

EFECTO DE OLIGOELEMENTOS Y FOSFOLIPASAS EN EL TRATAMIENTO DE CARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES

ERNESTO CRESCENTI
MAXIMO CROCCI
ROSA BERGOC
ELENA RIVERA
ALBERTO CAMAGNI

Introducción

La presencia de la enfermedad neoplásica y sus metástasis en un organismo implica un estado inmunológico no reactivo o insuficientemente reactivo, previa, concomitante y posteriormente a la aparición de la patología.

Algunos autores sostienen que los antígenos tumorales circulantes forman inmunocomplejos con las IgG que de alguna manera inhiben la respuesta inmune^{5, 18, 19}. Otros consideran que las células atípicas no despiertan la adecuada respuesta antigénica por su similitud con los normales. Por ello los anticuerpos monoclonales, por ejemplo, no son eficaces cuando se administran unidos a quimioterápicos pues se producen reacciones cruzadas con los tejidos análogos al tumor. En el caso de los adenocarcinomas de células claras renales se destruyen los túbulos contorneados distales y proximales^{27, 31}.

La terapéutica combinada con elementos inmunostimulantes como es el caso de la Bestatina y citostáticos (quimio-inmunoterapia), ha resultado solo de valor relativo^{17, 24}. Así también, los estímulos inespecíficos con BCG y *Corynebacterium Parvum* en el tratamiento del melanoma han sido de escaso valor y no carentes de complicaciones^{4, 41, 47}. Ante estas limitaciones se hace necesario el desarrollo de un método eficiente de estímulo inmune teniendo como blanco los linfocitos T Helper para su estímulo o la eliminación de los T Suppressor. Se ha demostrado que esto último es capaz de aumentar la reacción injerto versus huésped de la sangre de pacientes normales y devolverle parcialmente esa capacidad perdida a los pacientes neoplásicos³⁴.

Siguiendo esta línea de trabajo numerosos autores han intentado estimular *in vitro* los linfocitos extraídos, ya sea de sangre periférica como de extractos de tumores, por medio de interleukinas (IL2, IL1, TNF alfa, interferon gamma, etc.) separados con variado éxito^{10, 13, 53}. Si bien en todos los casos se comprueba la efectividad *in vitro* de los métodos ensa-

yados, es difícil de demostrar la capacidad *in vivo* de los mismos. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que en el microambiente tumoral pueden existir elementos inhibitorios de la respuesta inmune que contrarrestan la acción de los leucocitos estimulados y reinyectados. Por ejemplo, se ha demostrado que los TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes) pueden ser predominantemente T Helper en sangre periférica y ganglios linfáticos del tumor pero T Suppressor en el seno del mismo⁴².

Ante este panorama y las dificultades técnicas inherentes a nuestro medio para lograr el perfeccionamiento de los métodos inmunostimulantes *in vitro*, encaramos la búsqueda de vías alternativas para obtener un estímulo inmune eficiente. Para ello, basándonos en experiencias previas, hemos trabajado con oligoelementos poco estudiados en su acción inmunostimulante "in vivo", como el Se (selenio), el Zn (zinc) y el Mn (manganeso).

El Se ha sido recomendado como preventivo de las enfermedades neoplásicas por su efecto antioxidante que contrarrestaría la acción de los carcinógenos²⁰. Incluso, algunos autores han demostrado para el Se un efecto selectivo sobre el metabolismo del AMPc (3'-5' adenosina monofosfato cíclico) en células neoplásicas, aumentando sus niveles intracelulares por disminución de la actividad de fosfodiesterasas específicas⁵⁴. Estos datos, junto con la propuesta acción de este oligoelemento como estimulante de la respuesta inmune, explicarían su actividad antineoplásica demostrada en estudios epidemiológicos^{26, 30}.

Por otra parte, el Zn tiene intervención en la síntesis de diversas proteínas séricas de transporte (albúmina, pre-albúmina, transferrina, etc.) cuya carencia puede alterar la respuesta inmune⁷. Es un hecho ampliamente demostrado la tendencia a una menor concentración de Zn en los tejidos de diversos tumores malignos^{21, 32}. Esto llevó a algunos autores a postular que la deficiencia de Zn puede estar asociada a la etiología del cáncer¹⁸.

