280 Salama, A. D., Najafian, N., Clarkson, M. R., Harmon, W. E. & Sayegh, M. H. Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* **14**, 1643-1651, doi:10.1097/01.asn.0000057540.98231.c1 (2003).

- 281 Moreau, A., Varey, E., Anegon, I. & Cuturi, M. C. Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**, doi:10.1101/cshperspect.a015461 (2013).
- 282 Morita, K., Miura, M., Paolone, D. R. *et al.* Early chemokine cascades in murine cardiac grafts regulate T cell recruitment and progression of acute allograft rejection. *J Immunol* **167**, 2979-2984, doi:10.4049/jimmunol.167.5.2979 (2001).
- 283 Chong, A. S. Mechanisms of organ transplant injury mediated by B cells and antibodies: Implications for antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* **20 Suppl 4**, 23-32, doi:10.1111/ajt.15844 (2020).
- 284 Colvin, R. B. & Smith, R. N. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* **5**, 807-817, doi:10.1038/nri1702 (2005).
- 285 Viglietti, D., Loupy, A., Vernerey, D. *et al.* Value of Donor-Specific Anti-HLA Antibody Monitoring and Characterization for Risk Stratification of Kidney Allograft Loss. *J Am Soc Nephrol* **28**, 702-715, doi:10.1681/ASN.2016030368 (2017).
- 286 Kwun, J., Manook, M., Page, E. *et al.* Crosstalk Between T and B Cells in the Germinal Center After Transplantation. *Transplantation* **101**, 704-712, doi:10.1097/TP.0000000000001588 (2017).
- 287 Alari-Pahissa, E., Federico-Vega, J., Ataya, M. *et al.* Alloreactive adaptive natural killer cells in renal transplantation: potential contribution to allograft microvascular inflammation. *Am J Transplant*, doi:10.1016/j.ajt.2025.04.024 (2025).
- 288 Koenig, A., Chen, C. C., Marcais, A. *et al.* Missing self triggers NK cell-mediated chronic vascular rejection of solid organ transplants. *Nat Commun* **10**, 5350, doi:10.1038/s41467-019-13113-5 (2019).
- 289 Hamada, S., Dubois, V., Koenig, A. & Thauat, O. Allograft recognition by recipient's natural killer cells: Molecular mechanisms and role in transplant rejection. *HLA* **98**, 191-199, doi:10.1111/tan.14332 (2021).
- 290 Laffont, S., Seillet, C., Ortaldo, J., Coudert, J. D. & Guery, J. C. Natural killer cells recruited into lymph nodes inhibit alloreactive T-cell activation through perforin-mediated killing of donor allogeneic dendritic cells. *Blood* **112**, 661-671, doi:10.1182/blood-2007-10-120089 (2008).
- 291 Maroof, A., Beattie, L., Zubairi, S. *et al.* Posttranscriptional regulation of II10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity* **29**, 295-305, doi:10.1016/j.immuni.2008.06.012 (2008).
- 292 Pontrelli, P., Rascio, F., Castellano, G. *et al.* The Role of Natural Killer Cells in the Immune Response in Kidney Transplantation. *Front Immunol* **11**, 1454, doi:10.3389/fimmu.2020.01454 (2020).
- 293 Qu, J., Jin, J., Zhang, M. & Ng, L. G. Neutrophil diversity and plasticity: Implications for organ transplantation. *Cell Mol Immunol* **20**, 993-1001, doi:10.1038/s41423-023-01058-1 (2023).

- 294 Vono, M., Lin, A., Norrby-Teglund, A. *et al.* Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4(+) T cells in vitro and ex vivo. *Blood* **129**, 1991-2001, doi:10.1182/blood-2016-10-744441 (2017).
- 295 Kreisel, D., Sugimoto, S., Zhu, J. *et al.* Emergency granulopoiesis promotes neutrophil-dendritic cell encounters that prevent mouse lung allograft acceptance. *Blood* **118**, 6172-6182, doi:10.1182/blood-2011-04-347823 (2011).
- 296 Wang, J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res* **371**, 531-539, doi:10.1007/s00441-017-2785-7 (2018).
- 297 Ortega-Gomez, A., Perretti, M. & Soehnlein, O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* **5**, 661-674, doi:10.1002/emmm.201202382 (2013).
- 298 Dalli, J. & Serhan, C. N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* **120**, e60-72, doi:10.1182/blood-2012-04-423525 (2012).
- 299 Scozzi, D., Ibrahim, M., Menna, C. *et al.* The Role of Neutrophils in Transplanted Organs. *Am J Transplant* **17**, 328-335, doi:10.1111/ajt.13940 (2017).
- 300 Schietinger, A. & Greenberg, P. D. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol* **35**, 51-60, doi:10.1016/j.it.2013.10.001 (2014).
- 301 Li, H. & Shi, B. Tolerogenic dendritic cells and their applications in transplantation. *Cell Mol Immunol* **12**, 24-30, doi:10.1038/cmi.2014.52 (2015).
- 302 Huang, H., Dawicki, W., Zhang, X., Town, J. & Gordon, J. R. Tolerogenic dendritic cells induce CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cell differentiation from CD4⁺CD25⁻/loFoxp3⁻ effector T cells. *J Immunol* **185**, 5003-5010, doi:10.4049/jimmunol.0903446 (2010).
- 303 Qian, L., Qian, C., Chen, Y. *et al.* Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19^{hi}FcγRIIb^{hi} regulatory B cells through IFN-β and CD40L. *Blood* **120**, 581-591, doi:10.1182/blood-2011-08-377242 (2012).
- 304 Tinckam, K. J., Djurdjev, O. & Magil, A. B. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int* **68**, 1866-1874, doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00606.x (2005).
- 305 Glass, C. K. & Natoli, G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat Immunol* **17**, 26-33, doi:10.1038/ni.3306 (2016).
- 306 Malone, A. F. Monocytes and Macrophages in Kidney Transplantation and Insights from Single Cell RNA-Seq Studies. *Kidney360* **2**, 1654-1659, doi:10.34067/KID.0003842021 (2021).
- 307 Ordikhani, F., Pothula, V., Sanchez-Tarjuelo, R., Jordan, S. & Ochando, J. Macrophages in Organ Transplantation. *Front Immunol* **11**, 582939, doi:10.3389/fimmu.2020.582939 (2020).

- 308 Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* **44**, 450-462, doi:10.1016/j.immuni.2016.02.015 (2016).
- 309 Chadban, S. J., Ahn, C., Axelrod, D. A. *et al.* KDIGO Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Management of Candidates for Kidney Transplantation. *Transplantation* **104**, S11-S103, doi:10.1097/TP.00000000000003136 (2020).
- 310 Bonnefoy-Berard, N., Vincent, C. & Revillard, J. P. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* **51**, 669-673, doi:10.1097/00007890-199103000-00024 (1991).
- 311 Bonnefoy-Berard, N., Verrier, B., Vincent, C. & Revillard, J. P. Inhibition of CD25 (IL-2R alpha) expression and T-cell proliferation by polyclonal anti-thymocyte globulins. *Immunology* **77**, 61-67 (1992).
- 312 Brennan, D. C., Daller, J. A., Lake, K. D. *et al.* Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med* **355**, 1967-1977, doi:10.1056/NEJMoa060068 (2006).
- 313 Vo, A. A., Lukovsky, M., Toyoda, M. *et al.* Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med* **359**, 242-251, doi:10.1056/NEJMoa0707894 (2008).
- 314 Longuet, H., Sautenet, B., Gatault, P. *et al.* Risk factors for impaired CD4+ T-cell reconstitution following rabbit antithymocyte globulin treatment in kidney transplantation. *Transpl Int* **27**, 271-279, doi:10.1111/tri.12249 (2014).
- 315 Tang, Q., Leung, J., Melli, K. *et al.* Altered balance between effector T cells and FOXP3+ HELIOS+ regulatory T cells after thymoglobulin induction in kidney transplant recipients. *Transpl Int* **25**, 1257-1267, doi:10.1111/j.1432-2277.2012.01565.x (2012).
- 316 Nelson, J., Alvey, N., Bowman, L. *et al.* Consensus recommendations for use of maintenance immunosuppression in solid organ transplantation: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy, American Society of Transplantation, and International Society for Heart and Lung Transplantation: An executive summary. *Pharmacotherapy* **42**, 594-598, doi:10.1002/phar.2718 (2022).
- 317 Starzl, T. E., Todo, S., Fung, J. *et al.* FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet* **2**, 1000-1004, doi:10.1016/s0140-6736(89)91014-3 (1989).
- 318 Mayer, A. D., Dmitrewski, J., Squifflet, J. P. *et al.* Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation* **64**, 436-443, doi:10.1097/00007890-199708150-00012 (1997).
- 319 Webster, A. C., Woodroffe, R. C., Taylor, R. S., Chapman, J. R. & Craig, J. C. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ* **331**, 810, doi:10.1136/bmj.38569.471007.AE (2005).
- 320 Naesens, M., Kuypers, D. R. & Sarwal, M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**, 481-508, doi:10.2215/CJN.04800908 (2009).

- 321 Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *Lancet* **345**, 1321-1325 (1995).
- 322 Wagner, M., Earley, A. K., Webster, A. C. *et al.* Mycophenolic acid versus azathioprine as primary immunosuppression for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* **2015**, CD007746, doi:10.1002/14651858.CD007746.pub2 (2015).
- 323 Kim, D., Nguyen, Q. T., Lee, J. *et al.* Anti-inflammatory Roles of Glucocorticoids Are Mediated by Foxp3(+) Regulatory T Cells via a miR-342-Dependent Mechanism. *Immunity* **53**, 581-596 e585, doi:10.1016/j.immuni.2020.07.002 (2020).
- 324 Woodle, E. S., Gill, J. S., Clark, S. *et al.* Early Corticosteroid Cessation vs Long-term Corticosteroid Therapy in Kidney Transplant Recipients: Long-term Outcomes of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Surg* **156**, 307-314, doi:10.1001/jamasurg.2020.6929 (2021).
- 325 Lim, W. H., Eris, J., Kanellis, J. *et al.* A systematic review of conversion from calcineurin inhibitor to mammalian target of rapamycin inhibitors for maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* **14**, 2106-2119, doi:10.1111/ajt.12795 (2014).
- 326 Meneghini, M., Bestard, O. & Grinyo, J. M. Immunosuppressive drugs modes of action. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **54-55**, 101757, doi:10.1016/j.bpg.2021.101757 (2021).
- 327 Hart, A., Lentine, K. L., Smith, J. M. *et al.* OPTN/SRTR 2019 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant* **21 Suppl 2**, 21-137, doi:10.1111/ajt.16502 (2021).
- 328 Naesens, M., Roufosse, C., Haas, M. *et al.* The Banff 2022 Kidney Meeting Report: Reappraisal of microvascular inflammation and the role of biopsy-based transcript diagnostics. *Am J Transplant* **24**, 338-349, doi:10.1016/j.ajt.2023.10.016 (2024).
- 329 Gray, D., Shepherd, H., Daar, A., Oliver, D. O. & Morris, P. J. Oral versus intravenous high-dose steroid treatment of renal allograft rejection. The big shot or not? *Lancet* **1**, 117-118, doi:10.1016/s0140-6736(78)90417-8 (1978).
- 330 Webster, A. C., Wu, S., Tallapragada, K. *et al.* Polyclonal and monoclonal antibodies for treating acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* **7**, CD004756, doi:10.1002/14651858.CD004756.pub4 (2017).
- 331 Fan, J., Tryphonopoulos, P., Tekin, A. *et al.* Eculizumab Salvage Therapy for Antibody-Mediated Rejection in a Desensitization-Resistant Intestinal Re-Transplant Patient. *Am J Transplant* **15**, 1995-2000, doi:10.1111/ajt.13183 (2015).
- 332 Lefaucheur, C., Nochy, D., Andrade, J. *et al.* Comparison of combination Plasmapheresis/IVIg/anti-CD20 versus high-dose IVIg in the treatment of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* **9**, 1099-1107, doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02591.x (2009).

- 333 Sellares, J., de Freitas, D. G., Mengel, M. *et al.* Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* **12**, 388-399, doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03840.x (2012).
- 334 Parajuli, S., Mandelbrot, D. A., Muth, B. *et al.* Rituximab and Monitoring Strategies for Late Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Transplant Direct* **3**, e227, doi:10.1097/TXD.0000000000000746 (2017).
- 335 Choi, J., Aubert, O., Vo, A. *et al.* Assessment of Tocilizumab (Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal) as a Potential Treatment for Chronic Antibody-Mediated Rejection and Transplant Glomerulopathy in HLA-Sensitized Renal Allograft Recipients. *Am J Transplant* **17**, 2381-2389, doi:10.1111/ajt.14228 (2017).
- 336 Mayer, K. A., Schrezenmeier, E., Diebold, M. *et al.* A Randomized Phase 2 Trial of Felzartamab in Antibody-Mediated Rejection. *N Engl J Med* **391**, 122-132, doi:10.1056/NEJMoa2400763 (2024).
- 337 Vo, A., Ammerman, N. & Jordan, S. C. New Therapies for Highly Sensitized Patients on the Waiting List. *Kidney360* **5**, 1207-1225, doi:10.34067/KID.0000000000000509 (2024).
- 338 Birdwell, K. A. & Park, M. Post-Transplant Cardiovascular Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **16**, 1878-1889, doi:10.2215/CJN.00520121 (2021).
- 339 Fishman, J. A. Infection in Organ Transplantation. *Am J Transplant* **17**, 856-879, doi:10.1111/ajt.14208 (2017).
- 340 Issa, N. C. & Fishman, J. A. Infectious complications of antilymphocyte therapies in solid organ transplantation. *Clin Infect Dis* **48**, 772-786, doi:10.1086/597089 (2009).
- 341 Martin-Gandul, C., Mueller, N. J., Pascual, M. & Manuel, O. The Impact of Infection on Chronic Allograft Dysfunction and Allograft Survival After Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant* **15**, 3024-3040, doi:10.1111/ajt.13486 (2015).
- 342 Au, E., Wong, G. & Chapman, J. R. Cancer in kidney transplant recipients. *Nat Rev Nephrol* **14**, 508-520, doi:10.1038/s41581-018-0022-6 (2018).
- 343 Fuhrmann, J. D., Valkova, K., von Moos, S. *et al.* Cancer among kidney transplant recipients >20 years after transplantation: post-transplant lymphoproliferative disorder remains the most common cancer type in the ultra long-term. *Clin Kidney J* **15**, 1152-1159, doi:10.1093/ckj/sfac013 (2022).
- 344 Tessari, G., Naldi, L., Boschiero, L. *et al.* Incidence of primary and second cancers in renal transplant recipients: a multicenter cohort study. *Am J Transplant* **13**, 214-221, doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04294.x (2013).
- 345 Krynitz, B., Edgren, G., Lindelof, B. *et al.* Risk of skin cancer and other malignancies in kidney, liver, heart and lung transplant recipients 1970 to 2008--a Swedish population-based study. *Int J Cancer* **132**, 1429-1438, doi:10.1002/ijc.27765 (2013).

