

Determinación de interleucina-10 (IL-10) en pacientes con cáncer en estadios III y IV tratados con dexametasona

Determination Of Interleukine-10 In Cancer Patients In Stages Iii And Iv Treated With Dexamethasone.

Heber Siachoque*, Milciades Ibáñez†, Lilian Chuairé‡, Olga García§, Angie Guzmán**, Luis Flórez††

Resumen

La utilización de la dexametasona está asociada con la supresión de la respuesta inmune en pacientes con cáncer en estadios III y IV, debido posiblemente a una acción inhibitoria sobre las células dendríticas presentadoras de antígenos. Bajo la acción de la dexametasona, las células dendríticas secretan niveles muy bajos de IL-10, lo que a su vez disminuye, tanto la respuesta mediada por los linfocitos Th2 como la inducida por las células NK. La IL-10 tiene pues un efecto dual, si se tiene en cuenta que, en la mayoría de los modelos experimentales, aumenta en pacientes tratados con glucocorticoides tipo dexametasona e inhibe la respuesta mediada por los linfocitos Th1, con una consecuente exacerbación del proceso. **Metodología:** Se utilizó la prueba de ELISA para determinar IL-10 en pacientes con diferentes tipos de tumor en estadios III y IV, sometidos a quimioterapia y tratados con dexametasona-metoclopramida como antiemético y en un grupo control de personas sanas. **Resultados:** En este modelo experimental, todos los pacientes con cáncer en estadios III y IV presentaron niveles séricos de IL-10 muy bajos, comparados con los del grupo control. Además, IL-10 no aumentó su concentración en los

pacientes tratados con dexametasona. **Conclusión:** IL-10 no provoca anergia de las células dendríticas ni disminución de la respuesta citotóxica mediada por Th1. Por tanto, se sospecha que es la dexametasona y no la IL-10 la responsable de la supresión en la respuesta inmune en pacientes con cáncer en estadios III y IV, lo que podrá ser demostrado en posteriores estudios que complementen los resultados obtenidos.

Palabras clave: interleucina-10, neoplasmas, glucocorticoides, dexametasona, inmunosupresión, células dendríticas.

Recibido: agosto de 2005

Aceptado: agosto de 2005

* MsC, coordinador de la Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá D.C., Colombia. Correo electrónico: hever.siachoque@urosario.edu.co

† MsC, profesor Unidad de Epidemiología, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá D.C., Colombia. Correo electrónico: mippalad@yahoo.com

‡ BSc MsC, profesora principal, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá D.C., Colombia. Correo electrónico: lchuairé@urosario.edu.co

§ Estudiante de medicina, Universidad del Rosario, Bogotá D.C., Colombia. Bacterióloga, Centro de diagnóstico clínico especializado Tecnicianálisis, Bogotá D.C., Colombia.

** Bacterióloga, Centro de diagnóstico clínico especializado Tecnicianálisis, Bogotá D.C., Colombia.

†† MD, director Centro de Investigaciones Oncológicas (CIO), Bogotá D.C., Colombia.

ABSTRACT

Dexamethasone treatment in patients with cancer in stages III and IV is associated with immune response suppression, possibly because of the inhibiting effect produced by antigen presenting dendritic cells. Under dexamethasone action, dendritic cells secrete very low levels of IL-10 that not only diminish the Th2 lymphocyte response but also the one induced by NK cells. In most of experimental models, IL-10 levels increase when patients have been previously treated with dexamethasone, which inhibits the Th1 lymphocytes response and produces worsening of the process. **Methodology:** ELISA test was used to determine IL-10 in patients with different tumors in stages III and IV treated

with chemotherapy and dexamethasone-metoclopramide and in healthy controls. **Results:** In the experimental model, all patients with cancer in stages III and IV exhibited very low levels of IL-10, compared to those of the control group. In addition, IL-10 concentration did not increase in patients treated with dexamethasone. Our results show that IL-10 does not produce dendritic cells anergy nor cytotoxic response mediated by Th1 lymphocytes. **Conclusion:** it is possible that immune response suppression in this type of patients is the result of dexamethasone and not of IL-10 effect.

Key words: Interleukin-10, neoplasms, glucocorticoids, dexamethasone, immunosuppression, dendritic cells.

INTRODUCCIÓN

La interleucina-10 (IL-10) es una citocina inmunoreguladora producida por los linfocitos T ayudadores (LTh), principalmente por los del fenotipo Th2, así como también por las células presentadoras de antígeno (CPA), cuando son estimuladas por patógenos bacterianos (1-3).