También el Mn se encuentra entre los oligoelementos recomendados por la American Association como esencial en la administración parenteral a pacientes neoplásicos³⁸.

Son numerosos los trabajos de diversos autores que

Centro de Investigaciones y Tratamiento Médico, Urquiza 1164, Buenos Aires, Argentina.

citan los oligoelementos como adyuvantes o parte esencial de la terapéutica oncológica^{12, 18, 21, 40, 52}, especialmente en carcinomas de células pequeñas de pulmón asociados a quimio y radioterapia²².

Por otra parte son notorios los recientes intentos de aplicación de fosfolipasas en la terapéutica oncológica. Se sabe que la fosfolipasa A2 es la que posee mayor capacidad de provocar estímulo inmune sobre los linfocitos T probablemente a través de la lisofosfatidilcolina^{3, 51} o a través de la liberación de ácido araquidónico, el cual por acción de la ciclooxigenasa produce radicales libres que se cree son los responsables finales de la citolisis estimulada por interleukinas como el TNF alfa^{33, 37}. Prueba de esto es que se ha demostrado que las líneas celulares neoplásicas que resisten la lisis por TNF alfa, lo hacen a causa de que sintetizan una proteína inhibidora de la fosfolipasa A2³⁴. Otro dato que confirma lo antedicho es la capacidad para reducir o anular la citolisis provocada por el TNF alfa que tiene la dexametasona y la quinacrina que son inhibidores de la fosfolipasa A2³⁶.

Han sido sugeridas distintas acciones sobre mensajeros poco conocidos a nivel de neurosecreción y sobre péptidos neurohipofisarios⁴⁵.

El presente protocolo se implementó asociando ambas terapéuticas, es decir oligoelementos más fosfolipasas, con el objetivo de obtener un efecto sinérgico de dos terapéuticas distintas pero con el mismo blanco: el sistema inmune en su microambiente tumoral.

En nuestras preparaciones hemos empleado dosis mínimas, muy por debajo de las consideradas permitidas por el National Research Council de los EE.UU.³⁸ y en el caso de las fosfolipasas, dosis muy inferiores a las teóricas. En nuestra medicación ha primado el concepto de "acción catalítica" de los elementos administrados, sobre el concepto de reemplazo carencial o dosis masivas.

Materiales y Métodos

Inducción de los tumores

La inducción tumoral se efectuó mediante la administración por vía i.p. a ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley, de 3 dosis de 50 mg/kg. del carcinógeno químico N-Nitroso-N-metilurea (NMU).

La primera inyección se realizó a los 50 días de vida del animal, repitiéndose a los 80 y 110 días respectivamente. De este modo se obtiene una alta incidencia (95-100%) en el desarrollo de carcinomas mamarios, con un período latencia de 80 ± 17 días a partir de la 1ª dosis de NMU y un promedio de $5.3 + 1.6$ tumores/animal portador⁴⁶.

Protocolo de tratamiento

El tratamiento consistió en dos inyecciones diarias vía s.c. de una solución de Zn, Se y Mn (0,15 ug/100 g. de peso) y fosfolipasa A2 (10 ng/100 g de peso), fosfatidil inositol y fosfatidil colina en vehículo bufferizado.

Para realizar el presente estudio se trabajó con cuatro lotes de siete animales cada uno de acuerdo al siguiente esquema:

Lote 1: Control de desarrollo tumoral.

Animales con tres dosis del carcinógeno que fueron tratados diariamente con 0.10 ml. de solución fisiológica por vía s.c., a partir de la aparición de los tumores.

Lote 2: Tratamiento con medicación.

Animales con tres dosis de carcinógeno que fueron tratados diariamente con la medicación por vía subcutánea. El tratamiento se inició alrededor de los 45 días después de la tercer dosis de NMU, cuando los animales tuvieran al menos un tumor bien desarrollado.

Lote 3: Control de tratamiento

Animales que no recibieron carcinógeno y que fueron tratados diariamente con 1ml de medicación por vía subcutánea.

Lote 4: Control normal.

Animales que no recibieron NMU y sin ningún tipo de tratamiento.