- 346 Piselli, P., Serraino, D., Segoloni, G. P. *et al.* Risk of de novo cancers after transplantation: results from a cohort of 7217 kidney transplant recipients, Italy 1997-2009. *Eur J Cancer* **49**, 336-344, doi:10.1016/j.ejca.2012.09.013 (2013).
- 347 Cheung, C. Y., Lam, M. F., Chu, K. H. *et al.* Malignancies after kidney transplantation: Hong Kong renal registry. *Am J Transplant* **12**, 3039-3046, doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04209.x (2012).
- 348 Vajdic, C. M., McDonald, S. P., McCredie, M. R. *et al.* Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA* **296**, 2823-2831, doi:10.1001/jama.296.23.2823 (2006).
- 349 Webster, A. C., Craig, J. C., Simpson, J. M., Jones, M. P. & Chapman, J. R. Identifying high risk groups and quantifying absolute risk of cancer after kidney transplantation: a cohort study of 15,183 recipients. *Am J Transplant* **7**, 2140-2151, doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01908.x (2007).
- 350 Kasiske, B. L., Snyder, J. J., Gilbertson, D. T. & Wang, C. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* **4**, 905-913, doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00450.x (2004).
- 351 Park, C. K., Fung, K., Austin, P. C. *et al.* Incidence and Risk Factors of Keratinocyte Carcinoma After First Solid Organ Transplant in Ontario, Canada. *JAMA Dermatol* **155**, 1041-1048, doi:10.1001/jamadermatol.2019.0692 (2019).
- 352 Collett, D., Mumford, L., Banner, N. R., Neuberger, J. & Watson, C. Comparison of the incidence of malignancy in recipients of different types of organ: a UK Registry audit. *Am J Transplant* **10**, 1889-1896, doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03181.x (2010).
- 353 Yu, T. M., Chuang, Y. W., Yu, M. C. *et al.* Risk of cancer in patients with polycystic kidney disease: a propensity-score matched analysis of a nationwide, population-based cohort study. *Lancet Oncol* **17**, 1419-1425, doi:10.1016/S1470-2045(16)30250-9 (2016).
- 354 Wong, G., Turner, R. M., Chapman, J. R. *et al.* Time on dialysis and cancer risk after kidney transplantation. *Transplantation* **95**, 114-121, doi:10.1097/TP.0b013e31827743b4 (2013).
- 355 Urban, K., Mehrmal, S., Uppal, P., Giesey, R. L. & Delost, G. R. The global burden of skin cancer: A longitudinal analysis from the Global Burden of Disease Study, 1990-2017. *JAAD Int* **2**, 98-108, doi:10.1016/j.jdin.2020.10.013 (2021).
- 356 Opelz, G. & Dohler, B. Influence of Current and Previous Smoking on Cancer and Mortality After Kidney Transplantation. *Transplantation* **100**, 227-232, doi:10.1097/TP.0000000000000804 (2016).
- 357 Hussain, S. K., Makgoeng, S. B., Everly, M. J. *et al.* HLA and Risk of Diffuse Large B cell Lymphoma After Solid Organ Transplantation. *Transplantation* **100**, 2453-2460, doi:10.1097/TP.0000000000001025 (2016).
- 358 Ma, M. K., Lim, W. H., Turner, R. M. *et al.* The risk of cancer in recipients of living-donor, standard and expanded criteria deceased donor kidney transplants: a registry analysis. *Transplantation* **98**, 1286-1293, doi:10.1097/TP.0000000000000375 (2014).

- 359 Hellemans, R., Pengel, L. H. M., Choquet, S., Maggiore, U. & for, E. W. o. t. T. L. J. p. Managing immunosuppressive therapy in potentially cured post-kidney transplant cancer (excluding non-melanoma skin cancer): an overview of the available evidence and guidance for shared decision-making. *Transpl Int* **34**, 1789-1800, doi:10.1111/tri.13952 (2021).
- 360 Yanik, E. L., Clarke, C. A., Snyder, J. J., Pfeiffer, R. M. & Engels, E. A. Variation in Cancer Incidence among Patients with ESRD during Kidney Function and Nonfunction Intervals. *J Am Soc Nephrol* **27**, 1495-1504, doi:10.1681/ASN.2015040373 (2016).
- 361 van Leeuwen, M. T., Webster, A. C., McCredie, M. R. *et al.* Effect of reduced immunosuppression after kidney transplant failure on risk of cancer: population based retrospective cohort study. *BMJ* **340**, c570, doi:10.1136/bmj.c570 (2010).
- 362 Lim, W. H., Turner, R. M., Chapman, J. R. *et al.* Acute rejection, T-cell-depleting antibodies, and cancer after transplantation. *Transplantation* **97**, 817-825, doi:10.1097/01.TP.0000442773.38510.32 (2014).
- 363 Opelz, G., Naujokat, C., Daniel, V., Terness, P. & Dohler, B. Disassociation between risk of graft loss and risk of non-Hodgkin lymphoma with induction agents in renal transplant recipients. *Transplantation* **81**, 1227-1233, doi:10.1097/01.tp.0000219817.18049.36 (2006).
- 364 Lim, W., Chadban, S., Campbell, S. *et al.* Effect of interleukin-2 receptor antibody therapy on acute rejection risk and severity, long-term renal function, infection and malignancy-related mortality in renal transplant recipients. *Transpl Int* **23**, 1207-1215, doi:10.1111/j.1432-2277.2010.01124.x (2010).
- 365 Dantal, J., Morelon, E., Rostaing, L. *et al.* Sirolimus for Secondary Prevention of Skin Cancer in Kidney Transplant Recipients: 5-Year Results. *J Clin Oncol* **36**, 2612-2620, doi:10.1200/JCO.2017.76.6691 (2018).
- 366 Knoll, G. A., Kokolo, M. B., Mallick, R. *et al.* Effect of sirolimus on malignancy and survival after kidney transplantation: systematic review and meta-analysis of individual patient data. *BMJ* **349**, g6679, doi:10.1136/bmj.g6679 (2014).
- 367 Garcia, M. R., Ledgerwood, L., Yang, Y. *et al.* Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest* **120**, 2486-2496, doi:10.1172/JCI41628 (2010).
- 368 De Wilde, V., Van Rompaey, N., Hill, M. *et al.* Endotoxin-induced myeloid-derived suppressor cells inhibit alloimmune responses via heme oxygenase-1. *Am J Transplant* **9**, 2034-2047, doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02757.x (2009).
- 369 Zhang, W., Liang, S., Wu, J. & Horuzsko, A. Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11b+Gr1+ myeloid-derived suppressor cells that promote long-term survival of allografts. *Transplantation* **86**, 1125-1134, doi:10.1097/TP.0b013e318186fced (2008).
- 370 Lee, H. J., Park, S. Y., Jeong, H. J. *et al.* Glucocorticoids induce corneal allograft tolerance through expansion of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Am J Transplant* **18**, 3029-3037, doi:10.1111/ajt.15026 (2018).

- 371 He, Y., Bei, J., Zeng, H. & Pan, Z. The roles of sepsis-induced myeloid derived suppressor cells in mice corneal, skin and combined transplantation. *Transpl Immunol* **34**, 8-13, doi:10.1016/j.trim.2015.12.003 (2016).
- 372 Marigo, I., Bosio, E., Solito, S. *et al.* Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* **32**, 790-802, doi:10.1016/j.immuni.2010.05.010 (2010).
- 373 Dugast, A. S., Haudebourg, T., Coulon, F. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* **180**, 7898-7906, doi:10.4049/jimmunol.180.12.7898 (2008).
- 374 Dilek, N., Poirier, N., Usal, C. *et al.* Control of transplant tolerance and intragraft regulatory T cell localization by myeloid-derived suppressor cells and CCL5. *J Immunol* **188**, 4209-4216, doi:10.4049/jimmunol.1101512 (2012).
- 375 Wu, T., Sun, C., Chen, Z. *et al.* Smad3-deficient CD11b(+)Gr1(+) myeloid-derived suppressor cells prevent allograft rejection via the nitric oxide pathway. *J Immunol* **189**, 4989-5000, doi:10.4049/jimmunol.1200068 (2012).
- 376 Liao, J., Wang, X., Bi, Y. *et al.* Dexamethasone potentiates myeloid-derived suppressor cell function in prolonging allograft survival through nitric oxide. *J Leukoc Biol* **96**, 675-684, doi:10.1189/jlb.2HI1113-611RR (2014).
- 377 Hock, B. D., McKenzie, J. L., Cross, N. B. & Currie, M. J. Dynamic changes in myeloid derived suppressor cell subsets following renal transplant: A prospective study. *Transpl Immunol* **32**, 164-171, doi:10.1016/j.trim.2015.05.001 (2015).
- 378 Hock, B. D., Mackenzie, K. A., Cross, N. B. *et al.* Renal transplant recipients have elevated frequencies of circulating myeloid-derived suppressor cells. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 402-410, doi:10.1093/ndt/gfr264 (2012).
- 379 Luan, Y., Mosheir, E., Menon, M. C. *et al.* Monocytic myeloid-derived suppressor cells accumulate in renal transplant patients and mediate CD4(+) Foxp3(+) Treg expansion. *Am J Transplant* **13**, 3123-3131, doi:10.1111/ajt.12461 (2013).
- 380 Meng, F., Chen, S., Guo, X. *et al.* Clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human renal transplantation with acute T cell-mediated rejection. *Inflammation* **37**, 1799-1805, doi:10.1007/s10753-014-9910-5 (2014).
- 381 Du, X. X., Guo, Y. L., Zhao, Y. P. *et al.* Accumulation of High Levels of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Enhances Graft Survival in Almost-Tolerant Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc* **50**, 3314-3320, doi:10.1016/j.transproceed.2018.04.043 (2018).
- 382 Okano, S., Abu-Elmagd, K., Kish, D. D. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells increase and inhibit donor-reactive T cell responses to graft intestinal epithelium in intestinal transplant patients. *Am J Transplant* **18**, 2544-2558, doi:10.1111/ajt.14718 (2018).
- 383 Iglesias-Escudero, M., Segundo, D. S., Merino-Fernandez, D. *et al.* Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Increased in Lung Transplant Recipients and Regulated by

- Immunosuppressive Therapy. *Front Immunol* **12**, 788851, doi:10.3389/fimmu.2021.788851 (2021).
- 384 Zhou, L. X., Jiang, Y. Z., Li, X. Q. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells-induced exhaustion of CD8⁺ T-cell participates in rejection after liver transplantation. *Cell Death Dis* **15**, 507, doi:10.1038/s41419-024-06834-z (2024).
- 385 Iglesias-Escudero, M., Sansegundo-Arribas, D., Riquelme, P. *et al.* Myeloid-Derived Suppressor Cells in Kidney Transplant Recipients and the Effect of Maintenance Immunotherapy. *Front Immunol* **11**, 643, doi:10.3389/fimmu.2020.00643 (2020).
- 386 Utrero-Rico, A., Laguna-Goya, R., Cano-Romero, F. *et al.* Early Posttransplant Mobilization of Monocytic Myeloid-derived Suppressor Cell Correlates With Increase in Soluble Immunosuppressive Factors and Predicts Cancer in Kidney Recipients. *Transplantation* **104**, 2599-2608, doi:10.1097/TP.0000000000003179 (2020).
- 387 Bottomley, M. J., Harden, P. N., Wood, K. J., Hester, J. & Issa, F. Dampened Inflammatory Signalling and Myeloid-Derived Suppressor-Like Cell Accumulation Reduces Circulating Monocytic HLA-DR Density and May Associate With Malignancy Risk in Long-Term Renal Transplant Recipients. *Front Immunol* **13**, 901273, doi:10.3389/fimmu.2022.901273 (2022).
- 388 Rickert, M., Wang, X., Boulanger, M. J., Goriatcheva, N. & Garcia, K. C. The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science* **308**, 1477-1480, doi:10.1126/science.1109745 (2005).
- 389 Friedmann, M. C., Migone, T. S., Russell, S. M. & Leonard, W. J. Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2077-2082, doi:10.1073/pnas.93.5.2077 (1996).
- 390 Gu, H., Maeda, H., Moon, J. J. *et al.* New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell Biol* **20**, 7109-7120, doi:10.1128/MCB.20.19.7109-7120.2000 (2000).
- 391 Turner, B., Rapp, U., App, H. *et al.* Interleukin 2 induces tyrosine phosphorylation and activation of p72-74 Raf-1 kinase in a T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1227-1231, doi:10.1073/pnas.88.4.1227 (1991).
- 392 Amlot, P. L., Rawlings, E., Fernando, O. N. *et al.* Prolonged action of a chimeric interleukin-2 receptor (CD25) monoclonal antibody used in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* **60**, 748-756, doi:10.1097/00007890-199510150-00023 (1995).
- 393 McKeage, K. & McCormack, P. L. Basiliximab: a review of its use as induction therapy in renal transplantation. *BioDrugs* **24**, 55-76, doi:10.2165/11203990-000000000-00000 (2010).
- 394 © Novartis. Simulect® (basiliximab) (2020), https://www.novartis.com/us-en/sites/novartis_us/files/simulect.pdf [Accessed June 2025].

