

Estudio prospectivo de los niveles de citocinas séricas en pacientes con melanoma: valor pronóstico

Jorge A. Martínez-Escribano^a, José A. Campillo^b, Antonio Piñero^c, José F. Frías^a, Paloma Sánchez-Pedreño^a, Raúl Corbalán^a, Alfredo Minguela^b y M. Rocío Álvarez^b

^aServicio de Dermatología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. España.

^bServicio de Inmunología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. España.

^cServicio de Cirugía General. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. España.

Resumen.—*Introducción.* La producción de citocinas tiene un papel primordial en la lucha antitumoral por parte del sistema inmunitario. Por ello, en este trabajo nos propusimos investigar si las concentraciones séricas de distintos tipos de citocinas en pacientes con melanoma se asociaban con la evolución de su enfermedad.

Material y métodos. Se analiza la variación en los niveles séricos de citocinas representativas de los fenotipos Th1 (interferón gamma [IFN- γ] e interleucina 15 [IL-15]) y Th2 (IL-6 e IL-10) en 33 pacientes con melanoma cutáneo primario. Se obtuvieron semestralmente muestras de sangre periférica hasta conseguir un total de cuatro muestras por paciente.

Resultados. A los 30 meses, 29 pacientes (87,9%) sobrevivieron sin signos de recidiva. La IL-10 basal era más alta en el grupo de enfermos que fallecieron que en los supervivientes. En los pacientes que fallecieron se observó un aumento de la IL-6 sérica en la última muestra. No se pudo demostrar ninguna relación entre los niveles de IFN- γ e IL-15 y la progresión del melanoma.

Conclusión. La determinación de citocinas de tipo Th2 (IL-6 e IL-10) en suero de pacientes con melanoma podría ser útil en el seguimiento clínico de estos enfermos y servir como factor predictivo de la mejor o peor evolución de la enfermedad, en el sentido de un peor pronóstico para los enfermos con niveles elevados de IL-10 e IL-6. Por el contrario, la determinación de los niveles séricos de las citocinas de tipo Th1 (IL-15 e IFN- γ) no parece de tanta utilidad a la hora de orientar sobre el pronóstico.

Palabras clave: melanoma, citocinas, interleucina 6, interleucina 10, interleucina 15, interferón gamma.

PROSPECTIVE STUDY OF THE LEVELS OF SERUM CYTOKINES IN PATIENTS WITH MELANOMA: PROGNOSTIC VALUE

Abstract.—*Introduction.* The production of cytokines plays a primordial role in the immune system's fight against tumors. Therefore, we proposed to investigate whether the serum levels of different types of cytokines in melanoma patients were associated with the evolution of their disease.

Material and methods. We analyzed the variation in the serum levels of cytokines representative of the Th1 (IFN γ and IL-15) and Th2 (IL-6 and IL-10) phenotypes in 33 patients with primary cutaneous melanoma. Peripheral blood samples were obtained every six months until we had a total of 4 samples per patient.

Results. After 30 months, 29 patients (87.9%) had survived with no signs of recurrence. Basal IL-10 serum levels were higher in the group of patients who expired than in the survivors. Among the patients who expired, an increase in IL-6 serum levels was observed in the last sample. No relationship could be proven between IFN γ and IL-15 levels and melanoma progression.

Conclusion. Determining the levels of type Th2 cytokines (IL-6 and IL-10) in the serum of melanoma patients could be useful in the clinical follow-up of these patients and serve as a predictive factor for the progression of the disease, with the prognosis being worse for patients with high IL-10 and IL-6 levels. On the other hand, determining the serum levels of type Th1 cytokines (IL-15 and IFN γ) does not seem to be as useful in predicting the prognosis.

Key words: melanoma, cytokines, interleukin 6, interleukin 10, interleukin 15, interferon-gamma.

INTRODUCCIÓN

El melanoma ha adquirido gran protagonismo en las últimas décadas, lo cual se justifica, además de por su agresividad, por el incremento exponencial de su incidencia¹ y porque se diagnostica en individuos cada

vez más jóvenes². Aunque el melanoma sólo representa el 3% de las neoplasias malignas cutáneas, dicho tumor provoca el 65% de las muertes por cáncer de piel y el 1,3% del total de fallecimientos por cáncer en general³. También resultan inquietantes algunas predicciones que indican que uno de cada 75 sujetos nacidos en el año 2000 desarrollará un melanoma a lo largo de su vida¹.

El comportamiento biológico del melanoma es muy diferente al de otros cánceres de piel. Por ello, en los últimos años se han multiplicado los estudios para conocer mejor el mecanismo de acción y los efectos de los distintos componentes del sistema inmunitario en su defensa frente al melanoma^{4,5}. Desde un punto de vista clínico, la intervención del sistema inmunitario

Correspondencia:

Jorge A. Martínez-Escribano. Servicio de Dermatología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. 30120 El Palmar. Murcia. España.
jmescribano@huva.es

Recibido el 15 de julio de 2004.

Aceptado el 28 de diciembre de 2004.

Este trabajo ha sido financiado con una beca de la Fundación Séneca de la Consejería de Educación y Universidades de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (PI-4/00811/FS/01).

en la lucha contra el melanoma se apoya en observaciones como los fenómenos de regresión tumoral, la posibilidad de un prolongado intervalo libre de enfermedad entre la exéresis del tumor primario y el eventual desarrollo de metástasis, la existencia de respuestas parciales o completas en pacientes que han recibido inmunoterapia⁶; o el incremento de 2 a 5 veces en la tasa de incidencia de melanoma en pacientes trasplantados con inmunosupresión terapéutica⁷.

