

Estudio de la respuesta antitumoral de la interleucina-12 en cáncer de colon inducido mediante 1,2-dimetilhidracina (DMH)

S. Coca, S. Enrech, V. Moreno García, M. A. Sáez, C. Gutiérrez, A. Colmenarejo, J. M. Hernández y J. Pérez Piqueras

Servicios de Anatomía Patológica y Digestivo. Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla. Madrid. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid

RESUMEN

Objetivo: la interleucina (IL-12) es una citocina que estimula la proliferación y la actividad citotóxica de los linfocito T y las células *natural killer* (NK). En trabajos previos se ha observado una relación entre la infiltración intratumoral de células NK y una mayor supervivencia en carcinomas colorrectales (CCR). Existen evidencias de un efecto aditivo en la actividad inmunomoduladora de la asociación de IL-12 con IL-2. Así, nos hemos propuesto el estudio de la capacidad de respuesta inmune antitumoral, tras la administración sistémica de IL-12 sola o combinada con IL-2, en un modelo experimental de CCR inducidos mediante la administración de 1,2-dimetilhidracina (DMH).

Método: sesenta y cinco ratas Wistar de 6 semanas a las que se administró en inyección subcutánea una dosis semanal de DMH a razón de 20 mg/kg de peso durante 26 semanas. Finalizado el periodo de inducción, los animales se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos. I: grupo control. Grupo II, se administró IL-12 recombinante murina. Grupo III: se administró IL-12, combinada con IL-2. Las ratas se sacrificaron en la semana 30, estudiándose los siguientes parámetros: número y localización de tumores, tamaño y carga tumoral. Se realizó inmunotinción para células NK con anticuerpo monoclonal CD 57. Se establecieron tres grupos según la cuantía del infiltrado: leve, menos 50 células/ 50 campos de gran aumento (CGA), moderado, entre 50 y 150/células/50 CGA y elevado, más de 150 células/50 CGA.

Resultados: durante la inducción tumoral fallecieron 35 ratas. Las 30 restantes fueron distribuidas aleatoriamente en 3 grupos de 10. Durante las 2 semanas de tratamiento fallecieron 2 ratas, del grupo II. Todas las ratas de los grupos I y III desarrollaron CCR. En el grupo II, dos animales (25%) no desarrollaron tumor. Sólo una rata del grupo II desarrolló neoplasias múltiples en contraste con el grupo I en el que esto ocurrió en 6 ratas (60%) y siete (70%) en el grupo III. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el número de tumores desarrollados entre el grupo II respecto al I ($p = 0,028$) y al grupo III ($p = 0,019$). El mayor tamaño tumoral o el volumen tumoral total fueron menores en el grupo II pero no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con los restantes grupos. Un 10% de las ratas del grupo I presentó moderada o extensa infiltración, frente al 60% del grupo II ($p = 0,077$) y al 70% del grupo III ($p = 0,02$). Entre los grupos II y III no se encontró ninguna diferencia estadística ($p = 1$).

Conclusión: El modelo usado de inducción tumoral es un modelo útil para el estudio de la eficacia de distintos tratamientos antitumorales.

Pensamos que la IL-12 tiene un efecto antineoplásico frente al desarrollo de tumores experimentales, lo que puede ser atribuido, al menos en parte, al estímulo ejercido por esta citocina sobre los infiltrados intratumorales de células NK.

Palabras clave: Células NK. Carcinoma colorrectal inducido. Interleucina-12. Interleucina-2.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es aún un importante problema de salud pública pues se trata de la segunda neoplasia en incidencia y mortalidad en los países desarrollados, tras el cáncer de pulmón (un 10% de las muertes por cáncer en el hombre y un 11% en las mujeres se deben a CCR) (1). A pesar de los avances en el diagnóstico precoz y en el tratamiento, la mortalidad por este tumor ha disminuido sólo ligeramente, y la supervivencia a los 5 años permanece en un 45% (2).