- 395 Kahan, B. D., Rajagopalan, P. R. & Hall, M. Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody. United States Simulect Renal Study Group. *Transplantation* **67**, 276-284, doi:10.1097/00007890-199901270-00016 (1999).
- 396 Irani, V., Guy, A. J., Andrew, D. *et al.* Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Mol Immunol* **67**, 171-182, doi:10.1016/j.molimm.2015.03.255 (2015).
- 397 Kmiecik, M., Gowda, M., Graham, L. *et al.* Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function. *J Transl Med* **7**, 89, doi:10.1186/1479-5876-7-89 (2009).
- 398 Kim, H. P., Imbert, J. & Leonard, W. J. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 349-366, doi:10.1016/j.cytogfr.2006.07.003 (2006).
- 399 Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A. *et al.* Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* **3**, 521-530, doi:10.1016/1074-7613(95)90180-9 (1995).
- 400 Stauber, D. J., Debler, E. W., Horton, P. A., Smith, K. A. & Wilson, I. A. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2788-2793, doi:10.1073/pnas.0511161103 (2006).
- 401 Ross, S. H. & Cantrell, D. A. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **36**, 411-433, doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053352 (2018).
- 402 Scheibenbogen, C., Keilholz, U., Richter, M., Andreesen, R. & Hunstein, W. The interleukin-2 receptor in human monocytes and macrophages: regulation of expression and release of the alpha and beta chains (p55 and p75). *Res Immunol* **143**, 33-37, doi:10.1016/0923-2494(92)80077-x (1992).
- 403 Leonard, W. J., Lin, J. X. & O'Shea, J. J. The gamma(c) Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications. *Immunity* **50**, 832-850, doi:10.1016/j.immuni.2019.03.028 (2019).
- 404 Leonard, W. J. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* **1**, 200-208, doi:10.1038/35105066 (2001).
- 405 Pelaez-Prestel, H. F., Gonzalez-Martin, F., Ras-Carmona, A. *et al.* Oral squamous cell carcinomas drive monocytes into immunosuppressive CD25(+)CD163(+)CD206(+) macrophages. *Oral Oncol* **159**, 107078, doi:10.1016/j.oraloncology.2024.107078 (2024).
- 406 Pan, Z., Bao, L., Lu, X. *et al.* IL2RA(+)VSIG4(+) tumor-associated macrophage is a key subpopulation of the immunosuppressive microenvironment in anaplastic thyroid cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1869**, 166591, doi:10.1016/j.bbadis.2022.166591 (2023).
- 407 Driesen, J., Popov, A. & Schultze, J. L. CD25 as an immune regulatory molecule expressed on myeloid dendritic cells. *Immunobiology* **213**, 849-858, doi:10.1016/j.imbio.2008.07.026 (2008).

- 408 Peng, Y., Tao, Y., Zhang, Y. *et al.* CD25: A potential tumor therapeutic target. *Int J Cancer* **152**, 1290-1303, doi:10.1002/ijc.34281 (2023).
- 409 Finkelstein, S. E., Carey, T., Fricke, I. *et al.* Changes in dendritic cell phenotype after a new high-dose weekly schedule of interleukin-2 therapy for kidney cancer and melanoma. *J Immunother* **33**, 817-827, doi:10.1097/CJI.0b013e3181eccad (2010).
- 410 Okawaki, M., Yamaguchi, Y., Okita, R., Ohara, M. & Okada, M. Dose-finding study of anti-CD25 antibody for targeting regulatory T cells in locoregional immunotherapy of malignant effusion. *Hiroshima J Med Sci* **57**, 37-46 (2008).
- 411 Okita, R., Yamaguchi, Y., Ohara, M. *et al.* Targeting of CD4+CD25high cells while preserving CD4+CD25low cells with low-dose chimeric anti-CD25 antibody in adoptive immunotherapy of cancer. *Int J Oncol* **34**, 563-572 (2009).
- 412 Arihara, F., Mizukoshi, E., Kitahara, M. *et al.* Increase in CD14+HLA-DR⁻/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol Immunother* **62**, 1421-1430, doi:10.1007/s00262-013-1447-1 (2013).
- 413 Bayik, D., Lauko, A. J., Roversi, G. A. *et al.* Hepatobiliary malignancies have distinct peripheral myeloid-derived suppressor cell signatures and tumor myeloid cell profiles. *Sci Rep* **10**, 18848, doi:10.1038/s41598-020-75881-1 (2020).
- 414 Li, T., Zhang, X., Lv, Z., Gao, L. & Yan, H. Increased Expression of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int* **2020**, 6527192, doi:10.1155/2020/6527192 (2020).
- 415 Ren, W., Zhang, X., Li, W. *et al.* Circulating and tumor-infiltrating arginase 1-expressing cells in gastric adenocarcinoma patients were mainly immature and monocytic Myeloid-derived suppressor cells. *Sci Rep* **10**, 8056, doi:10.1038/s41598-020-64841-4 (2020).
- 416 Chen, J., Ye, Y., Liu, P. *et al.* Suppression of T cells by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Hum Immunol* **78**, 113-119, doi:10.1016/j.humimm.2016.12.001 (2017).
- 417 Huang, B., Pan, P. Y., Li, Q. *et al.* Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* **66**, 1123-1131, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1299 (2006).
- 418 Schroder, M., Krottschel, M., Conrad, L. *et al.* Genetic screen in myeloid cells identifies TNF-alpha autocrine secretion as a factor increasing MDSC suppressive activity via Nos2 up-regulation. *Sci Rep* **8**, 13399, doi:10.1038/s41598-018-31674-1 (2018).
- 419 Zhao, X., Rong, L., Zhao, X. *et al.* TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest* **122**, 4094-4104, doi:10.1172/JCI64115 (2012).
- 420 Tcyganov, E. N., Hanabuchi, S., Hashimoto, A. *et al.* Distinct mechanisms govern populations of myeloid-derived suppressor cells in chronic viral infection and cancer. *J Clin Invest* **131**, doi:10.1172/JCI145971 (2021).

- 421 Lin, Y., Yang, X., Liu, W. *et al.* Chemerin has a protective role in hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of IL-6 and GM-CSF and MDSC accumulation. *Oncogene* **36**, 3599-3608, doi:10.1038/onc.2016.516 (2017).
- 422 Tsukamoto, H., Nishikata, R., Senju, S. & Nishimura, Y. Myeloid-derived suppressor cells attenuate TH1 development through IL-6 production to promote tumor progression. *Cancer Immunol Res* **1**, 64-76, doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0030 (2013).
- 423 Cassetta, L., Bruderek, K., Skrzeczynska-Moncznik, J. *et al.* Differential expansion of circulating human MDSC subsets in patients with cancer, infection and inflammation. *J Immunother Cancer* **8**, doi:10.1136/jitc-2020-001223 (2020).
- 424 Yu, J., Wang, Y., Yan, F. *et al.* Noncanonical NF-kappaB activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *J Immunol* **193**, 2574-2586, doi:10.4049/jimmunol.1400833 (2014).
- 425 Lv, J., Zhao, Y., Zong, H. *et al.* Increased Levels of Circulating Monocytic- and Early-Stage Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Acute Myeloid Leukemia. *Clin Lab* **67**, doi:10.7754/Clin.Lab.2020.200719 (2021).
- 426 Okla, K., Czerwonka, A., Wawruszak, A. *et al.* Clinical Relevance and Immunosuppressive Pattern of Circulating and Infiltrating Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) in Epithelial Ovarian Cancer. *Front Immunol* **10**, 691, doi:10.3389/fimmu.2019.00691 (2019).
- 427 Zhou, J., Zhang, M., Ju, X. *et al.* Increased monocytic myeloid-derived suppressor cells in type 2 diabetes correlate with hyperglycemic and was a risk factor of infection and tumor occurrence. *Sci Rep* **14**, 4384, doi:10.1038/s41598-024-54496-w (2024).
- 428 Grohova, A., Danova, K., Adkins, I. *et al.* Myeloid - derived suppressor cells in Type 1 diabetes are an expanded population exhibiting diverse T-cell suppressor mechanisms. *PLoS One* **15**, e0242092, doi:10.1371/journal.pone.0242092 (2020).
- 429 Pal, S., Nandi, M., Dey, D. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells induce regulatory T cells in chronically HBV infected patients with high levels of hepatitis B surface antigen and persist after antiviral therapy. *Aliment Pharmacol Ther* **49**, 1346-1359, doi:10.1111/apt.15226 (2019).
- 430 Tacke, R. S., Lee, H. C., Goh, C. *et al.* Myeloid suppressor cells induced by hepatitis C virus suppress T-cell responses through the production of reactive oxygen species. *Hepatology* **55**, 343-353, doi:10.1002/hep.24700 (2012).
- 431 Cai, J., Cui, Y., Yang, J. & Wang, S. Epithelial-mesenchymal transition: When tumor cells meet myeloid-derived suppressor cells. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1876**, 188564, doi:10.1016/j.bbcan.2021.188564 (2021).
- 432 Prieto, J., Melero, I. & Sangro, B. Immunological landscape and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 681-700, doi:10.1038/nrgastro.2015.173 (2015).

- 433 Veglia, F., Sanseviero, E. & Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol* **21**, 485-498, doi:10.1038/s41577-020-00490-y (2021).
- 434 Kreger, J., Roussos Torres, E. T. & MacLean, A. L. Myeloid-Derived Suppressor-Cell Dynamics Control Outcomes in the Metastatic Niche. *Cancer Immunol Res* **11**, 614-628, doi:10.1158/2326-6066.CIR-22-0617 (2023).
- 435 Yang, Z., Guo, J., Weng, L. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells-new and exciting players in lung cancer. *J Hematol Oncol* **13**, 10, doi:10.1186/s13045-020-0843-1 (2020).
- 436 Icahn School of Medicine at Mount Sinai. *Neoadjuvant Nivolumab with CCR2/5-inhibitor or Anti-IL-8) for Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) or Hepatocellular Carcinoma (HCC) [NCT04123379]* (10/10/2019 -), <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04123379?term=NCT04123379&rank=1&tab=table> [Accessed June 2025].
- 437 MedImmune LLC. *MEDI9447 Alone and in Combination With MEDI4736 in Adult Participants With Select Advanced Solid Tumors [NCT02503774]* (21/07/2015 - 11/07/2023), <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02503774?term=NCT02503774&limit=10&sort=@relevance&rank=1> [Accessed June 2025].
- 438 AstraZeneca. *Study to Assess MEDI4736 With Either AZD9150 or AZD5069 in Advanced Solid Tumors & Relapsed Metastatic Squamous Cell Carcinoma of Head & Neck* (16/07/2015 -), <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02499328?term=NCT02499328&limit=10&sort=@relevance&rank=1> [Accessed June 2025].
- 439 Five Prime Therapeutics, Inc. *Study of Cabiralizumab in Combination With Nivolumab in Patients With Selected Advanced Cancers (FPA008-003) [NCT02526017]* (18/08/2015 - 09/03/2022), <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02526017?term=NCT02526017&limit=10&sort=@relevance&rank=1> [Accessed June 2025].
- 440 Beijing YouAn Hospital. *Study of Adoptive Transfer of iNKT Cells Combined With TAE/TACE to Treat Unresectable HCC [NCT04011033]* (08/07/2019 - 08/10/2024), <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04011033?term=NCT04011033&limit=10&sort=@relevance&rank=1> [Accessed June 2025].
- 441 Fundacion Clinic per a la Recerca Biomédica. *Regorafenib Followed by Nivolumab in Patients With Hepatocellular Carcinoma (GOING) (GOING) [NCT04170556]* (20/11/2019 - 03/09/2024), <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04170556?term=NCT04170556&limit=10&sort=@relevance&rank=1> [Accessed June 2025].
- 442 Excell, L., Wride, P. & Russ, G. Cancer Report, ANZDATA Registry Report 2004. 100-106 (2004).
- 443 Zhang, J., Ma, L., Xie, Z. *et al.* Epidemiology of post-transplant malignancy in Chinese renal transplant recipients: a single-center experience and literature review. *Med Oncol* **31**, 32, doi:10.1007/s12032-014-0032-6 (2014).

- 444 Shiels, M. S., Copeland, G., Goodman, M. T. *et al.* Cancer stage at diagnosis in patients infected with the human immunodeficiency virus and transplant recipients. *Cancer* **121**, 2063-2071, doi:10.1002/cncr.29324 (2015).
- 445 Villeneuve, P. J., Schaubel, D. E., Fenton, S. S. *et al.* Cancer incidence among Canadian kidney transplant recipients. *Am J Transplant* **7**, 941-948, doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01736.x (2007).
- 446 Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Fraumeni, J. F., Jr. *et al.* Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA* **306**, 1891-1901, doi:10.1001/jama.2011.1592 (2011).
- 447 Li, W. H., Chen, Y. J., Tseng, W. C. *et al.* Malignancies after renal transplantation in Taiwan: a nationwide population-based study. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 833-839, doi:10.1093/ndt/gfr277 (2012).
- 448 Laconi, E., Marongiu, F. & DeGregori, J. Cancer as a disease of old age: changing mutational and microenvironmental landscapes. *Br J Cancer* **122**, 943-952, doi:10.1038/s41416-019-0721-1 (2020).
- 449 Orskov, B., Sorensen, V. R., Feldt-Rasmussen, B. & Strandgaard, S. Changes in causes of death and risk of cancer in Danish patients with autosomal dominant polycystic kidney disease and end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 1607-1613, doi:10.1093/ndt/gfr467 (2012).
- 450 Wetmore, J. B., Calvet, J. P., Yu, A. S. *et al.* Polycystic kidney disease and cancer after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* **25**, 2335-2341, doi:10.1681/ASN.2013101122 (2014).
- 451 Bustami, R. T., Ojo, A. O., Wolfe, R. A. *et al.* Immunosuppression and the risk of post-transplant malignancy among cadaveric first kidney transplant recipients. *Am J Transplant* **4**, 87-93, doi:10.1046/j.1600-6135.2003.00274.x (2004).
- 452 Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work, G. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* **9 Suppl 3**, S1-155, doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02834.x (2009).
- 453 Peraldi, M. N., Berrou, J., Venot, M. *et al.* Natural Killer Lymphocytes Are Dysfunctional in Kidney Transplant Recipients on Diagnosis of Cancer. *Transplantation* **99**, 2422-2430, doi:10.1097/tp.0000000000000792 (2015).
- 454 Euvrard, S., Morelon, E., Rostaing, L. *et al.* Sirolimus and secondary skin-cancer prevention in kidney transplantation. *N Engl J Med* **367**, 329-339, doi:10.1056/NEJMoa1204166 (2012).
- 455 Campbell, S. B., Walker, R., Tai, S. S., Jiang, Q. & Russ, G. R. Randomized controlled trial of sirolimus for renal transplant recipients at high risk for nonmelanoma skin cancer. *Am J Transplant* **12**, 1146-1156, doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04004.x (2012).
- 456 Yanik, E. L., Siddiqui, K. & Engels, E. A. Sirolimus effects on cancer incidence after kidney transplantation: a meta-analysis. *Cancer Med* **4**, 1448-1459, doi:10.1002/cam4.487 (2015).