Las citocinas son polipéptidos solubles encargados, entre otras funciones, de regular las respuestas inmunitarias del organismo. La principal fuente de citocinas son los linfocitos T y los monocitos. Existen dos subtipos de linfocitos T colaboradores (Th) en virtud del patrón de citocinas que producen⁸, así el subtipo 1 (Th1) libera interferón gamma (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2), IL-12, IL-15 y factor de necrosis tumoral β (TNF- β); y el subtipo 2 (Th2) libera IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13.

Teniendo en cuenta que el melanoma es uno de los tumores más inmunogénicos, también es el arquetipo de tumor donde la intervención sobre el sistema inmunológico podría aplicarse en beneficio del paciente en la práctica clínica. Por ello, en este trabajo nos propusimos investigar si los niveles de distintos tipos de citocinas en suero de pacientes con melanoma se modificaban con la evolución de la enfermedad. Si así fuera, los niveles de dichas citocinas podrían considerarse como marcadores con valor pronóstico en pacientes con melanoma y servirían para identificar aquellos enfermos con mejor capacidad de respuesta a cada tratamiento. Además, la medición de estas citocinas podría ser útil para controlar el efecto de la inmunoterapia u otros tratamientos, con criterios más funcionales y adaptados a cada paciente de manera individualizada, y servir de ayuda para detectar fallos terapéuticos y la necesidad de un tratamiento alternativo. Incluso si los niveles de determinadas citocinas fueran útiles para predecir el pronóstico y la evolución del melanoma, se podría pensar en su aplicación para establecer una clasificación más completa de los enfermos con melanoma, de modo análogo a lo ocurrido con la lactato deshidrogenasa sérica, incluida en la última clasificación del American Joint Committee on Cancer para la estadiación de enfermos con melanoma⁹.

Por lo tanto, teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, en este trabajo nos propusimos analizar de forma prospectiva la variación en las concentraciones séricas de citocinas representativas de los fenotipos Th1 (IFN- γ e IL-15) y Th2 (IL-6 e IL-10) en enfermos con melanoma, para valorar si dichos cambios podrían relacionarse con la evolución de la enfermedad. Para valorar dicha evolución se tuvieron en cuenta dos parámetros: la aparición o no de metástasis y la supervivencia a los 30 meses. La elección de dichas citocinas se realizó en función de la facilidad de su detección y a sus funciones en el organismo. En este sentido, el IFN- γ colabora en la activación y diferencia-

ción de los linfocitos T y B¹⁰, es un potente activador de la capacidad citolítica de los monocitos y las células asesinas naturales (*natural killer*, NK), y es capaz de inhibir el crecimiento de células de melanoma¹¹. La IL-15 estimula la proliferación y activación de las células T, B y NK¹². La IL-6 estimula a los linfocitos T y timocitos e induce la maduración del linfocito B hacia la célula plasmática¹³. Además, la IL-6 puede actuar como factor inhibidor o estimulador del crecimiento celular, dependiendo de la naturaleza de la célula diana¹⁴. Finalmente, la IL-10 inhibe la proliferación de las células T específicas de antígeno y bloquea la liberación de citocinas proinflamatorias por los macrófagos activados¹⁵. Aunque la IL-10 parece trabajar como un supresor general de las respuestas inmunitaria e inflamatoria, también puede incrementar la actividad de los linfocitos T citotóxicos¹⁶.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se incluyeron en el estudio, previo consentimiento informado, 33 pacientes con melanoma cutáneo primario, procedentes del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Los criterios de exclusión fueron: melanoma metastásico u otro tipo de cáncer, enfermedades autoinmunes, inflamatorias e infecciosas e inmunodeficiencia o tratamiento inmunosupresor. En todos los casos el tumor primario fue extirpado hasta la fascia muscular, respetándola, con márgenes de piel sana perilesional de 1 a 2 cm. En 10 pacientes se realizó biopsia selectiva del ganglio centinela y en todos ellos se descartó infiltración maligna de dicho ganglio, tras cortes seriados y tinción con hematoxilina-eosina y HMB-45. En 16 pacientes se realizó tratamiento adyuvante con interferón- α_{2b} (IFN- α_{2b}) subcutáneo a dosis bajas (3 millones de U), 3 veces por semana, durante 12 meses; en 5 casos se suspendió definitivamente el tratamiento entre 3 y 9 meses antes de la fecha prevista por intolerancia al mismo. En 3 casos que desarrollaron metástasis se administró quimioterapia y/o IFN- α_{2b} en dosis altas, siempre después de haber extraído la cuarta y última muestra de sangre.

Grupos de estudio

Los pacientes se clasificaron en grupos de estudio siguiendo diversos criterios. En cuanto a la aparición de metástasis a lo largo de los 30 meses de seguimiento: no metástasis (grupo NM [no metástasis]); metástasis regionales (grupo MR [metástasis regionales]); metástasis viscerales (grupo MV [metástasis viscerales]). Cuando un mismo enfermo tuvo metástasis regionales y viscerales, se incluyó en el grupo MV. En cuanto a la supervivencia a los 30 meses, vivos frente a

TABLA 1. ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADOS PARA CUANTIFICAR IL-10 E IFN- γ

<i>Anticuerpo</i>	<i>Clon</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Disponibilidad</i>
Mouse anti-human-IL10	JES3-9D7	Pharmingen	Purificado
Mouse anti-human-IL10	JES3-12G8	Pharmingen	Biotinilado
IL-10 humana	–	Pharmingen	Recombinante
Mouse anti-human-IFN- γ	NIB42	Pharmingen	Purificado
Mouse anti-human-IFN- γ	4S.B3	Pharmingen	Biotinilado
IFN- γ humano	–	Pharmingen	Recombinante

IL: interleucina; IFN- γ : interferón gamma.

fallecidos. Y en cuanto al espesor de Breslow, se simplificó dividiendo en dos grupos: menor o igual a 2 mm frente a mayor de 2 mm.