Sobre los distintos lotes se realizaron los siguientes estudios:

- Control de desarrollo tumoral
- Control de evolución de los animales
- Tiempo de supervivencia
- Estudios histopatológicos
- Estudios inmunohistoquímicos

Control del crecimiento tumoral

Los animales se mantuvieron en grupos de cinco por jaula, con ciclos de 12 horas de luz y con agua y alimentos "ad libitum".

La aparición de los tumores se controló por palpación de las cadenas mamarias, a partir de la administración de la segunda dosis del carcinógeno. El tamaño de los tumores y su evolución se analizaron midiendo día por medio, los diámetros mayor y menor con un calibre. También se evaluaron las características macroscópicas de los mismos.

El peso corporal de los animales se controló tres veces por semana.

Estudios histopatológicos

Los tumores desarrollados en los distintos lotes de animales, fueron biopsiados en forma seriada durante el transcurso de la experiencia.

Las muestras fueron fijadas en formolbuffer al 10%, incluidas en parafina y coloreadas con Hematoxilina-eosina, Tricromico de Mason, reticulina, Alcian blue y Safranina para su posterior observación microscópica.

Por otra parte se evaluó el GNM (grado nuclear y mitótico), la respuesta de células inflamatorias, en especial linfocitos y macrófagos, el número y ubicación de los eosinófilos y la reacción fibrosa del estroma. Para evaluar la presencia y característica de los mastocitos en los preparados se utilizaron las coloraciones de May-Grunwald Giemsa, Alcian blue y Safranina.

Todos los animales fueron autopsiados en el momento del deceso.

Estudios inmunohistoquímicos

Juntamente con las biopsias quirúrgicas efectuadas para los estudios histopatológicos, un pequeño grupo de animales fue seleccionado para efectuar estudios inmunohistoquímicos. Para ello el material de biopsia fue procesado por congelación realizándose cortes en fresco, fijados en acetona y coloreadas con estreptavidina biotina. Se utilizaron los antiseros de los laboratorios Cedar Line de Hornby Ontario Canada:

- 1) Anti-rat "B" cell leucocyte common antigen CDR45, en dilución 1/1000³⁸.
- 2) Anti-rat "T" Helper monoclonal antigen CL003A (Homologue Human CD4) en dilución 1/100³⁴.
- 3) Anti-rat Citotoxic suppressor monoclonal antigen CL004A (Homologue Human CD8) en dilución 1/100^{38, 49}.

El objetivo de la marcación inmunohistoquímica fue la determinación de subpoblaciones de linfocitos "B", "T" Helper y "T" Suppressor en el seno de los tumores para comparar los casos tratados con los controles en busca de diferencias significativas entre ambos grupos.

Resultados

Crecimiento tumoral

Normalmente los tumores inducidos con NMU crecen en forma constante hasta la muerte del animal portador. Esto puede observarse en la figura 1 que representan el crecimiento los tumores de animales controles.

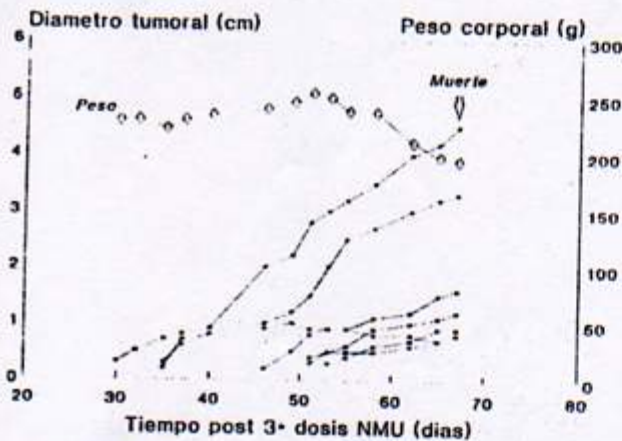


FIGURA 1: En el gráfico se muestra la evolución del tamaño de los tumores y del peso corporal de un animal representativo del Lote 1 control. El animal murió a los 68 días posteriores a la última inyección de NMU y alcanzó a desarrollar 7 carcinomas mamarios.

En los animales tratados se observa que a partir de los diez días de iniciado el tratamiento, la mayoría de los tumores detienen su crecimiento, estabilizándose. En algunos casos también se puede ver una lenta regresión en el tamaño. Estos resultados están representados en la figura

2 donde se muestra el crecimiento de los tumores en función del tiempo para los animales que recibieron tratamiento.