- 457 Yan, H. H., Pickup, M., Pang, Y. *et al.* Gr-1+CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung. *Cancer Res* **70**, 6139-6149, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0706 (2010).
- 458 Bottomley, M. J., Thomson, J., Harwood, C. & Leigh, I. The Role of the Immune System in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20082009 (2019).
- 459 Jiang, W., Hu, K., Liu, X., Gao, J. & Zhu, L. Single-cell transcriptome analysis reveals the clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* **29**, 1611210, doi:10.3389/pore.2023.1611210 (2023).
- 460 Chen, W. C., Lai, C. H., Chuang, H. C., Lin, P. Y. & Chen, M. F. Inflammation-induced myeloid-derived suppressor cells associated with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* **39**, 347-355, doi:10.1002/hed.24595 (2017).
- 461 Fernandez-Ruiz, M., Lopez-Medrano, F., Allende, L. M. *et al.* Assessing the risk of de novo malignancy in kidney transplant recipients: role for monitoring of peripheral blood lymphocyte populations. *Transplantation* **98**, e36-37, doi:10.1097/TP.0000000000000297 (2014).
- 462 Hope, C. M., Troelnikov, A., Hanf, W. *et al.* Peripheral natural killer cell and allostimulated T-cell function in kidney transplant recipients associate with cancer risk and immunosuppression-related complications. *Kidney Int* **88**, 1374-1382, doi:10.1038/ki.2015.237 (2015).
- 463 Carroll, R. P., Segundo, D. S., Hollowood, K. *et al.* Immune phenotype predicts risk for posttransplantation squamous cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* **21**, 713-722, doi:10.1681/ASN.2009060669 (2010).
- 464 Hope, C. M., Grace, B. S., Pilkington, K. R. *et al.* The immune phenotype may relate to cancer development in kidney transplant recipients. *Kidney Int* **86**, 175-183, doi:10.1038/ki.2013.538 (2014).
- 465 Wan, S. S., Chadban, S. J., Watson, N. & Wyburn, K. Development and outcomes of de novo donor-specific antibodies in low, moderate, and high immunological risk kidney transplant recipients. *Am J Transplant* **20**, 1351-1364, doi:10.1111/ajt.15754 (2020).
- 466 Kaneku, H., O'Leary, J. G., Banuelos, N. *et al.* De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients. *Am J Transplant* **13**, 1541-1548, doi:10.1002/ajt.12212 (2013).
- 467 Susal, C., Wettstein, D., Dohler, B. *et al.* Association of Kidney Graft Loss With De Novo Produced Donor-Specific and Non-Donor-Specific HLA Antibodies Detected by Single Antigen Testing. *Transplantation* **99**, 1976-1980, doi:10.1097/TP.0000000000000672 (2015).
- 468 Zhu, J., Inomata, T., Fujimoto, K. *et al.* Ex Vivo-Induced Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cells Prevent Corneal Allograft Rejection in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **62**, 3, doi:10.1167/iovs.62.7.3 (2021).

Anexos

RESEARCH ARTICLE

Tumor Immunology and Microenvironment

Delineation of monocytic and early-stage myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of patients with hepatocarcinoma

Marta Chivite-Lacaba¹  | Iago Justo^{1,2} | Alberto Utrero-Rico¹  | Oscar Caso^{1,2} | Cecilia González-Cuadrado¹  | Manuel J. Del Rey^{1,3} | Rocio Laguna-Goya^{1,3,4}  | Javier Arroyo-Ródenas^{1,3} | Ángel Alfocea-Molina^{1,3} | Carlota C. Ruigómez-Martín^{1,3} | Manuel Serrano^{1,3} | Lorena Pascual-Palacios¹ | María Esther Mancebo^{1,3,5}  | Estela Paz-Artal^{1,3,4,6} 

¹Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, Spain

²Department of Surgery and Abdominal Organs Transplantation, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

³Department of Immunology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁶Department of Immunology, Ophthalmology and Nose and Throat (ENT), Medical School, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Correspondence

Estela Paz-Artal, Department of Immunology, Ophthalmology and Nose and Throat (ENT), Medical School, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

Email: estela.paz@salud.madrid.org

Funding information

Private Project, Grant/Award Number: 2023/0089; Fundación Científica Asociación Española Contra el Cáncer, Grant/Award Number: 2017/0068; Ministerio de Ciencia e Innovación, Grant/Award Number: FPU19/06393; Instituto de Salud Carlos III,

Abstract

In patients with hepatocellular carcinoma (HCC), increased myeloid-derived suppressor cells (MDSC) relate to aggressiveness and poor prognosis. Favorable responses with immune checkpoint inhibitors demonstrate that HCC is susceptible to immune activation, suggesting that the elimination of MDSC would provide therapeutic benefits. However, a global analysis of the different MDSC subsets in HCC is still missing. Here we phenotyped circulating myeloid cell subsets (monocytes, M-MDSC, PMN-MDSC and eMDSC) by flow cytometry in HCC and hepatocholangiocarcinoma patients and in healthy donors (HD). Isolated myeloid CD33⁺ cells were analyzed in immunosuppression assays, and cytokines were quantified in the supernatants. Arginase-1 activity (Arg-1) was analyzed in serum samples. All three proportions of MDSC, together with the immunosuppressive Arg-1, were significantly increased in HCC compared with HD. An important proportion of eMDSC expressed CD25, the IL-2 receptor α chain, and CD25⁺ eMDSC were also significantly expanded in HCC patients. HCC-CD33⁺ cells, enriched in M-MDSC and eMDSC, in vitro inhibited both CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation and IL-2 production, and augmented IL-10, IL-6, and TNF- α . The correlation between the inhibition of T lymphocyte proliferation and M-MDSC was the strongest, while eMDSC or CD25⁺ eMDSC did not show anti-proliferative capacity. Despite this functional difference, M-MDSC, CD25⁺ eMDSC, and CD25 expression in eMDSC were more prominent in advanced HCC as defined by a higher number of nodules, TNM stage, and alpha-fetoprotein level. This better

María Esther Mancebo and Estela Paz-Artal share senior authorship.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2025 The Author(s). *International Journal of Cancer* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of UICC.

Grant/Award Numbers: CM22/00093, FI23/00275, PI22/00586

delineation of M-MDSC and eMDSC phenotype and function in HCC could help to design therapies more likely to succeed in clinical trials.

KEYWORDS

hepatocarcinoma, immunosuppression, MDSC, myeloid derived suppressor cells

What's new?

In hepatocellular carcinoma, expanded myeloid-derived suppressor cells (MDSC) relate to aggressiveness and poor prognosis. A global analysis of the different MDSC subsets in hepatocellular carcinoma is, however, missing. In this study, all three subsets of M-MDSC, PMN-MDSC, and eMDSC, together with arginase 1 activity, were significantly increased in hepatocarcinoma. Moreover, eMDSC expressing CD25, the IL2-receptor α chain, were also expanded. HCC-CD33⁺ myeloid cells, enriched in M-MDSC and eMDSC, inhibited T cell proliferation *in vitro*. Expanded M-MDSC, eMDSC, and CD25-expressing eMDSC correlated with advanced HCC. Further insight into the role of MDSC could potentially improve immunotherapies for liver cancer.

1 | INTRODUCTION

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are a heterogeneous and immature cell population that results from a sustained myelopoiesis in chronic inflammation, autoimmunity, and cancer. In the setting of cancer, MDSC increase in peripheral blood and infiltrate the tumor microenvironment. Because of their capacity to suppress the immune response, MDSC contribute to the growth and metastasis of tumoral cells.¹⁻³ Human MDSC express the myeloid lineage markers (CD33 and CD11b) together with low or no expression of HLA-DR. With the aim of gaining consistency in the studies, a group of experts proposed a standardized nomenclature and characterization for MDSC. Together with the definition of the classical polymorphonuclear (PMN-MDSC, CD14⁻ CD11b⁺ CD15⁺ [or CD66b⁺]) and monocytic (M-MDSC, CD11b⁺ CD14⁺ HLA-DR^{-/low} CD15⁻) MDSC, a more immature population referred to as early-stage MDSC (eMDSC, Lin⁻[CD3/14/15/19/56] HLA-DR⁻ CD33⁺) was also identified.⁴

In patients with hepatocellular carcinoma (HCC), MDSC were first described as a CD14⁺ HLA-DR^{-/low} cell population which accumulate in peripheral blood and tumoral microenvironment. CD14⁺ HLA-DR^{-/low} MDSC isolated from the blood of HCC patients were potently suppressive, as shown by their capacity to inhibit autologous T cell proliferation, with production of a high level of arginase-1 (Arg-1), capacity to induce regulatory T cells (Treg)⁵ and to inhibit autologous natural killer (NK) cells cytotoxicity.⁶ The correlation between circulating Treg and MDSC phenotyped as CD33⁺ CD11b⁺ CD14⁻ HLA-DR⁻ cells was later reported in patients with inoperable, advanced HCC who showed an impairment of T-cell-mediated anti-tumor immunity.⁷ In HCC patients without any previous treatment, circulating Lin⁻/low CD33⁺ HLA-DR⁻ MDSC were found elevated and in relationship with more advanced clinical stage, splenomegaly and high expression of the suppressive molecules metalloproteinase

13 (MMP-13), nitric oxide synthetase 2 (NOS-2) and Arg-1.⁸ The relationship between higher frequencies of MDSC and poorer overall survival and recurrence-free survival in HCC was confirmed in a meta-analysis in which the definition of MDSC as CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR^{-/low} or CD14⁺ HLA-DR^{-/low} cells was a criteria for inclusion of works in the analysis.⁹ The review of the literature shows that most of the studies have focused on analyzing the meaning of M-MDSC, thus, a detailed analysis of the different MDSC subsets in HCC is still lacking.

In the last years, immune checkpoint inhibitors have significantly improved results and have been incorporated into the management of HCC, demonstrating that HCC is susceptible to the activation of the immune response.^{10,11} These results further suggest that the elimination of MDSC would potentiate the anti-tumoral immunity in HCC and may provide therapeutic benefit.¹² Therefore, a clear definition of MDSC in patients suffering from liver cancer could help to design therapies more likely to succeed in clinical trials. Here, we accomplish a global analysis of the different circulating MDSC subsets in HCC patients, including the more recently recognized eMDSC.

2 | METHODS

2.1 | Patients and controls

We included 22 liver cancer patients recruited at Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain) before undergoing surgery: 18 for liver transplantation and four for tumoral resection. Among these cohorts, 20 patients had HCC and two patients had hepatocholangiocarcinoma (CCA). Blood samples were collected before the surgery. A group of 17 age- and gender-matched healthy donors (HD) was also recruited for comparison (HCC, median age 63 (IQR: 58-67); HD, median age 57.5 (IQR: 41.5-62), $p > 0.05$). The diagnosis of HCC or CCA was histologically confirmed in all patients.

2.2 | Flow cytometry analysis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density-gradient centrifugation on Lymphoprep (Stemcell). Myeloid cell subsets were evaluated on fresh PBMC after incubating with anti-FcR MoAb, using the following monoclonal antibodies: CD33-PE-Cy7 (eBioscience), CD11b-APC750 (BeckmanCoulter), HLA-DR-APC (BD Bioscience), CD14-FITC (BD Bioscience), CD15-PerCP-Cy5.5 (Miltenyi-Biotec). Expression of alpha IL-2 receptor (IL-2R α) chain was evaluated on fresh PBMC using CD25-PE (BD Bioscience). Labeled PBMC were acquired with FACSCanto II (BD Bioscience) and analyzed by FlowJo V10 software (Tree Star).

2.3 | Cell isolation and in vitro immunosuppression assay

CD33⁻ and CD33⁺ cells were isolated using CD33 microbeads (Miltenyi-Biotec) according to manufacturer instructions. After separation, the purity of the CD33⁺ fraction was determined by flow cytometry using CD33-PE-Cy7 monoclonal antibody. For all experiments, the purity of both fractions was >90%. The number of plated CD33⁻ cells in each experiment was adjusted according to the CD3⁺ T cell percentage (which ranged from 76% to 84%).

Immunosuppression assay was performed by labeling CD33⁻ cells with 2.5 μ M of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). The CFSE-labeled CD33⁻ cells were plated in 96-well flat bottom plates (5×10^4 T cells/well) alone as negative proliferation control; with 1.25 μ g/mL of coated anti-CD3 and 0.5 μ g/mL of soluble anti-CD28 as positive proliferation control; and with stimulus and autologous CD33⁺ cells at a 1:1 ratio. Cells were cultured in RPMI1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin, and 1% L-glutamine at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. After 4 days, supernatants were collected and frozen, and cells were harvested and stained with CD4-Krome Orange (Beckman Coulter) and CD8-PerCP-Cy5.5 (BD Bioscience) and analyzed by flow cytometry (FC). We used FlowJo V10 to assess T cell proliferation.