Tradicionalmente se ha señalado que la mediana de supervivencia de los enfermos con CCR diseminado, sin tratamiento citostático, es de 6-8 meses. Con quimioterapia con frecuencia se alcanzan supervivencias que oscilan entre los 12 y 18 meses. Los esquemas actuales de tratamiento habitualmente logran tasas de respuesta que oscilan entre el 20-40%, pero cuando se consideran exclusivamente los estudios aleatorizados más recientes, esta cifra desciende hasta tan sólo el 20%. Los esquemas de quimioterapia ± radioterapia adyuvante no han conseguido demostrar en el estadio III más de un 25-30% de beneficio en la supervivencia (3). Por tanto, los resultados hasta el momento obtenidos con el tratamiento sistémico del CCR, tanto en lo que concierne a la prevención de las recaídas como al tratamiento de la enfermedad avanzada, son francamente insuficientes, con lo que se impone la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas más esperanzadoras.

En este sentido, la inmunoterapia o terapia biológica del cáncer es la cuarta modalidad de tratamiento de las neoplasias malignas, completando las tres clásicas (cirugía, radioterapia y quimioterapia). Esta terapia es muy prometedora y a partir ella se están desarrollando nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer (4).

Papel primordial en la respuesta inmunitaria antitumoral es el que se atribuye a las células citotóxicas espontáneas (*natural killer: NK*), subpoblación linfocitaria diferenciada de linfocitos T y B que expresa en superficie antígenos CD56, CD 57, CD16 y FcR, representan el 1-3% de todas las células mononucleadas, forman parte de la defensa antitumoral innata, no requieren inmunización previa para actuar y no tienen capacidad de memoria. Es decir, juegan un papel fundamental en la defensa antitumoral al estar dotadas de la capacidad de reconocer y lisar, en un proceso espontáneo e independiente de anticuerpos, células neoplásicas o infectadas por virus. La regulación de la activación de esta estirpe linfocitaria está determinada fundamentalmente por distintas citocinas, entre las que juegan un papel especialmente importante las interleucinas 2 (IL-2) y 12 (4,5).

La IL-12 ha demostrado tener un potente efecto antitumoral en modelos animales de melanoma, sarcoma, cáncer de riñón, de pulmón, de colon y de ovario (6-11). En modelos de cáncer de colon, ovario, pulmón, riñón y melanoma, la IL-12 ha demostrado ser más efectiva y/o menos tóxica que la IL-2 (6,7,9,12,13). Más aún, una combi-

nación de IL-2 e IL-12 fue más efectiva que cada citocina sola en modelos de cáncer renal primario o metastásico (14). Estos resultados sugieren que las células T CD4 y CD8 pueden intervenir conjuntamente en la inhibición del crecimiento tumoral tras un tratamiento con IL-12. Las células T, sin embargo, no parecen ser las únicas responsables del efecto antitumoral de la IL-12; de hecho, las células NK han sido implicadas como efectores antitumorales durante el tratamiento de la IL-12 para algunos tumores (8,15,16). En este sentido, estudios previos realizados por nuestro grupo han demostrado la relación entre el infiltrado intratumoral de células NK y la supervivencia en cáncer de colon humano en estadio III (17).

Por tanto en base a la conocida capacidad de la IL-12 de estimular la proliferación y actividad antineoplásica de las células NK pensamos que su administración sistémica condicionará el aumento de dichas células en los infiltrados linfoides intratumorales, efecto que presumiblemente se verá potenciado mediante la administración combinada con IL-2 dado su aparente sinergismo. Este fenómeno podría, a su vez, conducir a la regresión parcial o total de los carcinomas colorrectales.