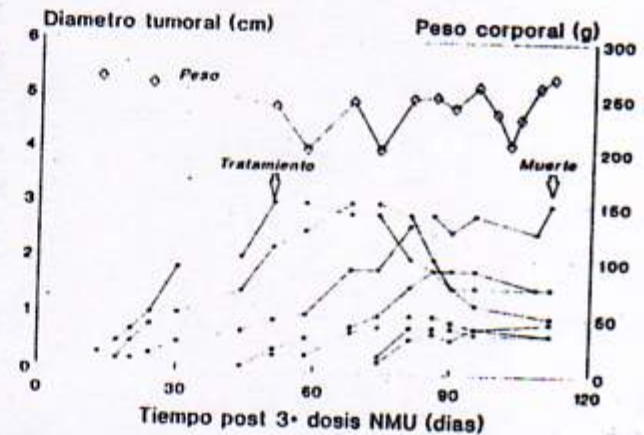


FIGURA 2: En el gráfico se observa la evolución de los tumores de un animal representativo del Lote 2 que recibió tratamiento con la medicación a partir del momento en que había desarrollado 5 carcinomas. La sobrevivida fue de 117 días. Se pueden ver claramente como el crecimiento tumoral se estabiliza a partir de iniciado el tratamiento y en algunos casos hay una significativa regresión.

Tiempo de sobrevivida

Para el estudio de sobrevivida de los animales se comparó el lote 1 control con el lote tratado con medicación.

La variable estudiada fue el tiempo de vida de cada animal, expresado en días. Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza de un criterio con las recíprocas de las variables y test a posteriori de Tukey y Student-Newman-Keuls. Los resultados indican que la sobrevivida de los animales tratados con medicación es significativamente mayor que los controles sin tratamiento ($p < 0.01$). El valor medio de tiempo de sobrevivida para cada lote fue:

83±26 días para el control, 141±43 días para el lote que recibió tratamiento con dos aplicaciones diarias de medicación. Estos datos se muestran en la figura 3 en la página siguiente.

Evolución de los animales

En general los animales mostraron una importante mejoría en su estado general a partir de los diez días de iniciado el tratamiento, lo que se puso de manifiesto como un aumento en la movilidad, vivacidad y el aspecto de los mismos (pelaje, color de ojos, etc.).

En todos los animales se produjo un aumento del peso corporal, que se mantuvo en promedio más alto que en los controles portadores de tumores no tratados.

En cambio, en los animales controles sin tumores y tratados con altas dosis de medicación, no se observó ninguna variación significativa del peso corporal.

Los animales tratados con las distintas dosis de medicación no evidenciaron signo alguno de toxicidad. No se



FIGURA 3: Curva de supervivencia de los animales pertenecientes al Lote 1 (control) y al Lote 2 (tratado) en función del tiempo post tercer dosis de NMU. Se indica el momento del inicio del tratamiento para el lote 2. Hay una diferencia significativa ($p < 0.01$) en la supervivencia de ambos lotes.

observó pérdida de peso, alopecia, diarreas, o intolerancia de algún tipo.

Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos

En relación a los tipos histológicos predominantes en nuestra casuística hubo un neto predominio de adenocarcinomas cribiformes, seguidos de papilares y luego de comedocarcinomas. No se encontró diferencia alguna entre el tipo histológico de los tumores provenientes de lotes tratados y no tratados, siendo las proporciones similares en ambos grupos. Tampoco hubo correlación entre tratamiento y grado de malignidad, aunque sí se encontraron diferencias en cuanto a la respuesta del huésped. En los casos tratados se observó una mayor afluencia de linfocitos, macrófagos y eosinófilos. Los mastocitos se diferenciaron más que en el número de elementos, en la disposición y características de los mismos. Así, en los casos tratados, la ubicación fue tanto peritumoral como intratumoral con claros signos de degranulación (pérdida de granulos y lagunas de sustancias metacromáticas en derredor de los mismos, visualizado con técnica de Giemsa). En todos los casos se trató de CTMC (mastocitos de tejido conectivo) que muestran positividad para la Safranina. En los tumores de ratas no tratadas se notó una preferencia por la disposición peritumoral y menores signos de degranulación.