2.4 | Arginase 1 activity

Arg-1 activity was analyzed in frozen serum samples from HD and cancer patients with the QuantiChrom Arginase Assay Kit (BioAssay Systems) according to the manufacturer instructions. Samples were previously centrifuged in Amicon ultra-0.5 columns (10 KDa cutoff) (Sigma-Aldrich) to eliminate urea.

2.5 | Cytokines quantification

Frozen supernatants from the in vitro immunosuppression assays and sera samples were thawed and centrifuged. Eight cytokines were detected: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

(GM-CSF), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ), IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-21 with a cytokine 8-plex human panel (Invitrogen) according to manufacturer instructions. Data were analyzed by Luminex 100 (One Lambda).

2.6 | Statistics

Continuous variables were plotted as median and interquartile range (IQR) and compared using nonparametric Mann-Whitney *U* test or Wilcoxon signed-rank test when appropriate. Principal component analysis (PCA) of the myeloid population studied in our cohorts was performed using the factomineR and factoextra R packages. The PCA data set is available upon request. Correlations between continuous variables were evaluated using linear regression or Spearman's rank test and represented as correlation plots using the Hmisc and corrplot R packages. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 8.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) and R software v4.1.1.

3 | RESULTS

3.1 | MDSC subsets are expanded in HCC

Table 1 shows the main characteristics of the studied cohort. To investigate MDSC in HCC patients, we characterized four myeloid populations by FC (Figure S1): monocytes (CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{+/hi}), M-MDSC (CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-/low}), PMN-MDSC (CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁺HLA-DR⁻) and eMDSC (CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁻HLA-DR⁻). These populations were identified in the peripheral blood of both HD and HCC patients before surgery. All three proportions of M-MDSC, PMN-MDSC, and eMDSC were significantly increased in HCC patients compared with HD (Figure 1A-C). In contrast, monocytes were significantly decreased in cancer patients (Figure 1D). Activity of the immunosuppressive molecule Arg-1 in serum as well as circulating IL-10 levels were also higher in HCC patients than in HD (Figure 1E,F). No differences in circulating IL-6, IFN- γ or TNF- α levels were observed between HCC patients and HD (Figure 1G-I).

Based on our previous data showing that a significant number of eMDSC express IL-2R α (CD25) (unpublished results), we asked for the presence of these CD25⁺ eMDSC in HCC patients. By analysing six liver transplant recipients (LTR), five of whom were because of HCC, we observed that a high proportion of eMDSC expressed CD25 (a median of 73% of eMDSC). Both CD25⁺ eMDSC proportion and the per cell expression of CD25 on eMDSC (measured by mean fluorescent intensity, MFI) were significantly augmented in the peripheral blood of liver transplant recipients (LTR) compared to HD (Figure 1J,K). Patients with HCC had the highest numbers of CD25⁺ eMDSC and the highest CD25 expression on eMDSC, while the patient with the lowest percentage of CD25⁺ eMDSC had no liver cancer but alcoholic cirrhosis.

TABLE 1 Characteristics of liver cancer patients.

	<i>n</i> = 22
Age (y), median (IQR)	63 (58–67)
Gender, male, <i>n</i> (%)	19 (86.36%)
Active smoking, <i>n</i> (%)	7 (31.82%)
Alcohol consumption, <i>n</i> (%)	13 (59.01%)
BMI, median (IQR)	28 (24.25–30)
Hepatitis ^a , <i>n</i> (%)	12 (54.54%)
HBV	3 (13.64%)
HCV	10 (45.45%)
Diabetes, <i>n</i> (%)	8 (36.36%)
IDD	1 (4.55%)
NIDD	7 (31.82%)
Cirrhosis, <i>n</i> (%)	16 (72.73%)
Anti-Dyslipidaemia drugs, <i>n</i> (%)	7 (31.82%)
Atorvastatin	4 (18.19%)
Simvastatin	1 (4.55%)
Gemfibrozil	2 (9.09%)
Hepatic encephalopathy, <i>n</i> (%)	3 (13.64%)
Edema-ascites decompensation, <i>n</i> (%)	2 (9.09%)
Laboratory parameters on sample day, median (IQR) ^b	
INR, median (IQR)	1.11 (1.032–1.177)
Bilirubin, mg/dL, median (IQR)	0.6 (0.42–0.98)
Creatinine, mg/dL, median (IQR)	0.98 (0.83–1.09)
Albumin, g/dL, median (IQR)	4.5 (4.1–4.7)
Alpha-fetoprotein, ng/mL, median (IQR)	3.71 (2.78–17.53)
Histological analysis, <i>n</i> (%)	
Poorly differentiated HCC	4 (18.19%)
Moderately differentiated HCC	11 (50%)
Well differentiated HCC	5 (22.73%)
Hepatocolangiocarcinoma (CCA)	2 (9.09%)
Synchronic tumours	1 (4.55%)
Number of nodules, <i>n</i> (%)	
1	8 (36.36%)
2	7 (31.82%)
≥3	7 (31.82%)
Vascular microinvasion	2 (9.09%)
Metastasis	1 (4.55%)
Child-Pugh class, <i>n</i> (%)	
A	19 (86.36%)
B	2 (9.09%)
C	1 (4.55%)
BCLC staging, <i>n</i> (%)	
0	2 (9.09%)
A	15 (68.19%)
A/B	4 (18.19%)
C	1 (4.55%)

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

	<i>n</i> = 22
TNM	
0	1 (4.55%)
I	9 (40.91%)
II	10 (45.46%)
III	2 (9.09%)
Previous treatments ^c	
No	7 (31.82%)
Radiofrequency ablation (RFA)	9 (40.91%)
Transcatheter Arterial Chemoembolization (TACE)	9 (40.91%)
Transarterial radioembolization (TARE)	2 (9.09%)
Surgery	4 (18.19%)
Transplantation, <i>n</i> (%)	
Liver alone	17 (77.27%)
Liver and kidney	1 (4.55%)
Recurrence	2 (9.09%)
Exitus	3 (13.64%)

Abbreviations: BCLC, Barcelona clinic liver cancer staging system; BMI, body mass index; IDD, insulin-dependent diabetes mellitus; INR, international normalised ratio; IQR, interquartile range; NIDD, no insulin-dependent diabetes mellitus; TNM, tumour, node, metastasis; y, years.

^aOne patient had both HBV and HCV.

^bNormal values in the reference population: INR [0.80–1.20], Bilirubin [0.20–1 mg/dL], Creatinine [0.50–0.90 mg/dL], Albumin [3.5–5.0 g/dL], Alpha-fetoprotein [≤7 ng/mL].

^cPatients can have more than one previous treatment.

Moreover, in the follow-up of LTR after transplantation, there was a significant increase of eMDSC expressing CD25. Compared to pre-transplant levels, almost all eMDSC were CD25⁺ at days 7 and 14 post-transplant (Figure 1L). The *per-cell* expression of CD25 on eMDSC also experienced a significant augmentation relative to pre-transplant (Figure 1M). In our cohort of HCC patients, CD25⁺ eMDSC were significantly expanded compared to HD (Figure 1N).

3.2 | HCC patients showed a more immunosuppressive profile than hepatocolangiocarcinoma patients

In order to further understand the contribution of the myeloid cell-related parameters in characterizing liver cancer patients, we carried out PCA. The PCA biplot showed that dimensions 1 and 2 accounted for 38.2% and 25.9%, respectively, of the variation among the analyzed subjects. PCA separated HD from HCC patients into discrete clusters and, interestingly, it also discriminated between patients with HCC and those with CCA (Figure 2A). The parameters that differed the most between HD, HCC patients, and CCA patients belonged to dimension 1, in which monocytes, the *per cell*

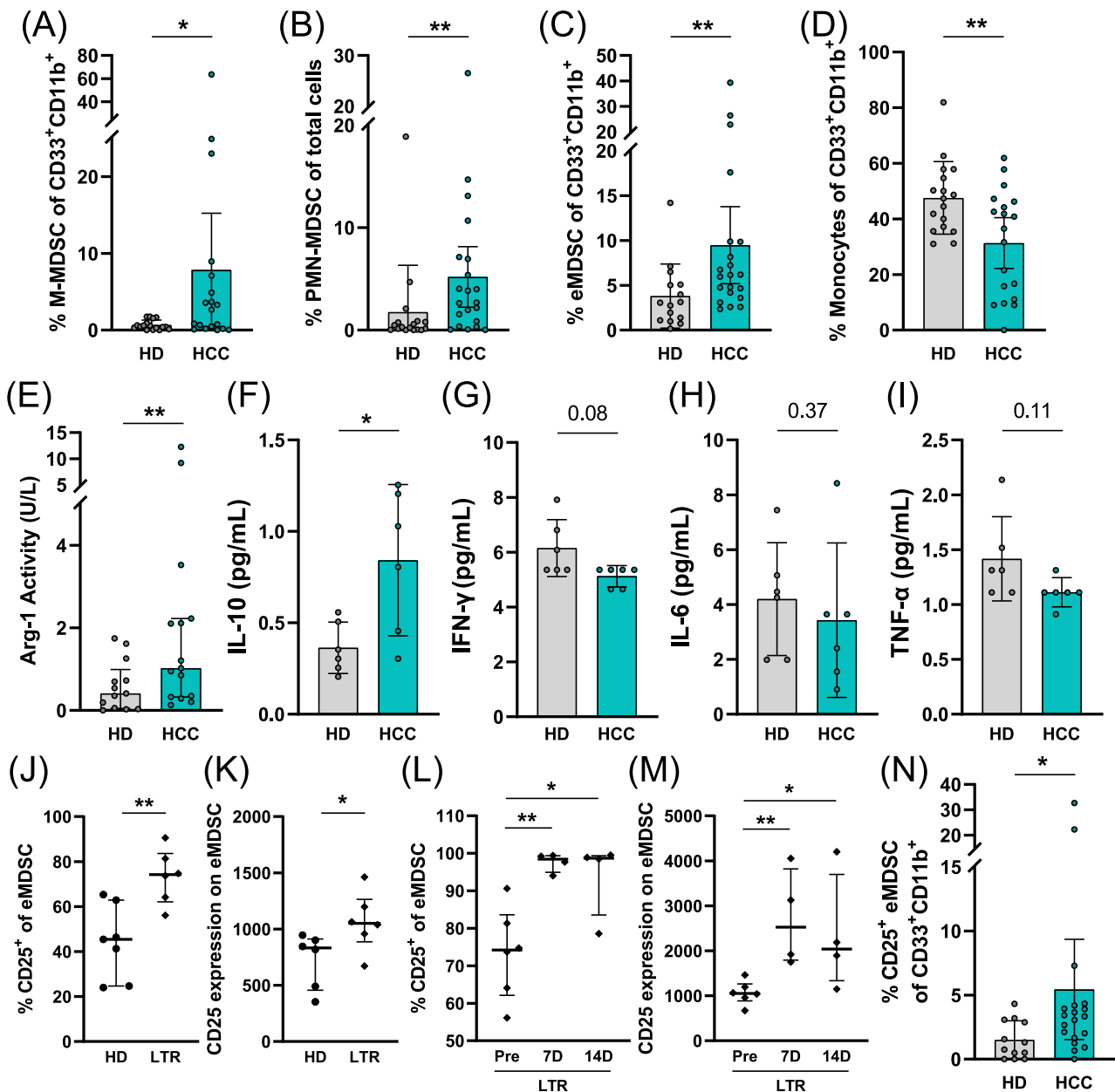


FIGURE 1 Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are expanded in HCC patients. (A) Percentage of M-MDSC (CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-low}), (B) PMN-MDSC (CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁺HLA-DR⁻), (C) e-MDSC (CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁻HLA-DR⁻), and (D) monocytes (CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{hi}) in healthy donors (HD) and hepatocarcinoma (HCC) patients. (E) Arginase (Arg-1) activity in HD and HCC. (F) Circulating levels of IL-10, (G) IFN-γ, (H) IL-6, and (I) TNF-α in HD and HCC patients. (J) Percentage of CD25⁺ eMDSC and (K) CD25 expression in HD and liver transplant recipients (LTR) pre-transplant. (L) Percentage of CD25⁺ eMDSC and (M) CD25 expression in LTR pre-transplant and 7 and 14 days post-transplant. (N) Percentage of CD25⁺ eMDSC in HCC patients. All parameters are shown as median values and interquartile ranges. The significance between groups was determined using the Mann-Whitney *U* test or Wilcoxon signed-rank test when appropriate. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. HCC, hepatocellular carcinoma; HD, healthy donors; MFI, mean fluorescence intensity; Pre, Pre-transplant; 7D, 7 days post-transplant; 14D, 14 days post-transplant.

expression of HLA-DR on monocytes, and M-MDSC contributed the most. HD, HCC, and CCA also differed in dimension 2, which was principally influenced by CD25⁺eMDSC and CD25 expression on eMDSC (Figure 2B). The PCA biplot visually suggests that the MDSC-related immunosuppressive profile is more prevalent in HCC than in CCA patients.