Además, se estudiaron el tipo histológico (melanoma de extensión superficial, nodular, lentiginoso acral o lentigo maligno melanoma), la presencia o no de ulceración, la intensidad del infiltrado inflamatorio peritumoral (nulo, escaso o intenso) y la presencia o no de regresión. Y también se tuvo en cuenta la administración o no de IFN- α_{2b} durante el periodo de recogida de muestras de sangre.

Muestras de suero

Se obtuvieron semestralmente muestras de sangre periférica hasta conseguir un total de cuatro muestras por paciente. La primera muestra se recogió en el momento de la inclusión en el estudio (muestra basal) y la última a los 18 meses de la inclusión. La sangre se recogía en tubos de vidrio no heparinizados, se mantenía a temperatura ambiente hasta la retracción del coágulo y se centrifugaba durante 10 min a 840 g. Después, el suero era alicuotado en dos tubos y congelado a -70 °C.

Cuantificación de citocinas séricas

Se determinaron cuatro tipos de citocinas mediante técnica de enzoinmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA): IFN- γ e IL-15, como representativas del fenotipo Th1 e IL-6 e IL-10 como representativas del fenotipo Th2. En el caso de la IL-10 y el IFN- γ , la determinación se realizó usando como anticuerpos de captura, anticuerpos monoclonales purificados antiinterleucinas humanas y, para el revelado, anticuerpos monoclonales biotinilados que reconocían diferentes epítomos de la interleucina correspondiente (tabla 1). Como estándar se utilizó cada interleucina en su forma recombinante obtenida comercialmente. Para el análisis de la IL-6 y la IL-15, se usaron métodos comerciales disponibles en el mercado (tabla 2).

Seguimiento

Una vez finalizado el periodo de obtención de muestras, todos los pacientes se mantuvieron en ob-

servación clínica durante 12 meses, de modo que el período total de seguimiento fue de 30 meses. Las visitas de seguimiento se realizaron trimestralmente e incluían exploración física completa, hemograma y bioquímica general. Además, anualmente se realizó a los pacientes una radiografía simple de tórax y una ecografía hepática. Dependiendo de la sintomatología del enfermo y de los resultados de las pruebas complementarias habituales, se solicitaron otras técnicas como tomografía computarizada, resonancia magnética, gammagrafía ósea, tránsito gastrointestinal y/o endoscopia digestiva.

Métodos estadísticos

Para los niveles de citocinas en los distintos grupos de pacientes se calcularon los parámetros descriptivos: media, error de la media, desviación estándar y varianza. La comparación de los niveles basales de citocinas se llevó a cabo mediante el test de Mann-Whitney, prueba no paramétrica para muestras independientes. Por otra parte, el análisis de la evolución de los niveles de citocinas se efectuó aplicando un análisis de varianza de medidas repetidas relativo a un diseño factorial jerarquizado. Cuando dicho análisis de varianza reveló que existían diferencias entre un número de grupos de pacientes superior a dos, como ocurría al estudiar la aparición de metástasis, se empleó la prueba de Bonferroni, que utiliza pruebas t para realizar comparaciones por pares entre las medias de los grupos.

TABLA 2. REACTIVOS USADOS PARA CUANTIFICAR IL-6 E IL-15

<i>Citocina</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Límite de detección (pg/ml)</i>
IL-6	CLB (Pelikine compact®), Amsterdam, Holanda	0,2
IL-15	R&D Systems Europe (Quantikine®), Abingdon, UK	1

IL: interleucina.

RESULTADOS

Datos histológicos del tumor primario

El espesor medio del total de melanomas era de $2,18 \pm 1,75$ mm (rango, 0,20-6,70 mm); de ellos, 12 (36,4 %) tenían menos de 1 mm de espesor, 6 (18,2 %) entre 1,01 y 2 mm, 11 (33,2 %) entre 2,01 y 4 mm, y 4 (12,1 %) más de 4 mm. El melanoma de extensión superficial fue el tipo histológico más frecuente (54,5 %), seguido en orden decreciente de frecuencia por el melanoma nodular (27,3 %), el melanoma lentiginoso acral (15,2 %) y el lentigo maligno melanoma (3,0 %). Existía un predominio de las lesiones no ulceradas (81,8 %) sobre las ulceradas (18,2 %) y de las que no presentaban regresión (84,8 %) sobre las que sí (15,2 %).

Desarrollo de metástasis

A los 30 meses del inicio del estudio, 9 pacientes habían desarrollado metástasis; tres de ellos sólo regionales (grupo MR) y cinco viscerales (grupo MV). El tiempo medio hasta la aparición de las metástasis viscerales en el grupo MV fue de $14,65 \pm 6,30$ meses (rango, 6,1-19,7 meses).

Supervivencia

Tras 30 meses de seguimiento, 29 pacientes (87,9 %) permanecían vivos y el resto (12,1 %) había fallecido

por el melanoma. El tiempo medio hasta el fallecimiento fue de $26,37 \pm 2,88$ meses (rango, 22,6-29,6 meses).

Niveles séricos de citocinas

El nivel basal de citocinas de tipo Th1 (IFN- γ e IL-15) no varió de manera significativa entre los distintos grupos de pacientes (tablas 3-5). Con respecto a las citocinas de tipo Th2, el nivel basal de IL-6 no difería significativamente entre los diversos grupos de enfermos (tablas 3-5) (fig. 1). En cambio, la IL-10 basal era más alta en el grupo de enfermos que fallecieron que en los supervivientes ($p = 0,05$) (tabla 4), así como en el grupo de pacientes con metástasis viscerales en comparación con los que sufrieron metástasis regionales ($p = 0,01$) y con los que no desarrollaron metástasis ($p = 0,02$) (tabla 5) (fig. 2), si bien no se demostraron cambios significativos en relación con el espesor de Breslow (tabla 3).