La IL-10 ejerce una potente actividad inmunosupresora, debida tanto a una regulación negativa sobre los monocitos, como a una inducción de anergia sobre los linfocitos Th1 (2, 3). Sobre las CPA, la IL-10 provoca una notoria disminución de las moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor tipo II (MHC-II), de modo que evita la activación consecuente de los linfocitos (LTh1) y, por tanto, también la secreción de interleucina-2 (IL-2) y de interferón- α (IFN- α). La IL-10 produce además disminución de la respuesta inmune de los linfocitos T citotóxicos (LTcx) contra las células tumorales, porque también suprime la expresión de las moléculas de histocompatibilidad mayor tipo I (MHC-I) en las CPA (3, 4).

En el marco de la progresión del cáncer, la IL-10 inhibe la respuesta antitumoral, debido a que impide la presentación de antígenos de las células propias transformadas a los linfocitos T citotóxicos (LTcx) (3, 5). No obstante, la IL-10 puede ejercer el efecto antitumoral mediante otros mecanismos tales como la activación de las células asesinas naturales (NK), los linfocitos T, los macrófagos y el óxido nítrico (NO). En los macrófagos activados, el efecto sinérgico de INF-g e TNF- α induce un aumento en su capacidad citotóxica contra tumores y microorganismos, pues estimula la expresión de NO.

Por otra parte, la IL-10 aumenta la susceptibilidad de las células blanco hacia las NK de modo que, en virtud de la disminución de la expresión de MHC-II, pueden ser lisadas con mayor facilidad (6). Diversos estudios efectuados en murinos indican que los niveles bajos de expresión de IL-10 aumentan el riesgo de cáncer y que, por el contrario, el incremento en la expresión de IL-10 ejerce un papel protector y preventivo al menos para algunos tipos de tu-

mores, tales como el melanoma maligno cutáneo, el cáncer de mama y el cáncer de próstata, entre otros (3, 6). Algunos investigadores han recomendado la administración terapéutica de IL-10, en razón de la correlación observada entre el aumento en su expresión con la inhibición de las metástasis y con un pronóstico favorable.

Por lo general, cuando se aplica quimioterapia en pacientes con algún tipo de tumor, se producen efectos adversos como la emesis aguda. Esta es inducida en especial por antraciclinas, ciclofosfamida y carboplatino (7). El glucocorticoide dexametasona, en conjunto con la metoclopramida y el ondasetron, ha sido utilizado en la prevención del efecto emético secundario, mediante administración previa a la quimioterapia (7). Debido a su potente efecto antiinflamatorio e inmunosupresor, la dexametasona puede afectar también la respuesta inmune antitumoral, pues suprime la síntesis de varias citoquinas como IL-12 e IL-10 (8, 9). Su efecto bifásico sobre la IL-10 produce estimulación a bajas dosis e inhibición a altas dosis.

En el presente estudio se efectuó la determinación de IL-10 en pacientes con diferentes tipos de tumor en estadios III y IV, sometidos a quimioterapia y tratados con dexametasona-metoclopramida como antiemético.

MATERIALES Y MÉTODOS

La determinación de IL-10 se efectuó en un grupo de 29 personas de ambos sexos (65% mujeres y 35% hombres), con edades entre los 24 y 77 años, con patologías tumorales clasificadas en estadios III y IV. Los pacientes, usuarios del Centro de Investigaciones Oncológicas (CIO), en el año 2002, fueron previamente tratados con quimioterapia convencional y con dexametasona-metoclopramida.

Como grupo control fueron seleccionadas 20 personas sanas del Dispensario de la Fuerza

Aérea Colombiana (FAC) de la ciudad de Bogotá D.C., sin antecedentes de neoplasia y con un cuadro hemático normal.

Previo firma del consentimiento informado, y con el fin de efectuar la medición de IL-10 sérico de cada persona analizada –tanto del grupo experimental como del control– se obtuvo una muestra de sangre venosa periférica (10 cc) en ayunas.