La respuesta fibrosa del estroma fue más marcada en los casos de animales tratados.

La necrosis tumoral no tuvo un comportamiento significativo, siendo ligeramente mayor en los casos tratados; en estos se observó macroscópicamente una mayor tendencia a la ulceración. En relación a los estudios inmunohistoquímicos en las muestras provenientes de ratas bajo tratamiento hubo un predominio de linfocitos "T" Helper sobre las otras subpoblaciones linfocitarias. Se observó en especial una disposición más universal de los elementos, ocupando todo el tumor en lugar de ubicarse solo en la



FIGURA 4: Luces glandulares (L) se destacan en los cordones de células alílicas. En el estroma son evidentes, aun con esta técnica, los mastocitos. (H.E. 100 x)

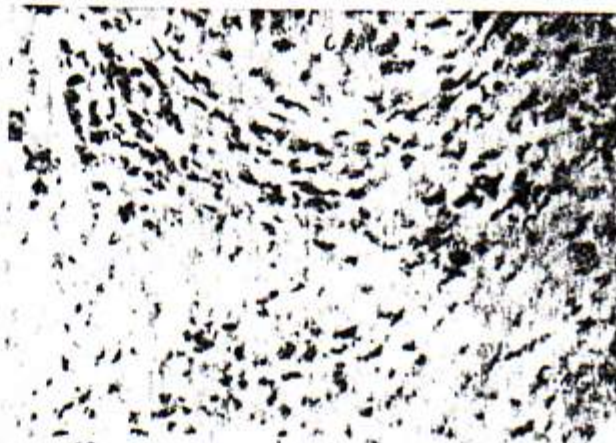


FIGURA 5: Sector intratumoral donde se puede observar a los elementos "T" Helper rodeando cordones alílicos (Hematoxilina 400 x)



FIGURA 6: Detalle de gran aumento de células "T" Helper concentradas en gran cantidad (Hematoxilina 600 x).

periferia como fue el caso de los controles. Los linfocitos "T" resultaron siempre predominantes sobre los "B" en ambos grupos como fuera previamente descrito^{42,44}.

Los resultados de las autopsias efectuadas a los animales de los lotes 2, 3 y 4 evidenciaron conservación de las estructuras histológicas normales, lo que descarta efectos tóxicos producidos por el tratamiento.

Discusión y comentarios

A partir de este estudio preliminar realizado sobre ratas portadoras de tumores mamarios inducidos, cabe destacar los efectos terapéuticos más importantes observados a partir del tratamiento.

En primer lugar, los animales muestran dentro de los 10 días de iniciado el tratamiento una clara mejoría en el estado general. Esto se manifiesta como una mayor movilidad, vivacidad y en la mayoría de los casos una recuperación y mantención del peso corporal.

En segundo lugar, una alta proporción de los tumores frenan su crecimiento, estabilizándose y en algunos casos comienzan a regresar.

Por último, ciertos tumores presentan una lesión central característica, no ulcerativa, y en algunos casos con secreción purulenta, que produce consecuentemente la disminución de la masa intratumoral.

Estos efectos producidos por el tratamiento se traducen en un aumento de la sobrevivencia de los animales tratados en relación a los controles. Así, los estudios estadísticos demuestran que la sobrevivencia de los animales tratados es significativamente mayor que la de los controles, con la dosis testada ($p < 0.01$).

En ningún caso el tratamiento impidió el desarrollo de nuevos tumores. Esto se puede deber a que el proceso de carcinogénesis y posterior progresión maligna de las lesiones iniciales es muy lento y en el momento en que se comienza con el tratamiento estas etapas ya están avanzadas^{2,44}. Para poder evaluar una acción preventiva sobre el desarrollo de tumores, debería iniciarse el tratamiento simultáneamente con la administración de la primer dosis del carcinógeno. Este protocolo también permitiría estudiar modificaciones en el período de latencia para la aparición de los tumores. Se ha descrito, que ratas Sprague-Dawley sometidas a una dieta deficiente en Se presentan mayor incidencia en el desarrollo de carcinomas mamarios inducidos con NMU⁴⁶.