En cuanto a las variaciones a lo largo del tiempo de los niveles de citocinas, al igual que hemos visto con los valores basales, tampoco se demostraron diferencias cuando se comparó la evolución de los niveles de IFN- γ e IL-15 entre los distintos grupos de estudio (tablas 3-5). Por el contrario, los niveles de IL-6 sí evolucionaron de modo distinto a lo largo del tiempo en el grupo de enfermos que fallecieron, en comparación con los supervivientes ($p < 0,01$), de modo que en estos últimos las cifras medias de IL-6 permanecieron bastante estables en el tiempo, mientras que en los pacientes que fallecieron se ob-

TABLA 3. EVOLUCIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE IFN- γ , IL-15, IL-6 E IL-10 (pg/ml) EN RELACIÓN CON EL ESPESOR DE BRESLOW

	IFN- γ		IL-15		IL-6		IL-10	
	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm	≤ 2 mm	> 2 mm
Basal	$15,5 \pm 9,5$	$13,1 \pm 6,1$	$4,0 \pm 1,2$	$4,2 \pm 1,7$	$0,8 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,4$	$17,8 \pm 10,0$	$21,4 \pm 8,8$
6 meses	$16,0 \pm 17,4$	$10,8 \pm 5,1$	$3,4 \pm 0,9$	$3,6 \pm 1,4$	$0,9 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,4$	$20,8 \pm 16,7$	$15,6 \pm 4,7$
12 meses	$11,9 \pm 11,9$	$12,2 \pm 7,6$	$3,7 \pm 1,2$	$3,5 \pm 1,5$	$1,0 \pm 0,7$	$0,8 \pm 0,3$	$18,1 \pm 10,8$	$19,4 \pm 7,7$
18 meses	$20,1 \pm 18,1$	$13,6 \pm 5,5$	$4,0 \pm 1,5$	$3,9 \pm 1,8$	$1,4 \pm 1,8$	$2,3 \pm 2,9$	$22,9 \pm 16,0$	$18,9 \pm 8,2$

IFN- γ : interferón gamma; IL: interleucina.

TABLA 4. EVOLUCIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE IFN- γ , IL-15, IL-6 E IL-10 (pg/ml) SEGÚN LA SUPERVIVENCIA A LOS 30 MESES

	IFN- γ		IL-15		IL-6		IL-10	
	Vivos	Fallecidos	Vivos	Fallecidos	Vivos	Fallecidos	Vivos	Fallecidos
Basal	$14,7 \pm 8,6$	$12,0 \pm 2,5$	$4,0 \pm 1,4$	$4,8 \pm 1,2$	$0,9 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,2$	$18,3 \pm 8,9$	$28,1 \pm 10,9$
6 meses	$14,1 \pm 14,2$	$9,8 \pm 2,2$	$3,4 \pm 1,2$	$3,7 \pm 1,1$	$0,8 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,7$	$18,4 \pm 13,5$	$18,5 \pm 7,7$
12 meses	$11,8 \pm 10,3$	$13,5 \pm 9,4$	$3,6 \pm 1,4$	$3,5 \pm 1,0$	$0,9 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,4$	$18 \pm 8,8$	$23,8 \pm 13,5$
18 meses	$17,7 \pm 14,9$	$12,8 \pm 4,3$	$4,0 \pm 1,7$	$3,8 \pm 1,4$	$1,3 \pm 1,5$	$5,0 \pm 4,9$	$21,6 \pm 13,8$	$17,5 \pm 3,6$

IFN- γ : interferón gamma; IL: interleucina.

TABLA 5. EVOLUCIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE IFN- γ , IL-15, IL-6 E IL-10 (pg/ml) SEGÚN LA APARICIÓN Y TIPO DE METÁSTASIS (GRUPOS NM FRENTE A MR FRENTE A MV)

	IFN- γ			IL-15			IL-6			IL-10		
	NM	MR	MV	NM	MR	MV	NM	MR	MV	NM	MR	MV
Basal	14,7 \pm 8,6	10,8 \pm 3,9	15,8 \pm 8,7	4,1 \pm 1,5	3,7 \pm 1,1	4,6 \pm 1,1	0,9 \pm 0,4	0,9 \pm 0,6	0,9 \pm 0,1	18,6 \pm 8,9	12,6 \pm 2,7	29,1 \pm 9,7
6 meses	14,8 \pm 15	10,5 \pm 4,3	10,6 \pm 2,5	3,6 \pm 1,2	2,8 \pm 0,5	3,5 \pm 1,1	0,9 \pm 0,5	0,9 \pm 0,5	1,1 \pm 0,6	19,9 \pm 14	10,5 \pm 3,2	17,5 \pm 7,0
12 meses	12,2 \pm 11	9,5 \pm 3,8	13,5 \pm 8,2	3,7 \pm 1,5	3,5 \pm 0,9	3,4 \pm 0,8	1,0 \pm 0,6	0,8 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3	18,5 \pm 9,2	15,2 \pm 7,2	22,6 \pm 12
18 meses	17,4 \pm 15	17,7 \pm 16	15,3 \pm 6,5	4,1 \pm 1,8	3,4 \pm 0,7	3,6 \pm 1,3	1,3 \pm 1,5	1,9 \pm 2,2	4,2 \pm 4,6	20,4 \pm 12	22,9 \pm 21	23 \pm 12,7

IFN- γ : interferón gamma; IL: interleucina; NM: no metástasis; MR: metástasis regionales; MV: metástasis viscerales.

servó un aumento de IL-6 sérica en la última muestra (tabla 4) (fig. 1). Como parecería lógico teniendo en cuenta lo anterior, la IL-6 también aumentó en la última muestra tanto de los pacientes con melanomas de espesor de Breslow superior a 2 mm como en los pacientes del grupo MV, aunque no se llegó a alcanzar significación estadística (tablas 3 y 5). Con respecto a la IL-10, resultó llamativo un descenso progresivo de sus cifras en el grupo de pacientes que fallecieron ($p < 0,05$) (tabla 4). También resultó significativa la diferente variación experimentada por la IL-10 sérica al comparar los tres grupos NM, MR y MV entre sí ($p < 0,01$), con un descenso progresivo de IL-10 en el grupo MV, unos niveles estables en el

grupo NM y un ascenso en el grupo MR (tabla 5) (fig. 2). Sin embargo, no se observó ninguna relación entre la variación de los niveles séricos de IL-10 y el espesor de Breslow (tabla 3).