3.3 | Inhibition of T cell proliferation by MDSC from HCC patients is mostly related to M-MDSC

To confirm that the expanded myeloid CD33⁺HLA-DR^{-low} subset in HCC has immunosuppressive capacity and can then be considered true MDSC, CD33⁺ cells isolated from HD and HCC were cocultured

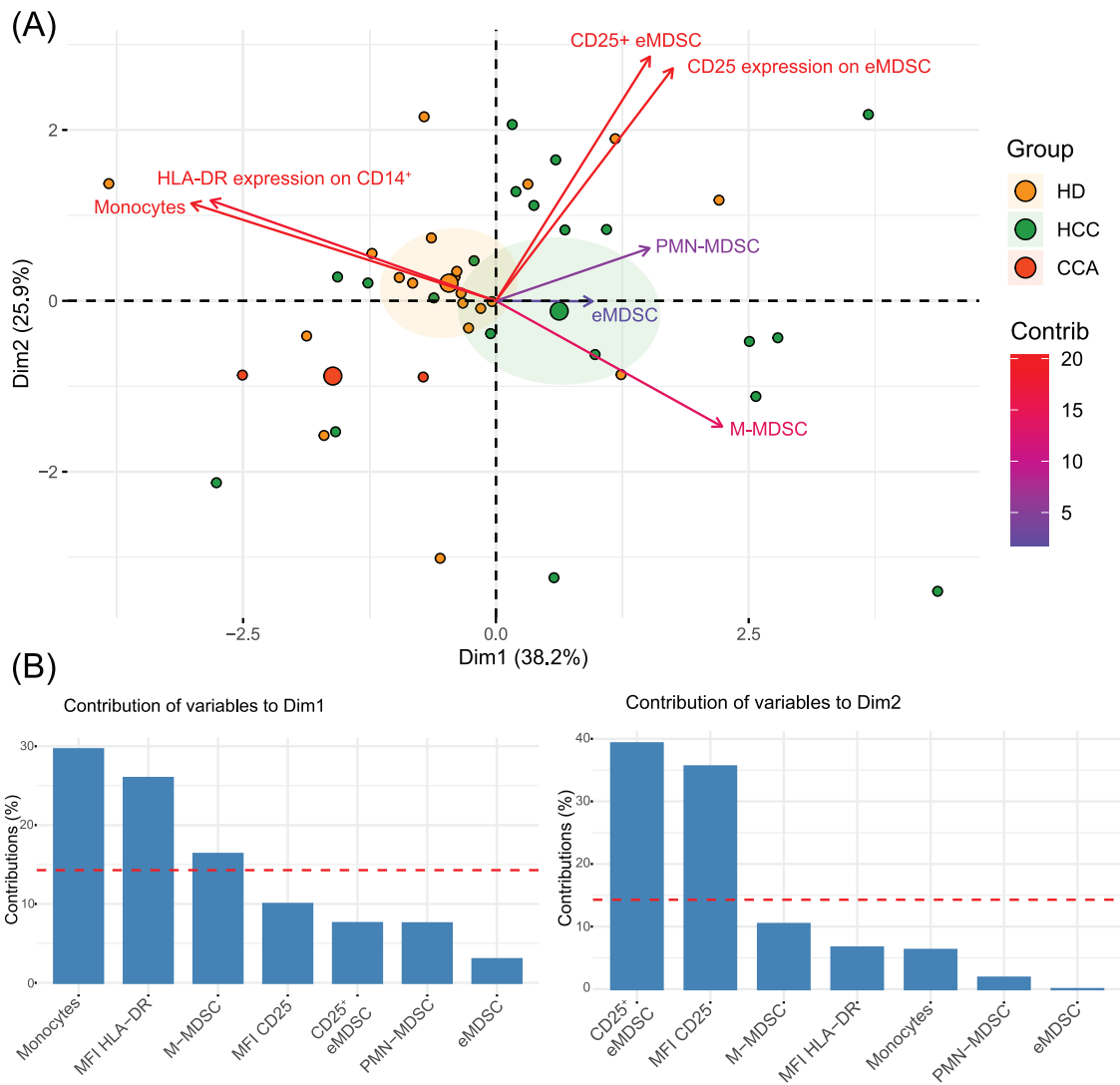


FIGURE 2 Contribution of myeloid cells related parameters in characterizing liver cancer patients. (A) Principal component analysis (PCA) of myeloid cell populations in HD, HCC and CCA patients. (B) Contribution of each population to PCA dimensions 1 and 2. Variables over the red dashed line are considered relevant in contributing to the dimension.

with autologous CFSE-labeled CD33⁻ cells. In cultures, CD33⁻ cell proliferation stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 in the absence of CD33⁺ cells was similar in both HD and HCC patients (Figure 3A,B). The CD33⁺ myeloid compartment from HD, with a higher proportion of monocytes (Figure 3C), promoted CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation in vitro (Figure 3A,D), whereas CD33⁺ cells from HCC patients, enriched in CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-low} (M-MDSC) and CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁻HLA-DR⁻ (eMDSC) (Figure 3C), inhibited both CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation (Figure 3B,D). The measurement of cytokines in the culture supernatants showed that the inhibition of proliferation by CD33⁺ cells from HCC patients was accompanied by a reduction in the production of IL-2 and an augmentation of IL-10. The myeloid-related cytokines IL-6 and TNF- α increased when myeloid cells were added to the culture (Figure 3E). No differences were found in GM-CSF, IFN- γ , IL-4, and IL-21 (data not shown).

Because the strength to inhibit the lymphocyte proliferation exhibited by CD33⁺ cells from HCC was variable between individuals, we explored which clinical features could be related to the different immunosuppressive capacity. We did not observe any relationship between the rate of CD4⁺ or CD8⁺ T cells proliferation inhibition and the presence of cirrhosis, hepatitis, TNM (tumor, nodule, metastasis) stage, or serum alpha-fetoprotein (aFP) levels (data not shown). However, there was a significant direct correlation between the number of HCC nodules in the patients' liver and the inhibition of T cell proliferation of both CD4⁺ ($r = 0.90$, $p = 0.0052$) and CD8⁺ T lymphocytes ($r = 0.94$, $p = 0.0014$) (Figure 3F).

In addition, we further investigated whether T cell proliferation inhibition was associated with a specific subset or phenotype among the studied myeloid cell populations (Figure 4 and Table S1). Regarding MDSC, there was a significant direct correlation between M-MDSC percentage and CD4⁺ T cell proliferation inhibition, and a

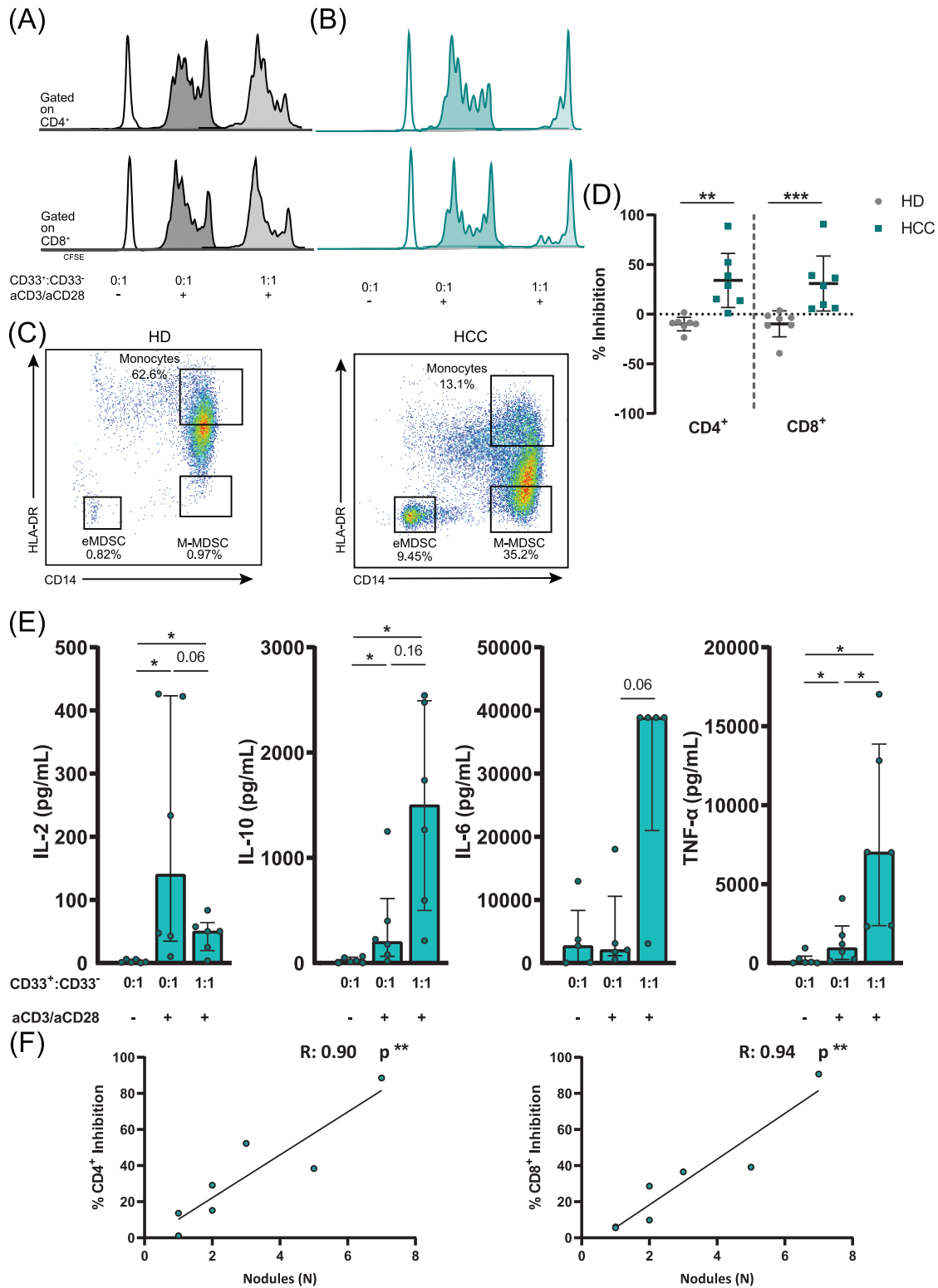


FIGURE 3 MDSC isolated from HCC patients inhibited CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation. Representative proliferation of autologous carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled CD33⁻ cells cocultured with ex vivo isolated CD33⁺ cells (A) from HD or (B) HCC patients. (C) Representative HD and HCC patient myeloid compartments. (D) Percent inhibition of CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation (proliferation of positive control – proliferation of ratio 1:1 culture) in cultures with HD or HCC CD33⁺ myeloid cells. (E) IL-2, IL-10, IL-6, and TNF-α in vitro production on HCC immunosuppression cultures. (F) Correlation between the number of nodules and CD4⁺ (left) and CD8⁺ (right) T cell inhibition of proliferation. Comparisons are shown as median and interquartile ranges. The significance between groups was determined using the Mann-Whitney *U* test. Correlations were performed using Spearman's rank test. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. aCD3, anti-CD3; aCD28, anti-CD28; MFI, mean fluorescence intensity; N, number; *p*, *p*-value; *r*, Spearman's correlation coefficient.

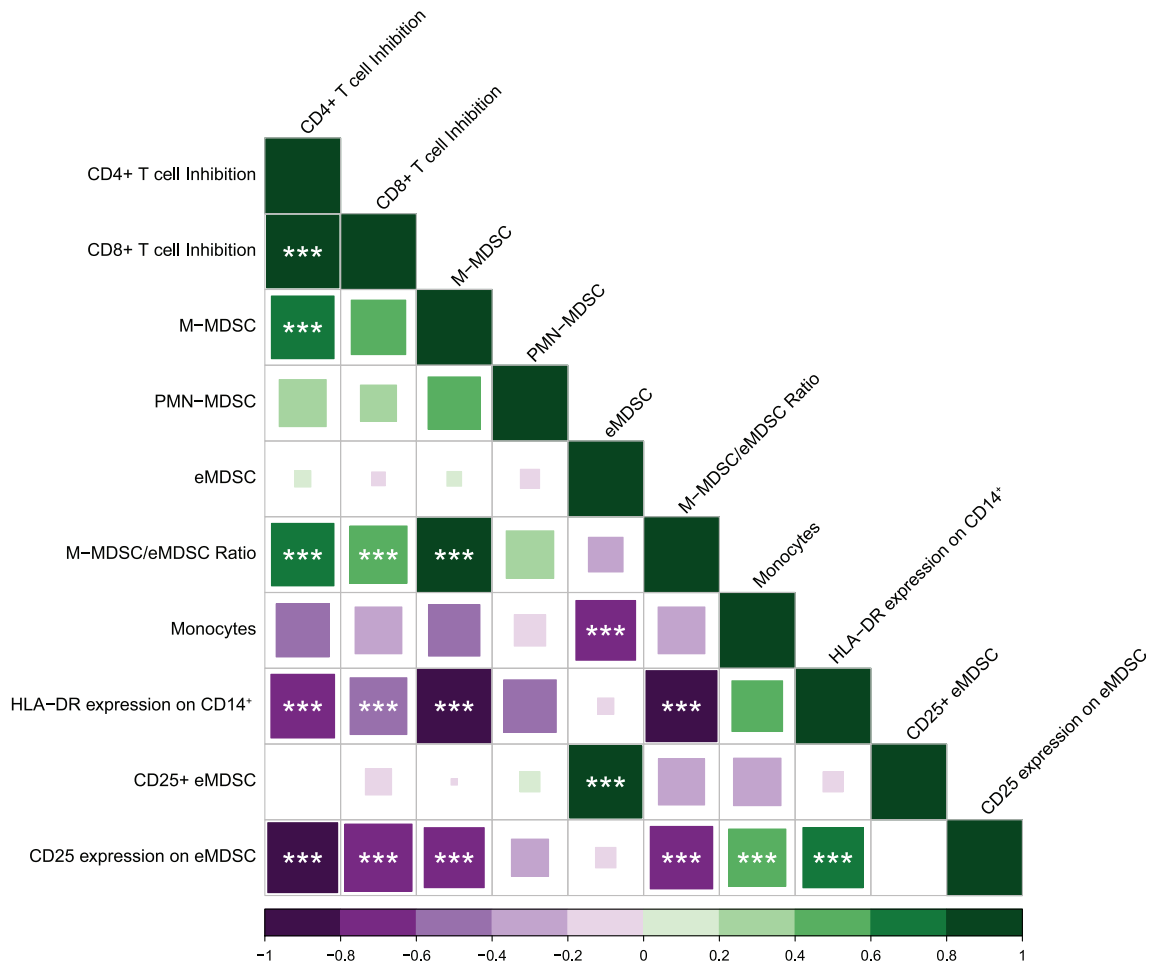


FIGURE 4 Correlation analysis between CD4⁺ and CD8⁺ T cell inhibition and percentage of MDSC in HD and HCC patients. Direct correlations appear in green, and inverse correlations appear in purple. Size and color gradient of the square correspond to the magnitude of the correlation. Asterisks indicate statistical significance. Correlations were performed using Spearman's rank test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Specific p -values and Spearman's rank correlation coefficient (r) for each comparison are shown in Table S1.

nearly significant correlation with CD8⁺ T cell proliferation inhibition ($p = 0.06$). The correlation between lymphocyte proliferation inhibition and PMN-MDSC was weaker, and the weakest (even negative in the case of CD8⁺ T cells) with eMDSC. The M-MDSC/eMDSC ratio showed a significant direct correlation with the suppression of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte proliferation. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation inhibition inversely correlated with the proportion of monocytes and the *per* cell expression of HLA-DR in CD14⁺ cells. Interestingly, CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation inhibition showed a significant inverse correlation with CD25 expression in eMDSC. The *per* cell expression of CD25 in eMDSC directly correlated with other T-cell activating factors, such as the proportion of monocytes and their surface expression of HLA-DR, while it inversely correlated with M-MDSC and the M-MDSC/eMDSC ratio.