Así, nos propusimos el estudio del efecto de la administración de IL-12 sola o combinada con IL-2 en tumores colorrectales mediante la administración de 1,2-dimetilhidracina (DMH), modelo experimental bien consolidado, y en el que se obtienen tumores de gran semejanza con el CCR humano tanto desde un punto de vista macroscópico, microscópico como en cuanto a su comportamiento clínico (18). Por ello nos marcamos dos objetivos, uno inicial de desarrollo y puesta a punto del modelo experimental de inducción tumoral, y otro final de evaluar la acción de estas dos interleucinas en los infiltrados intratumorales de células NK, así como sus posibles efectos sobre el comportamiento biológico de estos tumores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado 65 ratas Wistar de 6 semanas, seleccionadas con pesos entre 200 y 250 g, sin tratamiento previo alguno. Se les administró en inyección subcutánea una dosis semanal de DMH a razón de 20 mg/kg de peso durante 26 semanas. La preparación de la solución carcinogénica fue: 400 mg de DMH se disuelven en 100 ml de agua bidestilada conteniendo 37 mg de EDTA disódico (solución 0,001 M de EDTA) y ajustada a un pH de 6,5 usando hidróxido sódico (NaOH 1%). La solución se preparó, semanalmente, inmediatamente antes de ser administrada. Finalizado el periodo de inducción, los animales se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos con una distribución equitativa de los pesos, a fin de que las muestras fueran lo más homogéneas posibles, permaneciendo bajo condiciones estándar de estabulación, con una dieta rica en carbohidratos y grasa y pobre en fibra y calcio. El grupo I es el grupo control al

que se administró disolvente (solución filtrada de fosfato salino -PBS-, pH 7,4, que contenía 0,1% de albúmina sérica bovina -BSA- a una concentración no menor que 1 mg/ml) mediante inyección diaria, vía intraperitoneal, durante 5 días a la semana, por dos semanas consecutivas (semanas 28 y 29). Al grupo II (IL-12): se administró interleucina-12 recombinante murina a razón de 1 mg/día vía intraperitoneal, durante 5 días a la semana, por dos semanas consecutivas (semanas 28 y 29). A ningún animal perteneciente a los grupos I y II se les practicó tratamiento alguno antes de la semana 28. Al grupo III (IL-12 + IL-2): se administró interleucina-12 recombinante murina a razón de 0,5 mg/día vía intraperitoneal, durante 5 días a la semana, por dos semanas consecutivas (semanas 28 y 29). Estos mismos animales recibieron pulsos semanales de interleucina-2 recombinante humana a razón de 300.000 UI, dos veces al día, por vía intraperitoneal en el día 1º de las semanas 27, 28 y 29. Las ratas se sacrificaron en la semana 30 contando desde el inicio de la administración de DMH procediéndose a continuación a la realización sistemática de la necropsia del animal (la necropsia se hizo al sacrificio, en caso de muerte espontánea se excluyó del estudio). Se extirparon todas las vísceras abdominales en busca de tumores y el tracto digestivo (de esófago a recto) se abrió longitudinalmente, examinándose y estudiándose los siguientes parámetros en cada animal: número y localización de tumores, tamaño de los tumores, y carga tumoral (volumen tumoral total $\sum V_T = \sum [V_i \pi R^3]$). Todas las muestras fueron fijadas por inmersión en formol 10%. El estudio histopatológico se realiza usando técnicas rutinarias en condiciones uniformes de fijación e inclusión en parafina y teñido en secciones de 6 mm con hematoxilina y eosina. Todas las lesiones fueron examinadas por un patólogo y las malignas fueron confirmadas en todos los casos por otro patólogo. En todas las muestras tumorales se realizó inmunotinción para células NK con anticuerpo monoclonal CD 57. El conteo de estas células fue realizado por dos patólogos en observaciones independientes, contando el número de células CD 57 + intratumorales, en 50 campos de gran aumento. Se establecieron tres grupos según la cuantía del infiltrado: leve, menos 50 células/50 campos de gran aumento (CGA), moderado, entre 50 y 150/células/50 CGA y elevado, más de 150 células/50 CGA.

En los casos de no coincidencia entre los dos observadores fue necesaria la intervención de un tercer observador recogiendo el valor en el que había dos coincidencias.

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS v11.0. Las variables categóricas se expresan como frecuencias relativas y para las cuantitativas, como medida de tendencia central, la media y de dispersión la desviación estándar (DS). Para la comparación entre grupos se utilizó la U de Mann Whitney, por vulnerar el supuesto de normalidad. Como mínimo nivel de significación se consideró $p < 0,05$.

RESULTADOS

Supervivencia

Durante las 26 semanas de inducción tumoral fallecieron 35 ratas lo que indica una mortalidad del 53%. Esta no siguió un curso lineal, siendo tan sólo del 15% las primeras 16 semanas y del 54% las siguientes 10 semanas hasta finalizar la inducción.