Tampoco se observó ninguna variación significativa de los niveles séricos de ninguna de las citocinas estudiadas en relación con el tipo histológico de melanoma, con la ulceración, con la intensidad del infiltrado inflamatorio, ni con la regresión del tumor (datos no mostrados).

Con respecto a los posibles efectos del tratamiento con IFN- α_{2b} sobre los niveles séricos de las citocinas estudiadas en este trabajo, se realizó un análisis de dichos niveles agrupando las muestras obtenidas cuan-

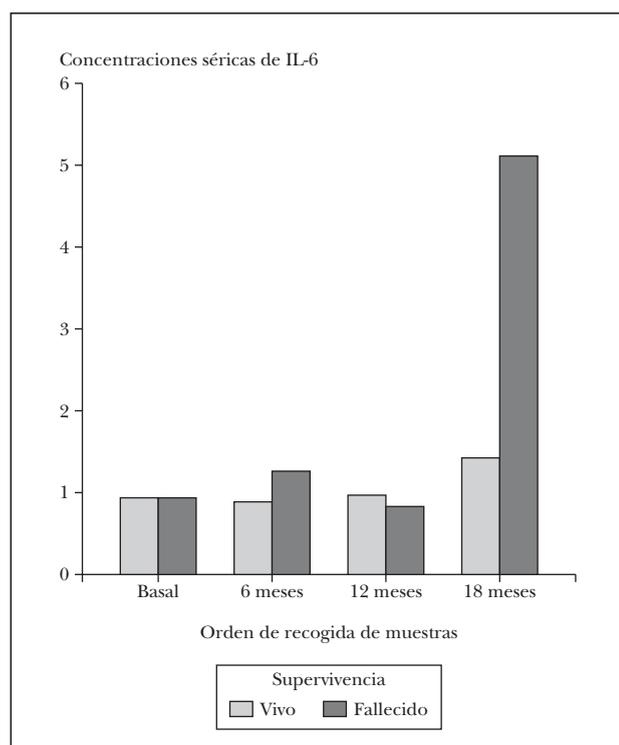


Fig. 1.—Evolución de los niveles séricos de IL-6 (pg/ml) en los pacientes agrupados según la supervivencia o no tras 30 meses de seguimiento. En la última muestra se apreció un incremento de IL-6 en el grupo de enfermos que fallecieron posteriormente.

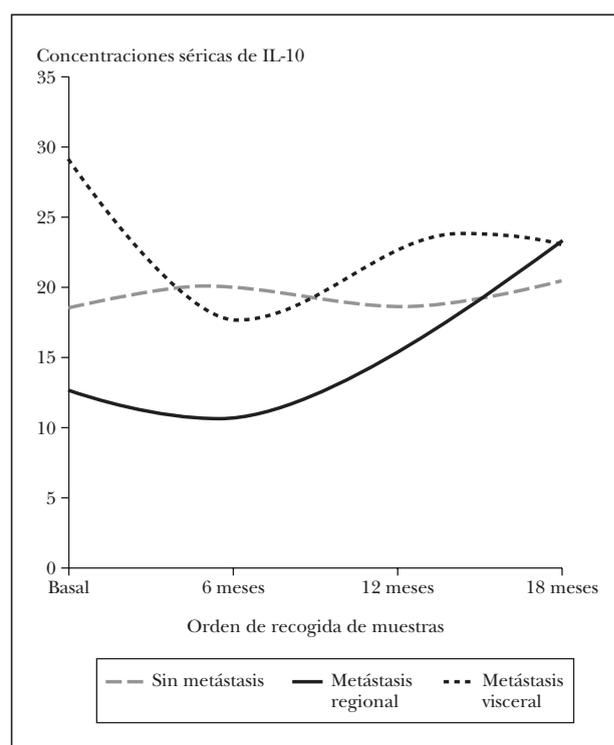


Fig. 2.—Evolución de los niveles séricos de IL-10 (pg/ml) en los distintos grupos de pacientes según la aparición y tipo de metástasis. En la primera muestra, los niveles fueron más altos en los enfermos que desarrollaron metástasis viscerales que en el resto.

do cada paciente estaba siendo tratado con IFN- α_{2b} y separándolas del resto de muestras. Se compararon los niveles de cada citocina entre las distintas muestras dentro de cada individuo y dentro de cada grupo de pacientes estudiado, y en ningún caso se apreciaron cambios significativos ni tendencia alguna que llamara la atención (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

En los últimos años, una gran cantidad de estudios ha ido dirigida a definir las características de la célula tumoral que le permiten escapar a la vigilancia inmunológica^{17,18}. Sin embargo, la capacidad de rechazar o «tolerar» el tumor también puede depender de la predisposición individual para elaborar respuestas inmunitarias antitumorales eficientes o no¹⁹. A pesar de ello, hasta el momento son más escasos los trabajos encaminados a estudiar la capacidad defensiva antitumoral propia de cada individuo, la cual, probablemente, está modulada por las propias células malignas²⁰.

Se ha demostrado que la producción de citocinas tiene un papel primordial en el resultado final de la lucha antitumoral por parte del sistema inmunitario²¹. La transducción de células tumorales con genes de determinadas citocinas puede conducir al rechazo de dichas células modificadas genéticamente y favorecer la inmunidad sistémica contra células del mismo tumor en caso de un contacto posterior²². Estos resultados se corroboran clínicamente con la existencia de pacientes que muestran regresión de un melanoma después de administrarles inmunoterapia adyuvante²³.