Collectively, these data suggest that the expanded adaptive immunity-suppressing myeloid compartment in HCC is mostly driven by M-MDSC.

3.4 | Advanced HCC disease is associated with M-MDSC and eMDSC subsets

Next, we assessed the potential relationship between MDSC and clinical features in HCC patients. No differences were found in MDSC subset distribution in relation to tobacco or alcohol consumption. There were no changes in MDSC subsets among patients taking anti-lipidemia drugs (data not shown). Patients with either type I insulin-dependent (IDD) or non-insulin-dependent (NIDD) diabetes mellitus showed significantly higher levels of M-MDSC than HCC patients without diabetes. Diabetes did not affect the distribution of PMN-MDSC, eMDSC, CD25⁺ eMDSC, or monocyte subsets (Figure S2A). No differences were observed in myeloid populations in HCC patients in relation to viral hepatitis (hepatitis B (HBV) and C (HCV) virus) with the exception of PMN-MDSC, which showed significantly higher levels in infected patients (Figure S2B). All MDSC populations were higher in HCC patients with than without cirrhosis, although the differences did not reach statistical significance (Figure S2C).

Then we analyzed the relationship between MDSC subsets and clinical variables related to tumor progression. HCC patients with more than two nodules presented higher levels of both eMDSC and CD25⁺eMDSC than HCC patients with two or fewer nodules. No differences were found in M-MDSC, PMN-MDSC, or monocytes (Figure 5A). Moreover, patients with TNM stage II/III (T2N0M0 or

T3N0M0) exhibited significantly higher levels of M-MDSC, eMDSC, and CD25⁺eMDSC than patients with less advanced TNM stages (0/I, T1N0M0), while there were no differences in PMN-MDSC or monocyte distribution according to TNM stage (Figure 5B). Stratification according to the median value of M-MDSC proportion (% M-MDSC = 2.66) showed an accumulation of stage II/III HCC in the

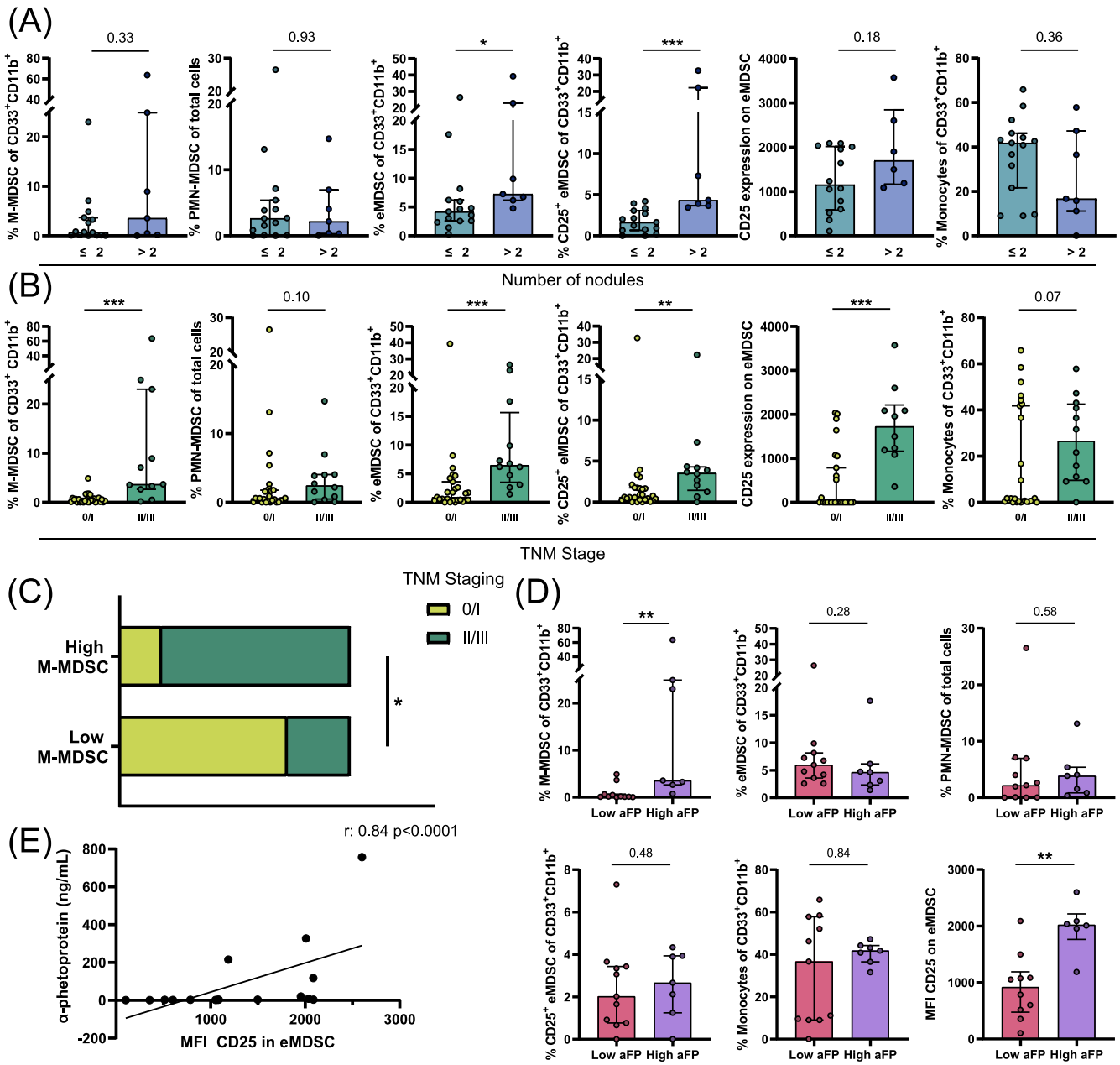


FIGURE 5 Patients with more advanced HCC disease showed higher levels of M-MDSC and eMDSC. Percentage of M-MDSC, PMN-MDSC, eMDSC, CD25⁺eMDSC, per cell CD25 expression on eMDSC, and monocytes in HCC patients classified according to (A) the number of nodules and (B) TNM stage (C) Distribution of TNM stage in patients classified according to M-MDSC levels (low M-MDSC ≤2.66%, high M-MDSC >2.66%). (D) Percentage of M-MDSC, PMN-MDSC, eMDSC, CD25⁺eMDSC, monocytes and per cell CD25 expression on eMDSC in HCC patients classified according to aFP levels (low aFP, aFP <7 ng/mL; high aFP, aFP >7 ng/mL) and (E) Correlation between aFP levels and CD25 expression on eMDSC. Comparisons are shown as median and interquartile ranges. The significance between groups was determined using the Mann-Whitney U test. Correlations were performed using Spearman's rank test. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. aFP, alpha-phenoprotein; MFI, mean fluorescence intensity; p, p-value; r, Spearman's correlation coefficient.

high % M-MDSC group (9/11 patients in the % M-MDSC >2.66% group) while only 3/11 stage II/III patients were included in the low % M-MDSC group (Figure 5C, 81.2% vs. 27.3%, respectively, $p = 0.03$).

The tumor marker aFP was measured, and patients were classified into high and low aFP according to our hospital aFP cutoff levels (7 ng/mL) (Figure 5D). Patients with high aFP (≥ 7 ng/mL) had significantly higher levels of M-MDSC, while the proportions of PMN-MDSC and eMDSC did not differ according to aFP level. The proportion of CD25⁺ eMDSC was increased, although not significantly, in patients with higher serum aFP. However, *per cell* expression of CD25 on eMDSC was significantly higher in patients with high aFP levels, and there was a significant direct correlation between CD25 expression on eMDSC and the amount of serum aFP in HCC patients (Figure 5E).

PCA of myeloid populations separated HCC patients stratified according to the presence or absence of cirrhosis (Figure S3A), number of nodules (Figure S3B), TNM stage (Figure S3C) and aFP level (Figure S3D). Patients with more advanced disease were clustered separately from controls and were observed to have a more immunosuppressive profile. Arg-1 activity was not different in patients with or without diabetes, hepatitis, or cirrhosis, neither in relationship with the number of nodules, TNM stage, and aFP serum level (data not shown). Finally, PCA analysis showed that those patients who died during follow-up were discretely distinguished from the HCC patients who remained alive in dimension 2, with CD25⁺ eMDSC and CD25 expression *per* each eMDSC as the main contributors (Figure S3E).

4 | DISCUSSION

Among the immunosuppressive cells of the tumoral microenvironment, MDSC are known to play a critical role in tumor progression and poor prognosis. MDSC are increased in peripheral blood as well as in the tumoral microenvironment in different malignancies, including HCC.^{6,7,13-16} Here, we demonstrate that all three subsets, M-MDSC, PMN-MDSC, and eMDSC, are expanded in the peripheral blood of HCC patients when compared with HD, whereas the classical antigen presenting cells (monocytes identified as CD14⁺HLA-DR^{hi} cells) are reduced. In accordance with previous reports, our study also shows that MDSC levels are not augmented in CCA patients.¹⁵ Accompanying the expansion of immunosuppressive myeloid cells, in our HCC cohort there is also an increase in Arg-1 activity and IL-10 circulating levels, well-known immunosuppressive mechanisms displayed by MDSC. In gastric adenocarcinoma patients, intratumoral and circulating Arg-1-expressing cells mostly corresponded to eMDSC and M-MDSC.¹⁷

In our *in vitro* experiments, the increased fraction of CD33⁺ HLA-DR^{-/low} in the peripheral blood of HCC subjects reduced the proliferation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells and the production of IL-2, thus representing true MDSC according to literature.⁴ The culture of MDSC together with T cells increased IL-10 production as well as the myeloid-related cytokines IL-6 and TNF- α . IL-10 is known to be produced by myeloid suppressive cells and to be influential for their

immunosuppressive capacity.^{18,19} Although TNF- α is typically a pro-inflammatory cytokine, an autocrine secretion of TNF- α by MDSC has been identified as a factor promoting MDSC survival, accumulation, and suppressive capacity, probably signaling through tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR-2).^{20,21} IL-6 has been associated with impairment of anti-tumoral T cells differentiation together with the accumulation and maintenance of the immunosuppressive properties of MDSC.²²⁻²⁴ In our HCC cohort, M-MDSC were the main immunosuppressive cells as T lymphocytes proliferation inhibition directly correlated with M-MDSC as well as with M-MDSC/eMDSC ratio. These findings agree with previously published reports which support M-MDSC as the key immunosuppressive MDSC in HCC.^{5,9,13} We did not find any significant relationship between PMN-MDSC and T cells suppression, although this observation could be a consequence of the methodology used for PBMC and CD33⁺ cells separation, since PMN-MDSC are very dependent on technical variables during the sample processing.²⁵

Human eMDSC were first found in patients with breast cancer,²⁶⁻²⁹ where they were shown to promote tumor growth and metastasis and to confer poor prognosis. They have also been described in hematological cancers such as acute myeloid leukemia,³⁰ multiple myeloma³¹ and non-Hodgkin's lymphoma,³² in renal cell carcinoma³³ and in epithelial ovarian cancer.³⁴ To the best of our knowledge, this is the first report that identifies the presence of eMDSC in HCC patients and analyzes their relationship with the inhibition of lymphocyte proliferation and with the HCC disease stage. Our results suggest that peripheral blood eMDSC from HCC patients are unrelated to the inhibition of T cell proliferation. This is an interesting finding since eMDSC have been considered more immature MDSC with enhanced suppressive properties. However, the capacity to inhibit T cell amplification and Th1 polarization and to induce T cell apoptosis has been demonstrated for intratumoral eMDSC²⁶ or CD33⁺CD13⁺CD14⁻CD15⁻ cells derived from culturing umbilical blood CD33⁺ cells with the breast cancer cell line MDA-MB-231,^{27,28} but not for circulating eMDSC similar to the ones described here. In agreement with our data, a study in human head and neck and urological cancer showed that circulating eMDSC presented marginal or no capacity to inhibit T cell effector functions.³⁵

In our HCC patients, we also detected the presence of eMDSC expressing CD25 (IL-2R α chain). Before surgery for liver transplantation, around 80% of eMDSC in HCC patients expressed CD25, and the frequency of CD25⁺ eMDSC was significantly higher in HCC patients than in controls. Other tumor-associated myeloid cells expressing IL-2R α have been described, such as dendritic cells and macrophages. The presence of CD25 in these cells is generally explained as an IL-2-sequestering mechanism, which further enhances the tolerance of the immune response towards the growing of tumor cells.^{36,37} Interestingly, the administration of high-dose IL-2 in a clinical trial for metastatic melanoma and kidney cancer was accompanied by an increase of MDSC,³⁸ a finding that might suggest an IL-2-dependent signaling to direct the differentiation of cellular precursors towards MDSC and/or to maintain their immature phenotype. In our correlation analysis, we found that CD25⁺ eMDSC were even less

related to the capacity to inhibit CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte proliferation than eMDSC. Moreover, the inhibition of proliferation was proportionally inverse to the amount of CD25 expressed on the eMDSC membrane. The surface expression of CD25 on CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁻HLA-DR⁻ myeloid cells would then identify a cell population formerly phenotyped as eMDSC but without the capacity to inhibit T cell proliferation. The meaning of IL-2R α chain and its role in eMDSC is still unknown and deserves further investigation.