Durante las 2 semanas de tratamiento fallecieron 2 ratas, ambas del grupo II (IL-12), finalizando así el estudio 28 animales a los que les fue realizada la necropsia.

Tumores obtenidos (Tabla I)

En el grupo I (control) se hallaron en total 29 tumores, repartidos en todas las ratas que completaron el estudio (100%), de forma que en 4 de ellas sólo se encontró un tumor, en 5 se encontraron de 2 a 4 tumores y en una 11 microcarcinomas rectales. En cuanto al tipo histológico, la mayoría fueron adenocarcinomas de colon distal o de recto (86%) (Fig. 1 a y b) y tan sólo se encontraron 3 (10%) adenocarcinomas de intestino delgado, un adenocarcinoma de colon proximal (3%) y una metástasis hepática. Respecto a la extensión de los tumores el 10% eran T1, el 65% eran T2, el 10% eran T3 y el 13% T4, estando bien diferenciados el 41%, moderadamente diferenciados el 13% y pobremente diferenciados el 44%.

En el grupo II (IL-12), de las 8 ratas que completaron el estudio, 2 no tenían tumor (25%) y tan sólo una de las 6 restantes tuvo 3 tumores, hallándose en total 8 tumores, de los cuales 2 (25%) eran adenocarcinomas de colon distal o recto, 4 (50%) adenocarcinomas de intestino delgado; un adenocarcinoma gástrico (12%) y un mesotelioma pleural (12%). Una de las ratas presentó metástasis hepáticas (12%) y otra tuvo adenopatías mediastínicas e implantes mesentéricos. De los 7 tumores del tracto digestivo, 4 se encontraban en un estadio T3 (57%); 1 en T1 (14%) y 2 en T4 (28%), siendo bien diferenciados 3 de ellos (43%), moderadamente diferenciado 1 (14%) y otros 3 pobremente diferenciados.

En el grupo III (IL-2 + IL-12) todas las ratas desarrollaron tumores (100%), siendo múltiples en 7 de ellas, haciendo un total de 23 masas tumorales, de las cuales 8 (35%) fueron adenocarcinomas de colon distal o recto, 9 (39%) adenocarcinomas de intestino delgado; 5 (22%) adenocarcinomas de colon proximal y 1 (4%) carcinoma epidermoide de conducto auditivo externo. Dos animales (20%) tuvieron metástasis ganglionares regionales. En cuanto a la infiltración de los tumores el 18% eran T1, el 27% eran T2, el 50% eran T3 y el 4% T4, estando bien diferenciados un 54%, moderadamente diferenciados un 23% y pobremente diferenciados el 23%.

Como se puede observar (Tabla II), el grupo II fue el que presentó un número menor de tumores con una media de 1 tumor por cada rata (DS = 0,9), siendo de 2,9 (DS = 3)

Tabla I

		Tratamiento			Total
		I (Control)	II (IL-12)	III (IL-2 + IL-12)	
Presencia de tumor	No		2 (25%)		2 (7,1%)
	Sí	10 (100%)	6 (75%)	10 (100%)	26 (92,9)
Tipo histológico	Adenocarcinoma gástrico		1 (12,5%)		1 (1,7%)
	Adenocarcinoma intestino delgado	3 (10,3%)	4 (50,0%)	9 (39,1%)	16 (26,7%)
	Adenocarcinoma colon proximal	1 (3,4%)		5 (21,7%)	6 (10%)
	Adenocarcinoma colon distal-recto	25 (86,2%)	2 (25%)	8 (34,8%)	35 (58,3%)
	Mesotelioma pleural		1 (12,5%)		1 (1,7%)
Total	Carcinoma epidermoide			1 (4,3%)	1 (1,7%)
		29 (100%)	8 (100%)	23 (100%)	60 (100%)
Grado diferenciación	Bien diferenciado	12 (41,4%)	3 (42,9%)	12 (54,5%)	27 (46,6%)
	Moderadamente diferenciado	4 (13,8%)	1 (14,3%)	5 (22,7%)	10 (17,2%)
	Pobremente diferenciado	13 (44,8%)	3 (42,9%)	5 (22,7%)	21 (36,2%)
Infiltración	T1	3 (10,3%)	1 (14,3%)	4 (18,2%)	8 (13,8%)
	T2	19 (65,5%)		6 (27,3%)	25 (43,1%)
	T3	3 (10,3%)	4 (57,1%)	11 (50%)	18 (31%)
	T4	4 (13,8%)	2 (28,6%)	1 (4,5%)	7 (12,1%)
Adenopatías/implantes peritoneales	No	10 (100%)	7 (87,5%)	8 (80%)	25 (89,3%)
	Sí		1 (12,5%)	2 (20%)	3 (10,7%)
Metástasis hepáticas	No	9 (90%)	7 (87,5%)	10 (100%)	26 (92,9%)
	Sí	1 (10%)	1 (12,5%)		2 (7,1%)