Cuantificación de IL-10 por Elisa

Con el fin de obtener el suero, las muestras de los pacientes con cáncer y las de los sujetos del grupo control fueron sometidas a centrifugación. La medición de IL-10 se efectuó mediante la utilización del kit ICN Kine Plus human IL-10, consistente en un enzimo-inmunoensayo (EIA) de tipo competitivo, donde la IL-10 biotinilada y la IL-10 contenida en la muestra o en el estándar compiten por los sitios de unión específicos de los anticuerpos anti-IL-10, de tal manera que si la concentración de la muestra es alta, la cantidad de IL-10 biotinilada capturada por los anticuerpos es baja. Mediante adición de fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina (que se une sólo a la IL-10 biotinilada) y de cromógeno, es posible detectar y medir la IL-10 biotinilada. Por tanto, la densidad óptica (DO) correspondiente es inversamente proporcional a la cantidad de IL-10 contenida en la muestra.

En papel semilogarítmico se elaboró la curva de calibración con los valores de las concentraciones de los estándares (200,00; 50,00; 12,50; 3,13; 0,78; 0,19 pg/ml) en el eje X y las correspondientes densidades ópticas (DO) en el eje Y. La curva mostró un modelo sigmoide, que indica una relación inversa entre la concentración de IL-10 y la DO. La concentración de IL-10 en los sueros de los pacientes con algún tipo de tumor, así como la de los sueros del grupo con-

trol, fue determinada mediante interpolación de las absorbancias en la gráfica.

Con los resultados obtenidos, la información fue sistematizada en una base de datos y sometida a análisis estadístico en programa SPSS versión 12 (Licencia Universidad del Rosario).

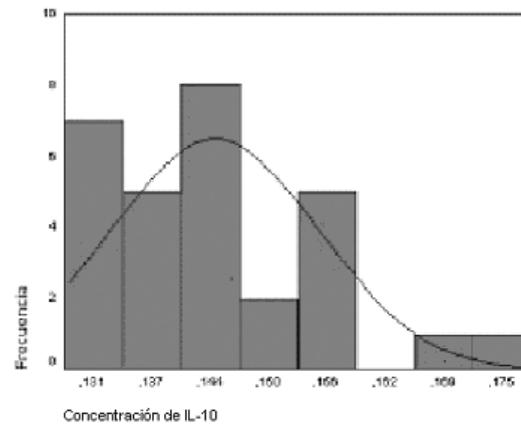
RESULTADOS

La población de estudio fue de 50 individuos, 29 de ellos pacientes con diferentes tipos de cáncer: mama (n=7), gástrico (n=6), colon (n=6), recto (n=4), ovario (n=2) y cuello uterino, próstata, teratoma testicular, con un caso cada uno. En el estadio III de la enfermedad se encontraba el 72,4% y en el estadio IV el 27,6% de la población. La determinación de los estadios se efectúa de acuerdo con la clasificación establecida por UICC TNM Classification of Malignant

Tumors (11). El grupo control de sujetos sanos estuvo constituido por 20 pacientes.

Con el objeto de establecer los valores de referencia para la concentración de IL-10, se tomaron los valores del grupo control con el promedio \pm dos desviaciones estándar (IC: 0,07943, 0,27500). La concentración de IL-10 en los pacientes con cáncer mostró una distribución de tipo normal ($P=0,693$, K-S exacta), con un valor mínimo de absorbancia de 0,129, uno máximo de 0,173 y un promedio \pm desviación estándar de 0,14424 \pm 0,0111. Se observó un ligero sesgo o asimetría hacia la derecha (coeficiente de asimetría = 0,796) donde el valor máximo de absorbancia de IL-10 (0,173) de los pacientes enfermos está muy por debajo del valor de referencia (0,27500). Esto demuestra que los valores de IL-10 obtenidos en los pacientes con cáncer se encuentran dentro del rango normal.

Figura 1. Distribución de IL-10 en pacientes con cáncer



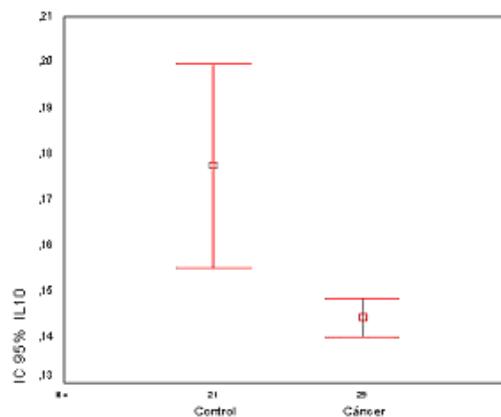
El promedio de concentración de IL-10 en el grupo de pacientes con cáncer fue significativamente menor (0,14424 \pm 0,0111) comparado con el grupo control (0,17743 \pm 0,0490). Esta diferencia fue altamente significativa entre los dos grupos, con un valor de $p=0,006$ (T-Student para varianzas heterogéneas).