El estudio de la posible interacción entre los diversos tipos de citocinas y las células de melanoma se ha llevado a cabo por distintos medios. Por una parte, se han publicado trabajos centrados en el estudio de la expresión local del ARN mensajero de citocinas en lesiones de melanoma^{21,24,25}. Otros autores han determinado las concentraciones de citocinas, como IL-10 o IFN- γ , en cultivos de células de melanoma^{26,27}. Los valores séricos o plasmáticos de determinadas citocinas, fundamentalmente las de fenotipo Th2, como la IL-6 o la IL-10, también pueden correlacionarse con la carga tumoral del melanoma y/o con el estadio más o menos avanzado de dicha enfermedad, es decir, con la aparición de metástasis²⁸⁻³⁴.

Se ha demostrado una correlación entre la mayor presencia de citocinas de tipo Th1 y la mayor respuesta inmunitaria frente al melanoma²⁴. Sin embargo, en la serie de pacientes aquí estudiada no se ha podido demostrar ninguna relación entre los niveles séricos de IFN- γ e IL-15 y la progresión del melanoma, quizá porque los cambios sistémicos en los niveles de citocinas son más difíciles de demostrar que los cambios locales. No obstante, en nuestra serie se observó una

tendencia en los pacientes que fallecieron a presentar niveles medios más bajos de IFN- γ sérico. También hay que tener en cuenta que existen datos contradictorios con respecto al efecto del IFN- γ sobre las células de melanoma humano, pues el IFN- γ puede incrementar la actividad citolítica de las células efectoras de la inmunidad e inhibir directamente el crecimiento de las células de melanoma¹¹, pero el tratamiento de las células de melanoma con IFN- γ también puede dar lugar a un fenotipo biológicamente más agresivo de dichas células¹¹, lo cual puede contribuir a la diseminación tumoral. Por lo tanto, las acciones supuestamente beneficiosas del IFN- γ podrían compensarse con las potencialmente negativas.

En los pacientes que fallecieron durante el período de seguimiento se observó un incremento significativo de las concentraciones séricas de IL-6 en la última muestra de sangre. De aquí ya se puede intuir que la IL-6 podría influir en la evolución clínica de los pacientes con melanoma. Como hemos visto con el IFN- γ , en el caso de la IL-6 también existen datos contrapuestos sobre su papel favorecedor o inhibidor de la progresión del melanoma. Así, se ha descrito que la IL-6 se comporta como una citocina inhibidora del crecimiento de las células de melanoma en estadios tempranos de la enfermedad, cuando el melanoma está en la fase de crecimiento radial²⁸, pues dicha citocina estimula la diferenciación de las células citotóxicas³⁵ e induce la expresión tanto de IL-2R como la producción de IL-2 por las células T activadas³⁶. Sin embargo, las células procedentes de melanomas más avanzados (en fase de crecimiento vertical y metastásicos) son resistentes al efecto antiproliferativo de la IL-6²⁸. Este comportamiento parece característico de las células de melanoma, neoplasia paradigma de la capacidad de desarrollar resistencia, parcial o completa, a la acción de múltiples citocinas durante la progresión tumoral³⁷. Además, aunque pueda resultar paradójico, en estadios avanzados de la enfermedad, la IL-6 puede incluso comportarse como un factor estimulante del crecimiento de las células de melanoma³⁷, fenómeno ya descrito en células de mieloma múltiple³⁸. De hecho, las células humanas de melanoma pueden producir IL-6 en estadios avanzados de la enfermedad³⁹. Otro efecto negativo de la IL-6 en altas concentraciones es que inhibe la proliferación de las células T⁴⁰ y favorece la angiogénesis tumoral⁴¹. Algunos autores han demostrado una correlación positiva entre los niveles séricos de IL-6 en enfermos con melanoma y la carga tumoral³¹. Por lo tanto, la elevación de la IL-6 sérica en enfermos con melanoma se correlaciona también con la progresión de la enfermedad y con menores tasas de supervivencia³², y puede predecir una falta de respuesta a la inmunoterapia³¹. Nuestros resultados apoyan que un aumento de la IL-6 sérica se asocia con una mayor mortalidad en los enfermos con melanoma³². En consecuencia, la medición seriada de las concentraciones séricas de IL-6 po-

dría tener valor predictivo del pronóstico de los pacientes con melanoma y, por lo tanto, ser útil en su seguimiento. Tras un aumento marcado de los niveles de IL-6 sérica se debería estar más alerta ante la posible aparición de metástasis sistémicas. En estos casos podría ser aconsejable acortar el intervalo entre las revisiones médicas o realizar exploraciones complementarias más exhaustivas.

La IL-10 puede funcionar como una citocina supresora de la respuesta inmunitaria e inflamatoria^{15,42,43}, lo cual parece congruente con el aumento de IL-10 sérica, descrito por distintos autores, en pacientes con melanomas metastásicos^{29,30,33}. Es posible que la IL-10 permita al tumor evitar o disminuir el ataque del sistema inmunitario, mediante un efecto inmunosupresor⁴⁴. Las diferencias observadas en los niveles basales de IL-10 sérica en nuestra serie parecen apoyar lo anterior, pues se observó una elevación de la IL-10 sérica en el grupo de pacientes que desarrollaron metástasis viscerales y en los que fallecieron. Sin embargo, no hemos encontrado una explicación al hecho de que, pasado el primer año tras el diagnóstico del melanoma, se igualaron las concentraciones séricas de IL-10 en todos los pacientes independientemente del desarrollo de metástasis. El papel de la IL-10 como reguladora de la respuesta inmunitaria frente al melanoma no es tan simple como pueda parecer. De hecho, el pronóstico más pobre que se ha atribuido a los melanomas que se asocian con niveles séricos elevados de IL-10^{29,33,45}, no ha sido confirmado por todos los autores. La IL-10 también puede inhibir el crecimiento de las células de melanoma humano, suprimiendo la aparición de metástasis, gracias a su efecto antiangiogénico⁴⁶; además, la IL-10 es capaz de ejercer un efecto antitumoral a través de un mecanismo dependiente de las células NK⁴⁷ y la administración sistémica de IL-10 puede inducir una respuesta inmunitaria efectiva y específica contra células de melanoma⁴⁸. Quizá por todo lo anterior, los pacientes con melanoma que presentan genotipos asociados a baja expresión de IL-10 parecen tener un peor pronóstico que aquellos que tienen más capacidad de secreción de IL-10⁴⁹. De hecho, en otras neoplasias, como el mieloma múltiple, los niveles más elevados de IL-10 sérica no sólo no implican una peor evolución, sino que están asociados con un buen pronóstico⁵⁰.