Tabla II

		Tratamiento			Total
		I (Control)	II (IL-12)	III (IL-2 + IL-12)	
Número de tumores*	Media (SD)	2,90 (3,07)	1 (0,92)	2,30 (1,33)	
Tamaño tumor mayor (cm)	Media (SD)	0,89 (0,72)	0,8 (0,62)	1,05 (0,79)	
Carga tumoral (cm ³)	Media (SD)	0,78 (1,16)	0,5 (0,74)	1,15 (2,16)	

SD: desviación estándar.

*Diferencias estadísticamente significativas: (Control) vs. (IL-12) p = 0,028 (IL-12) vs. (IL-12 + IL-2) p = 0,019

para el grupo I (p = 0,028) y de 2,3 (DS = 1,3) para el grupo III (p = 0,019). También este grupo tuvo una menor media del tamaño del tumor mayor, siendo de 0,8 cm (DS = 0,6) frente a los 0,9 cm (DS=0,7) del grupo I y a 1 cm (DS = 0,8) del grupo III, diferencias que no fueron estadísticamente significativas. En cuanto a la carga tumoral tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, aunque de nuevo fueron menores para el grupo II, que presentó una media de 0,5 cm³ (DS = 0,7) frente a los 0,8 cm³ (DS = 1,2) del grupo I y a los 1,2 cm³ (DS = 2) del grupo III.

Infiltración por células NK (Tabla III)

Sólo un 10% de las ratas del grupo I presentó moderada o extensa infiltración, frente al 60% del grupo II (p = 0,077)

Tabla III. Infiltración por células NK

	Grupo I (control)	Grupo II (IL-12)	Grupo III (IL-2 + IL-12)
Escasa	9 (90%)	2 (40%)	3 (30%)
Moderada	1 (10%)	2 (40%)	5 (50%)
Extensa		1 (20%)	2 (20%)

(40% moderada y 20% extensa) y al 70% del grupo III (p = 0,02) (50% moderada y 20% extensa). Entre los grupos II y III no se encontró ninguna diferencia estadística (p = 1) (Fig. 1 c-f).

DISCUSIÓN

El modelo de inducción mediante inyección subcutánea de DMH, es un modelo ampliamente conocido y experimentado (19,20) obteniéndose tumores similares a los carcinomas colorrectales humanos (18). La mayoría de autores coinciden en que una dosis de 20 mg/kg de peso inyectada semanalmente durante 26 semanas produce un alta incidencia de adenocarcinomas en el colon distal (18,19,21-24), sin embargo y aunque en estos modelos se obtenía una alta incidencia de tumores, esta pocas veces era del 100% (25), proponiéndose varias modificaciones a estos modelos para facilitar la carcinogénesis, como ha sido la adición de 5-FU (26) o complejas modificaciones quirúrgicas (25). En nuestro caso optamos por la inyección subcutánea a la dosis de 20 mg/kg de peso, pero añadiendo una dieta pobre en fibra,