Cuadro 1. Medida descriptiva de la distribución de IL-10 en los grupos de pacientes con cáncer y grupo control

	N	Promedio	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	21	0,17743	4,9022E-02	1,0697E-02	0,15511	0,19974	0,133	0,297
Cáncer	29	0,14424	1,1115E-02	2,0640E-03	0,14001	0,14847	0,129	0,173
Total	50	0,15818	3,6404E-02	5,1483E-03	0,14783	0,16853	0,129	0,297

La concentración de IL-10 en los pacientes con cáncer fue $0,14424 \pm 0,011$, con una pequeña variación y con tendencia a disminuir, si se la compara con la obtenida en el grupo control, de $0,17743 \pm 0,049$

Figura 2. Comparación de las concentraciones de IL-10 en el grupo de pacientes con cáncer y en el grupo control.



Los valores obtenidos del grupo de pacientes con cáncer se encuentran en un rango de 0,14 a 0,15 de absorbancia, por debajo del valor de referencia 0,2750. Mientras que el valor de referencia determina el punto de corte, todo resultado que se encuentre por debajo de éste es considerado como nivel basal. El grupo de pacientes control, si bien se encuentra dentro del rango, presenta valores superiores, comparados con el grupo de pacientes con cáncer. La explicación de los resultados obtenidos puede residir en el efecto inhibitor que ejerce la dexametasona sobre la síntesis de IL-10.

DISCUSIÓN

En pacientes con cáncer, la utilización de glucocorticoides como la dexametasona puede provocar inmunosupresión (8, 9), tal como lo demuestra la obtención de niveles basales de IL-10, por debajo del valor de referencia. Por otra parte, la exacerbación del proceso tumoral podría –como lo demuestran estudios previos– (11) ocurrir como consecuencia de una disminución de la actividad de las células dendríticas, ocasionada a su vez por la unión de los glucocorticoides con ligandos específicos presentes en su membrana.

Las células dendríticas inmaduras pierden su capacidad de diferenciación cuando disminuye la expresión de CD1a, lo que a su vez inhibe la presentación de antígenos de tipo lipídico. Además, la expresión de CD86 y de CD83 se reduce, lo que provoca disminución de la actividad de los linfocitos T (11).

La acción de la dexametasona sobre las células dendríticas inhibe la síntesis de IL-12, IL-6 y de IL-18 y, por tanto, también la activación de los linfocitos Th1, cruciales en el control de la respuesta citotóxica (7, 10). Este efecto inhibitorio se debe en gran parte a que los linfocitos Th1 no pueden ser estimulados por las citoquinas liberadas por las células dendríticas y, como consecuencia, no liberan INF-g e IL-2, importantes en la activación y proliferación de las células citotóxicas (12).

El aumento en la actividad metastásica puede ser explicado si se considera que hay una disminución en la expresión de moléculas MHC-I y MHC-II por parte de las células dendríticas, lo que genera una disminución en la presentación de antígenos tumorales (3, 4). Debido a que la ausencia de presentación antigénica limita la actividad de los linfocitos T citotóxicos, la acción de los glucocorticoides tipo dexametasona puede tener un efecto letal sobre el organismo (8, 9). En algunos modelos experimentales *in vitro* que

utilizan monocitos humanos expuestos a dexametasona, ha sido demostrada una sobreexpresión en la síntesis de IL-10 (13), de modo que ésta se halla considerablemente aumentada, por encima de los niveles basales. Este hecho es la causa más importante de supresión de la respuesta inmune, donde cabe la posibilidad de que el efecto amplificador esté mediado por un aumento en la síntesis de IL-6 (14).

En este modelo experimental, la concentración de IL-10 en los pacientes tratados con dexametasona estuvo muy por debajo de los niveles basales, lo que indica que no se le puede atribuir el origen de la inmunosupresión o de la falta de respuesta.

En algunos modelos experimentales que utilizan glucocorticoides tipo dexametasona ha sido reportado tanto un incremento en la síntesis de IL-10 por parte de los linfocitos Th2, como una disminución en la actividad citotóxica (14).