Tras estudios controlados, aleatorizados, multicéntricos, realizados a largo plazo, se ha llegado a la conclusión de que las dosis bajas de IFN- α no mejoran ni la supervivencia ni el tiempo libre de enfermedad en pacientes con melanoma de alto riesgo^{51,52}. Por lo tanto, hoy día se considera que el IFN- α en dosis bajas no ejerce un efecto clínico objetivable en estos pacientes, al contrario de lo que parece ocurrir con las elevadas dosis⁵³. Nuestros datos, aunque preliminares, parecen encajar con lo anterior, es decir, que igual que el IFN- α a dosis bajas no afecta significati-

vamente el curso del melanoma, tampoco se asocia con cambios significativos en los niveles séricos de IL-15, IFN- γ , IL-6 ni IL-10.

A modo de resumen, según lo observado en nuestra serie, la determinación de las citocinas de tipo Th2 (IL-6 e IL-10) en el suero de pacientes con melanoma podría ser útil en el seguimiento clínico de estos enfermos y servir como factor predictivo de la mejor o peor evolución de la enfermedad. Además, dicha información sería adicional a la proporcionada por el espesor de Breslow, pues los niveles de dichas citocinas no se asocian significativamente con el grosor tumoral. Por el contrario, la determinación de los niveles séricos de las citocinas de tipo Th1 (IL-15 e IFN- γ) no parece de tanta utilidad a la hora de orientar sobre el pronóstico. La IL-10 sérica proporcionaría información pronóstica desde el momento inicial, cercano a la extirpación del tumor, en el sentido de un peor pronóstico para los enfermos con niveles séricos basales de IL-10 elevados. Sin embargo, en las sucesivas muestras, los niveles séricos de IL-10 no son fiel reflejo de la aparición de metástasis. En el caso de la IL-6 sérica, lo que parece más interesante es su determinación seriada, pues es su aumento desde valores más bajos el que podría servir como marcador de mal pronóstico. En cualquier caso, la realización de medidas repetidas de las concentraciones séricas tanto de IL-6 como de IL-10 en pacientes con melanoma podría tener aplicación en la práctica clínica, aportando información adicional a la del espesor de Breslow para emitir un pronóstico vital. Esta información resultaría más dinámica que el mencionado índice de Breslow y vendría a reflejar una parcela del estado del sistema inmunitario del sujeto portador del melanoma y de la interacción entre el huésped y el tumor. Además debería investigarse si los niveles séricos de IL-6 y/o IL-10 pueden servir para monitorizar el efecto de la inmunoterapia en pacientes con melanoma.