Regarding the association of MDSC and tumor progression, we observed that M-MDSC, eMDSC, and CD25 expression on eMDSC were more prominent in more advanced forms of the disease defined by a higher number of nodules, higher TNM stage, and increased AFP serum levels. No differences were found in PMN-MDSC or monocytes. Higher levels of M-MDSC have been related to HCC recurrence and progression after radiofrequency ablation,¹³ with shorter survival time after radiation therapy¹⁴ and with lower overall survival after transarterial radioembolization with Yttrium-90.³⁹ These results, together with our own data, support a role for M-MDSC in HCC progression, which would be at least partially mediated by their capacity to inhibit T cell proliferation. Our results suggest that eMDSC and CD25⁺ eMDSC are also related to advanced HCC, but probably by mechanisms other than the inhibition of the adaptive immunity response, which may include abrogation of innate immunity responses from NK cells and M1 macrophages, and potentiation of angiogenesis, invasiveness, and epithelial-mesenchymal transition.^{2,29,40,41}

The small number of HCC patients analyzed and a modest representation of advanced stages of the disease are limitations in this study. An analysis of intratumoral MDSC would also be required to add more information on the presence of the different MDSC subsets in the HCC microenvironment and their functional properties.

In conclusion, we have shown here that M-MDSC, eMDSC, and eMDSC expressing the IL-2R α chain are expanded in the circulation of HCC patients and related to advanced forms of the disease. However, the capacity to inhibit adaptive immunity may differ among those MDSC subsets and mostly applies to M-MDSC. More investigation is needed to fully understand the immunosuppressive and protumoral properties of circulating as well as intratumoral MDSC in HCC. This information will be key to designing MDSC-focused strategies that may improve present and future immunotherapies for liver cancer.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Marta Chivite-Lacaba: Conceptualization; visualization; formal analysis; writing – original draft; writing – review and editing; investigation. **Iago Justo:** Data curation; writing – review and editing. **Alberto Utrero-Rico:** Methodology; writing – review and editing. **Oscar Caso:** Data curation; writing – review and editing. **Cecilia González-Cuadrado:** Writing – review and editing; investigation. **Manuel J. Del Rey:** Formal analysis; investigation; writing – review and editing. **Rocio Laguna-Goya:** Methodology; supervision; writing – review and

editing. **Javier Arroyo-Ródenas:** Investigation; writing – review and editing. **Ángel Alfocea-Molina:** Investigation; writing – review and editing. **Carlota C. Ruigómez-Martín:** Investigation; writing – review and editing. **Manuel Serrano:** Methodology; writing – review and editing. **Lorena Pascual-Palacios:** Investigation; writing – review and editing. **María Esther Mancebo:** Funding acquisition; writing – original draft; writing – review and editing. **Estela Paz-Artal:** Funding acquisition; project administration; resources; writing – original draft; writing – review and editing; supervision.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank all the patients, nurses, clinical colleagues, and healthy volunteers that have contributed to this research. We would also like to thank all the members in our research group and the Immunology Department in Hospital Universitario 12 de Octubre for their helpful discussion.

FUNDING INFORMATION

This study was supported by funds from Asociación Española contra el Cáncer (2017/0068), a private project to EP-A (2023/0089), and by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Science and Innovation (PI22/00586)—co-funded by the European Union (European Development Regional Fund). MC-L holds a FPU predoctoral fellowship (FPU19/06393), CG-C holds a P-FIS predoctoral fellowship (FI23/00275) from the ISCIII, and MS holds a research contract “Rio Hortega” (CM22/00093) from the ISCIII, all from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

Estela Paz-Artal received lecture fees from the Spanish Group of Cancer Immuno-Biotherapy in collaboration with AstraZeneca, and a research grant (for institution) from PharmaMar. María Esther Mancebo received lecture fees from Hansa Biopharma, Astellas Pharma, and Chiesie. The remaining authors have no conflicts of interest to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data generated and analyzed in this study are included in this article and/or its online supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

Written informed consent was obtained from all participants recruited in this study. The study was approved by the Institutional Review Board in Instituto de Investigación Biomédica, Hospital Universitario 12 de Octubre (approval code CEI 17/015).

ORCID

Marta Chivite-Lacaba  <https://orcid.org/0000-0001-9357-5556>

Alberto Utrero-Rico  <https://orcid.org/0000-0001-8814-8410>

Cecilia González-Cuadrado  <https://orcid.org/0000-0001-9854-0870>

Rocio Laguna-Goya  <https://orcid.org/0000-0003-4265-8567>

María Esther Mancebo  <https://orcid.org/0000-0002-1535-9062>

Estela Paz-Artal  <https://orcid.org/0000-0002-0646-2375>

REFERENCES

- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):162-174. doi:10.1038/nri2506
- Veglia F, Sanseviero E, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(8):485-498. doi:10.1038/s41577-020-00490-y
- Barry ST, Gabrilovich DI, Sansom OJ, Campbell AD, Morton JP. Therapeutic targeting of tumour myeloid cells. *Nat Rev Cancer*. 2023;23(4):216-237. doi:10.1038/s41568-022-00546-2
- Bronte V, Brandau S, Chen SH, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*. 2016;7(1):12150. doi:10.1038/ncomms12150
- Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology*. 2008;135(1):234-243. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.020
- Hoechst B, Voigtlaender T, Ormandy L, et al. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the Nkp30 receptor. *Hepatology*. 2009;50(3):799-807. doi:10.1002/hep.23054
- Kalathil S, Lugade AA, Miller A, Iyer R, Thanavala Y. Higher frequencies of GARP(+)CTLA-4(+)Foxp3(+) T regulatory cells and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients are associated with impaired T-cell functionality. *Cancer Res*. 2013;73(8):2435-2444. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3381
- Shen P, Wang A, He M, Wang Q, Zheng S. Increased circulating Lin (-/low) CD33(+) HLA-DR(-) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatol Res*. 2014;44(6):639-650. doi:10.1111/hepr.12167
- Zhang X, Fu X, Li T, Yan H. The prognostic value of myeloid derived suppressor cell level in hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2019;14(12):e0225327. doi:10.1371/journal.pone.0225327
- Abou-Alfa GK, Lau G, Kudo M, et al. Tremelimumab plus Durvalumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *NEJM Evid*. 2022;1(8):EVI-Doa2100070. doi:10.1056/EVIDoa2100070
- Llovet JM, Castet F, Heikenwalder M, et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19(3):151-172. doi:10.1038/s41571-021-00573-2
- Zhou J, Liu M, Sun H, et al. Hepatoma-intrinsic CCRK inhibition diminishes myeloid-derived suppressor cell immunosuppression and enhances immune-checkpoint blockade efficacy. *Gut*. 2018;67(5):931-944. doi:10.1136/gutjnl-2017-314032
- Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, et al. Increase in CD14+HLA-DR -/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(8):1421-1430. doi:10.1007/s00262-013-1447-1
- Wang D, An G, Xie S, Yao Y, Feng G. The clinical and prognostic significance of CD14(+)HLA-DR(-/low) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients receiving radiotherapy. *Tumour Biol*. 2016;37(8):10427-10433. doi:10.1007/s13277-016-4916-2
- Bayik D, Lauko AJ, Roversi GA, et al. Hepatobiliary malignancies have distinct peripheral myeloid-derived suppressor cell signatures and tumor myeloid cell profiles. *Sci Rep*. 2020;10(1):18848. doi:10.1038/s41598-020-75881-1
- Li T, Zhang X, Lv Z, Gao L, Yan H. Increased expression of myeloid-derived suppressor cells in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int*. 2020;2020(1):6527192. doi:10.1155/2020/6527192
- Ren W, Zhang X, Li W, et al. Circulating and tumor-infiltrating arginase 1-expressing cells in gastric adenocarcinoma patients were mainly immature and monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Sci Rep*. 2020;10(1):8056. doi:10.1038/s41598-020-64841-4
- Huang B, Pan PY, Li Q, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*. 2006;66(2):1123-1131. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1299
- Chen J, Ye Y, Liu P, et al. Suppression of T cells by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Hum Immunol*. 2017;78(2):113-119. doi:10.1016/j.humimm.2016.12.001
- Zhao X, Rong L, Zhao X, et al. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest*. 2012;122(11):4094-4104. doi:10.1172/JCI64115
- Schroder M, Krottschel M, Conrad L, et al. Genetic screen in myeloid cells identifies TNF- α autocrine secretion as a factor increasing MDSC suppressive activity via Nos2 up-regulation. *Sci Rep*. 2018;8(1):13399. doi:10.1038/s41598-018-31674-1
- Marigo I, Bosio E, Solito S, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBP β transcription factor. *Immunity*. 2010;32(6):790-802. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.010
- Tsukamoto H, Nishikata R, Senju S, Nishimura Y. Myeloid-derived suppressor cells attenuate TH1 development through IL-6 production to promote tumor progression. *Cancer Immunol Res*. 2013;1(1):64-76. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0030
- Tcyganov EN, Hanabuchi S, Hashimoto A, et al. Distinct mechanisms govern populations of myeloid-derived suppressor cells in chronic viral infection and cancer. *J Clin Invest*. 2021;131(16):e145971. doi:10.1172/JCI145971
- Cassetta L, Bruderek K, Skrzeczynska-Moncznik J, et al. Differential expansion of circulating human MDSC subsets in patients with cancer, infection and inflammation. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2):e001223. doi:10.1136/jitc-2020-001223
- Yu J, Du W, Yan F, et al. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol*. 2013;190(7):3783-3797. doi:10.4049/jimmunol.1201449
- Yu J, Wang Y, Yan F, et al. Noncanonical NF- κ B activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *J Immunol*. 2014;193(5):2574-2586. doi:10.4049/jimmunol.1400833
- Jiang M, Chen J, Zhang W, et al. Interleukin-6 trans-signaling pathway promotes immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells via suppression of suppressor of cytokine signaling 3 in breast cancer. *Front Immunol*. 2017;8:1840. doi:10.3389/fimmu.2017.01840
- Chen G, Li X, Ji C, et al. Early myeloid-derived suppressor cells accelerate epithelial-mesenchymal transition by downregulating ARID1A in luminal a breast cancer. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:973731. doi:10.3389/fbioe.2022.973731
- Lv J, Zhao Y, Zong H, Ma G, Wei X, Zhao Y. Increased levels of circulating monocytic- and early-stage myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in acute myeloid leukemia. *Clin Lab*. 2021;67(3). doi:10.7754/Clin.Lab.2020.200719
- Tyrinova T, Batorov E, Aristova T, et al. Decreased circulating myeloid-derived suppressor cell count at the engraftment is one of the risk factors for multiple myeloma relapse after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Heliyon*. 2024;10(5):e26362. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e26362
- Pu LF, Li MM, Feng XJ, et al. Accumulation of circulating myeloid-derived suppressor cell subsets: predicting poor clinical efficacy and prognosis through T cell suppression in non-Hodgkin's lymphoma. *J Leukoc Biol*. 2024;115(6):1094-1107. doi:10.1093/jleuko/qiae032

33. Kobayashi Y, Yamada D, Kawai T, et al. Different immunological effects of the molecular targeted agents sunitinib, everolimus and temsirolimus in patients with renal cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2020; 56(4):999-1013. doi:[10.3892/ijo.2020.4975](https://doi.org/10.3892/ijo.2020.4975)
34. Okla K, Czerwonka A, Wawruszak A, et al. Clinical relevance and immunosuppressive pattern of circulating and infiltrating subsets of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in epithelial ovarian cancer. *Front Immunol*. 2019;10:691. doi:[10.3389/fimmu.2019.00691](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00691)
35. Lang S, Bruderek K, Kaspar C, et al. Clinical relevance and suppressive capacity of human myeloid-derived suppressor cell subsets. *Clin Cancer Res*. 2018;24(19):4834-4844. doi:[10.1158/1078-0432.CCR-17-3726](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3726)
36. Driesen J, Popov A, Schultze JL. CD25 as an immune regulatory molecule expressed on myeloid dendritic cells. *Immunobiology*. 2008; 213(9-10):849-858. doi:[10.1016/j.imbio.2008.07.026](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.07.026)
37. Pan Z, Bao L, Lu X, et al. IL2RA(+)VSIG4(+) tumor-associated macrophage is a key subpopulation of the immunosuppressive microenvironment in anaplastic thyroid cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2023;1869(1):166591. doi:[10.1016/j.bbdis.2022.166591](https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2022.166591)
38. Finkelstein SE, Carey T, Fricke I, et al. Changes in dendritic cell phenotype after a new high-dose weekly schedule of interleukin-2 therapy for kidney cancer and melanoma. *J Immunother*. 2010;33(8):817-827. doi:[10.1097/CJI.0b013e3181ecccad](https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181ecccad)
39. Boral B, Balli HT, Sozutok S, Pehlivan UA, Aikimbaev K. Clinical and prognostic significance of CD14 (+) HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells in patients with hepatocellular carcinoma received transarterial radioembolization with Yttrium-90. *Scand J Immunol*. 2022;95(3):e13132. doi:[10.1111/sji.13132](https://doi.org/10.1111/sji.13132)
40. Prieto J, Melero I, Sangro B. Immunological landscape and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(12):681-700. doi:[10.1038/nrgastro.2015.173](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.173)
41. Cai J, Cui Y, Yang J, Wang S. Epithelial-mesenchymal transition: when tumor cells meet myeloid-derived suppressor cells. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021;1876(1):188564. doi:[10.1016/j.bbcan.2021.188564](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188564)

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Chivite-Lacaba M, Justo I, Utrero-Rico A, et al. Delineation of monocytic and early-stage myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of patients with hepatocarcinoma. *Int J Cancer*. 2025;1-13. doi:[10.1002/ijc.35390](https://doi.org/10.1002/ijc.35390)