La caída en la actividad citotóxica ocurre como consecuencia de la acción citostática de la IL-10 sobre las células dendríticas y los macrófagos, de modo tal que en éstos no se pueden secretar citoquinas inductoras de la activación de Th1, como es el caso de las interleucinas IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 e IFN g (12).

Los resultados del presente estudio muestran niveles de IL-10 disminuidos, en contraposición con los resultados obtenidos en otros modelos experimentales (5). Así, en los pacientes con cáncer, los niveles de IL-10 estuvieron dentro del rango normal, de modo similar a los hallados en el grupo control de personas sanas examinadas. Es posible que la dexametasona haya interferido en la respuesta antitumoral ejercida por IL-10, mediante la supresión de la activación de los LTcx, con la consecuente disminución en la destrucción de las células tumorales. La anterior afirmación podrá ser confirmada en

estudios mayores de tipo poblacional, que permitan validar estos resultados.

Una explicación plausible a los hechos enunciados debe tener en cuenta que la acción de la dexametasona sobre las células dendríticas genera una importante inhibición en la síntesis de citoquinas como IL-2, INF g, IL-4, IL6, IL-10, todas involucradas en la activación de los linfocitos Th (11). En consecuencia, la respuesta inmune –tanto celular como humoral– dismi-

nuye, lo que provoca inmunosupresión en los pacientes con cáncer en estadios III y IV.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Bibiana Santos, bacterióloga del laboratorio clínico de la Fuerza Aérea, a la Unidad de Quimioterapia del Centro de Investigaciones Oncológicas, y a la enfermera Shirley Giraldo, por la valiosa colaboración prestada en la ejecución del presente trabajo.

REFERENCIAS

1. Von Adrian UH, Mackay CR. T cell function and migration. Two sides of the same coin. *New Engl J Med* 2000;343:1020-1034.
2. Dumont FJ. IL-10-related cellular cytokines and their receptors: new targets for inflammation and cancer therapy. *Expert Opin Ther Patents* 2004;14:281-299.
3. Giordani L, Bruzzi P, Lasalandra C, Quaranta M et al. Association of Breast Cancer and Polymorphisms of Interleukin-10 and Tumor Necrosis. *Clin Chem* 2003;49:1664-1667.
4. Avalos MV Aguirre de, Quintana R, Brandan N. Citoquinas. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina, Cátedra de Bioquímica. 2002 [en línea]. Disponible en: <http://www.med.unne.edu.ar>
5. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 2004;114:1379-1388.
6. Stearns ME, Fudge K, Garcia F, Wang M. IL-10 inhibition of human prostate PC-3 ML cell metastases in SCID mice: IL-10 stimulation of TIMP-1 and inhibition of MMP-2/MMP-9 expression. *Invasion Metastasis* 1997;17:62-74.
7. Fushimi T, Okayama H, Seki T, Shimura S, Shirato K. Dexamethasone suppressed gene expression and production of interleukin-10 by human peripheral blood mononuclear cells and monocytes. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;112:13-18.
8. The Italian Group for Antiemetic Research. Randomized, Double-Blind, Dose-Finding Study of Dexamethasone in Preventing Acute Emesis Induced by Anthracyclines, Carboplatin, or Cyclophosphamide. *J Clin Oncol* 2004;22:725-729.
9. Furumoto K, Soares L, Engleman EG, Merad M. Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs. *J Clin Invest* 2004;113:774-783.
10. Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, Louis E et al. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2834-2839.
11. Mainali SE, Tew GJ, Hélice GP, Chávez R. Dexamethasone selectively inhibits differentiation of cord blood stem cell derived-dendritic cell (DC) precursors into immature DCs. *Cellular Immunol* 2004;232:127-136.
12. UICC TNM Classification of Malignant Tumors. International Union Against Cancer [en línea]. Disponible en: <http://www.uicc.org>

13. Stanilova SA, Karakolev ZT, Dimov GS, Dobрева ZG et al. High interleukin 12 and low interleukin 10 production after *in vitro* stimulation detected in sepsis survivors. *Intensive Care Med* 2005;31:401-407.
14. Duperrier K, Velten WF, Bohlender J, Demory A, Metharom P. Immunosuppressive agents mediate reduced allostimulatory properties of myeloid-derived dendritic cells despite induction of divergent molecular phenotypes. *Mol Immunol* 2005;42:1531-1540.
15. Mozo L, Suarez A, Gutierrez C. Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin Exp Allergy* 2004;34:328-331.