de elevado contenido en grasa e hidrato de carbono y basado en los estudios recientes (27) que establecían un papel inhibitor del calcio de la dieta en la carcinogénesis utilizamos una dieta pobre en calcio. Comenzamos en una fase previa la inducción tumoral en una serie de 30 animales obteniéndose tumores en todos los animales que completaron las 26 semanas de inducción (28). En dicho estudio se observó una alta tasa de mortalidad similar a la que se deduce de los resultados de otros estudios (22), sin embargo esta tasa de mortalidad es muy inferior (23,27) o bien, aunque se reseña, no viene numéricamente expresada (21,25). Con estos resultados, dispares, comenzamos el estudio inicial con 65 ratas de las que fallecieron sin concluir la inducción 35 (53%), fundamentalmente en la segunda mitad del proceso de inducción tumoral, lo que es atribuible en nuestra opinión a la alta toxicidad del producto. En los animales que concluyeron el proceso se obtuvieron, como era de esperar, un 100% de tumores en el grupo control, lo que confirmaba, la alta seguridad del modelo. No obstante, la elevada tasa de mortalidad observada, ha de ser tenida en cuenta a la hora de establecer la predeterminación de la muestra para estudios posteriores.

En los resultados obtenidos con la administración de IL-12, hemos observado una menor incidencia de tumores respecto al grupo control, con diferencias estadísticamente significativas. También se obtuvo una menor masa tumoral y menor tamaño de los tumores si bien con diferencias no estadísticamente significativas. Todo ello se asoció a una mayor presencia de células NK en el infiltrado inflamatorio intratumoral de este grupo de animales (grupo II), con diferencias estadísticas claramente significativas. Esta asociación entre mayor infiltrado intratumoral de células NK y mejor comportamiento de los tumores en el grupo de animales tratados con IL-12 está en concordancia con el pronóstico favorable que se atribuye a estos infiltrados celulares descritos en recientes trabajos en cáncer gástrico (29) o en tumores pulmonares (30,31) y los publicados por nuestro propio grupo en cáncer de colon (17) y puede ser atribuido al efecto estimulante que la IL-12 tiene sobre las células NK a las dosis usadas.

Sin embargo, los resultados, cuando se asocia la IL-12 a la IL-2 son aparentemente contradictorios, ya que no hemos obtenido los resultados que cabría esperar, tanto sobre el número de tumores como la masa tumoral o el tamaño tumoral, donde no observamos diferencias significativas respecto al grupo control, todo ello pese a la existencia de un incremento general en los infiltrados de células NK. En nuestra opinión estos resultados pueden ser atribuidos a la dosis utilizada de IL-12, pues esta dosis fue reducida a la mitad en el grupo III al objeto de evitar una posible mayor toxicidad, al asociar la IL-2, también existe la posibilidad de que la efectividad de la combinación de IL-2 e IL-12 descrita en otros tumores (14) no sea efectiva en el CCR, de naturaleza e histogénesis diferente. Estas hipótesis habrían de ser confirmadas en posteriores estudios experimentales y farmacológicos a la búsqueda de una dosis óptima, ya que la hipótesis de una actividad potenciada de la IL-12 con la adición de IL-2, sigue siendo atractiva no sólo por lo ya expuesto con anterioridad sino también por recientes estudios (32,33), que abren nuevos caminos de selección de pacientes para estos tratamientos, en los que además se deberán tener en cuenta no sólo la presencia de células NK en los infiltrados intratumorales, sino también la propia actividad antineoplásica *in vitro* de estas células (34,35).

Por tanto, pensamos que el modelo usado de inducción tumoral es un modelo útil para el estudio de la eficacia que distintos tratamientos, como el utilizado por nosotros, tienen sobre el cáncer intestinal. Respecto a ello, creemos que la IL-12 puede tener un efecto antineoplásico frente al desarrollo de tumores, lo que puede ser atribuido, al menos en parte, al estímulo ejercido por esta citocina sobre los infiltrados intratumorales de células NK. No obstante opinamos que han de realizarse nuevos estudios en los que se incluyan como parámetros a analizar, no sólo la cuantía de los infiltrados de células NK, sino también la actividad antitumoral de estas células, así como otros estudios tendentes a optimizar la dosis IL-12/IL-2, para obtener una respuesta antineoplásica más eficaz.