Si bien es casi un 90% de los casos la evolución de los tumores fue favorable, no se observó ninguna regresión completa de algún tumor. El inicio del tratamiento en etapas más tempranas del desarrollo de los tumores, permitirá evaluar si se puede producir esta respuesta terapéutica. Se ha descrito para el Se una acción inhibitoria del crecimiento de células de hepatomas experimentales⁴⁶. El mecanismo a través del cual se ejercería este efecto sería un aumento de los niveles intracelulares del 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc) por inhibición de fosfodiesterasas específicas. Por su parte el Mn, in vitro, es un activador directo de la adenilato ciclasa con el consecuente aumento del AMPc. Esta bien documentada la acción inhibitoria del AMPc y sus análogos sobre el crecimiento neoplásico¹¹.

La lesión central característica observada con esta medicación no se observó previamente en este modelo en los tumores que regresan por acción de distintos tratamientos como antiestrogénos u ooforectomía bilateral¹⁵.

No se evidenciaron efectos tóxicos ni in vivo ni en los estudios histopatológicos de las necropsias de los animales tratados con las diferentes dosis, tanto en los portadores de tumores como en los controles normales.

En relación a los estudios inmunohistoquímicos, es interesante destacar que la proporción entre los linfocitos "T" Helper Inducer y los Citotóxicos Supresores es esencialmente distinta a la encontrada en los trabajos sobre caracterización del infiltrado linfocitario peritumoral TIL en humanos. Rubbert y col.⁴³ concluyen que el porcentaje de células CD8+ (Supresor) excede en número a las CD4+ (Helper) en 8 de 15 casos estudiados en el área tumoral, aunque en sangre periférica o en ganglios linfáticos de los mismos pacientes se observa una relación inversa. Esto explicaría la inhibición de la respuesta inmune en el área específica del tumor aunque los linfocitos circulantes sean normales. Diversos autores^{25,26,28} sostienen la hipótesis de que las células supresoras presentes en el medio tumoral serían responsables de la reducción o inhibición de la actividad funcional in vivo, en relación a la actividad in vitro de las células recuperadas y estimuladas con IL2 (interleuquina 2). Si bien nuestras observaciones fueron efectuadas en ratas, es importante la tendencia a la mayor positividad para los homólogos CD4+ que para los CD8+ en los animales tratados. Esto sugiere un efecto estimulante sobre los linfocitos "T" Helper in vivo en el área peri e intratumoral y no solamente en sangre periférica. Este hecho sea tal vez uno de los responsables del efecto terapéutico observado con el tratamiento combinado de oligoelementos y fosfolipasas.

Otros autores han reportado para el Se una acción estimulante de la respuesta inmune con efectos inhibitorios del crecimiento neoplásico²⁶. Por otra parte, se ha descrito para la fosfolipasa A2 una acción liberadora de histamina de los mastocitos¹. La histamina en determinadas condiciones resulta un potente inhibidor de la proliferación celular tanto in vivo como in vitro^{14,19}. Esto también se relaciona seguramente con las diferencias en las características y distribución de los mastocitos observadas en los distintos lotes. Se han encontrado niveles séricos de Zn y Se significativamente menores que en los grupos control en pacientes con cáncer gastrointestinal avanzado²³ y de mama²⁸.

Los datos enunciados no son definitivos, somos conscientes de que necesitan confirmación con series más extensas de casos y estudios de ploidia y subpoblaciones leucocitarias con analizador de videoimágenes. No obstante, sirven para explicar en parte alguno de los posibles mecanismos de acción de este tratamiento y como orientación para encarar futuras investigaciones.

Es indudable que los resultados expuestos abren nuevas perspectivas terapéuticas basadas en el empleo de oligoelementos y fosfolipasas.

Resumen

En el presente trabajo se estudió la acción terapéutica del tratamiento combinado de fosfolipasa A2 y los oligoelementos Se, Zn y Mn sobre carcinomas mamarios experimentales inducidos en rata mediante la administración del carcinógeno N-nitroso-N-metilurea. El objetivo fue la búsqueda de vías alternativas para obtener un estímulo inmune eficiente, primando el concepto de acción catalítica sobre el de reemplazo carencial de los elementos administrados. Se trabajó con 4 lotes de 7 animales cada uno. E