A la vista de estos resultados, sería interesante la continuación del estudio en un mayor número de pacientes con melanoma y su comparación con lo que ocurre en sujetos sanos, de modo que se pueda establecer con más exactitud el carácter de susceptibilidad o protección frente al desarrollo de melanoma que pueden ejercer los distintos niveles de citocinas séricas en el ser humano, especialmente las citocinas de tipo Th2, así como su posible asociación con el mejor o peor pronóstico en enfermos con melanoma.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a José Miguel Alemany y María José Sanchis, ATS ambos del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, por su disponibilidad para realizar las extracciones de sangre periférica a los pacientes aquí estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW. The incidence of malignant melanoma in the United States: issues as we approach the 21st century. *J Am Acad Dermatol.* 1996;34:839-47.
2. Álvarez-Mon M, Camacho F, Díaz JL. Epidemiología. En: Panorámica actual del melanoma. Madrid: Acción Médica; 1997. p. 17-23.
3. Weinstock MA, Boyle MM. Statistics of interest to the dermatologists. En: Thiers B, Lang PG Jr., editors. Year book of Dermatology and Dermatologic Surgery. Mosby: St. Louis; 1998. p. 7-23.
4. Nestle FO, Burg G, Dummer R. New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunol Today.* 1999;20:5-7.
5. Martínez Escribano JA. Estudio del fenotipo de células mononucleares en sangre periférica de pacientes con melanoma. Análisis de los niveles séricos y polimorfismo de citocinas [tesis doctoral]. Universidad de Valencia; 2001.
6. Strohal R, Marberger K, Pehamberger H, Stingl G. Immunohistological analysis of anti-melanoma host responses. *Arch Dermatol Res.* 1994;287:28-35.
7. Leveque L, Dalac S, Domp Martin A, et al. Melanoma in organ transplant patients. *Ann Dermatol Venereol.* 2000; 127:160-5.
8. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73.
9. Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer.* 2000;88:1484-91.
10. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, et al. Reciprocal regulatory effects of INF-gamma and IL-4 on the *in vivo* development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol.* 1992; 148:2142-7.
11. Garbe C, Krasagakis K. Effects of interferons and cytokines on melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 1993;100: 239S-44S.
12. Gamero AM, Ussery D, Reintgen DS, Puleo CA, Djeu JY. Interleukin 15 induction of lymphokine-activated killer cell function against autologous tumor cells in melanoma patient lymphocytes by a CD18-dependent, perforin-related mechanism. *Cancer Res.* 1995;55:4988-94.
13. Kishimoto T. The biology of interleukin 6. *Blood.* 1989;74: 1-10.
14. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today.* 1990;11: 443-9.
15. Kambayashi T, Alexander HR, Fong M, Strassmann G. Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. *J Immunol.* 1995;154:3383-90.
16. Chen WF, Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol.* 1991;147:528-34.
17. Carrel S, Schmidt Kessen A, Giuffre L. Recombinant interferon-gamma can induce the expression of HLA-DR and -DC on DR-negative melanoma cells and enhance the expression of HLA-ABC and tumor-associated antigens. *Eur J Immunol.* 1985;15:118-23.
18. Garrido F, Ruiz F, Cabrera T, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 1997;18:89-95.
19. Martínez-Escribano JA, Hernández-Caselles T, Campillo JA, et al. Changes in the number of CD80+, CD86+, and CD28+ peripheral blood lymphocytes have prognostic value in melanoma patients. *Hum Immunol.* 2003;64:796-801.
20. Donawho CK, Pride MW, Kripke ML. Persistence of immunogenic pulmonary metastases in the presence of protective anti-melanoma immunity. *Cancer Res.* 2001;61: 215-21.
21. Wagner SN, Schultewolter T, Wagner C, et al. Immune response against human primary malignant melanoma: a distinct cytokine mRNA profile associated with spontaneous regression. *Lab Invest.* 1998;78:541-50.
22. Pardoll DM. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:399-415.
23. Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA.* 1994;271: 907-13.
24. Lowes MA, Bishop GA, Crotty K, Barnetson RS, Halliday GM. T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas. *J Invest Dermatol.* 1997;108:914-9.
25. Botella Estrada R, Escudero M, O'Connor JE, et al. Estudio del patrón de citocinas (Th1/Th2) producido por linfocitos T periféricos y del existente en tejido tumoral en pacientes con melanoma en diferentes estadios. *Actas Dermosifiliogr.* 2002;93:87-101.
26. Yue FY, Dummer R, Geertsen R, et al. Interleukin 10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer.* 1997;71:630-7.
27. Dummer R, Yue FY, Pavlovic J, et al. Immune stimulatory potential of B7.1 and B7.2 retrovirally transduced melanoma cells: suppression by interleukin 10. *Br J Cancer.* 1998;77:1413-9.
28. Lu C, Vickers MF, Kerbel RS. Interleukin 6: a fibroblast-derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:9215-9.
29. Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Bröcker EB. Elevated serum levels of interleukin 10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res.* 1995;5:67-8.
30. Fortis C, Foppoli M, Gianotti L, et al. Increased interleukin 10 levels in patients with solid tumours. *Cancer Lett.* 1996;104:1-5.
31. Mouawad R, Benhammouda A, Rixe O, et al. Endogenous interleukin 6 levels in patients with metastatic malignant melanoma: correlation with tumor burden. *Clin Cancer Res.* 1996;2:1405-9.
32. Deichmann M, Benner A, Waldmann V, Bock M, Jäckel A, Näher H. Interleukin 6 and its surrogate C-reactive protein are useful serum markers for monitoring metastasized malignant melanoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2000; 19:301-7.
33. Boyano MD, García-Vázquez MD, López-Michelena T, et al. Soluble interleukin 2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin 10 serum levels in patients with melanoma. *Br J Cancer.* 2000;83:847-52.
34. Redondo P, Sánchez-Carpintero I, Bauzá A, Idoate M, Solano T, Mihm MC, Jr. Immunologic scape and angiogenesis

- in human malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49:255-63.
35. Kishimoto T, Akira S. interleukin 6 and its receptor, a paradigm for cytokines. *Science.* 1992;258:593-7.
 36. Kishimoto T. The biology of interleukin 6. *Blood.* 1989;74:1-10.
 37. Kerbel RS. Expression of multi-cytokine resistance and multigrowth factor independence in advanced stage metastatic cancer. Malignant melanoma as a paradigm. *Am J Pathol.* 1992;141:519-24.
 38. Levy Y, Tsapis A, Brouet JC. interleukin 6 antisense oligonucleotides inhibit the growth of human myeloma cell lines. *J Clin Invest.* 1991;88:696-9.
 39. Lu C, Kerbel RS. interleukin 6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J Cell Biol.* 1993;120:1281-8.
 40. Zhou D, Munster A, Winchurch RA. Pathologic concentrations of interleukin 6 inhibit T cell responses via induction of activation of TGF- β . *FASEB J.* 1991;5:2582-5.
 41. Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E. Patterns of interleukin 6 gene expression *in vivo* suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87: 3092-6.
 42. Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol.* 1992;148:1143-8.
 43. Weiss E, Mamelak AJ, La Morgia S, et al. The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. *J Am Acad Dermatol.* 2004;50:657-75.
 44. Sato T, McCue P, Masuoka K, et al. Interleukin 10 production by human melanoma. *Clin Cancer Res.* 1996;2: 1383-90.
 45. Nemunaitis J, Fong T, Shabe P, Martineau D, Ando D. Comparison of serum interleukin 10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. *Cancer Invest.* 2001;19:239-47.
 46. Huang S, Xie K, Bucana CD, Ullrich SE, Bar-Eli M. Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 1996;2:1969-79.
 47. Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F, et al. interleukin 10 inhibits tumor metastasis through and NK cell-dependent mechanism. *J Exp Med.* 1996;184:579-84.
 48. Berman RM, Suzuki T, Tahara H, Robbins PD, Narula SK, Lotze MT. Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective, specific and long-lasting immune response against established tumors in mice. *J Immunol.* 1996; 157:231-8.
 49. Martínez-Escribano JA, Moya-Quiles MR, Muro M, et al. interleukin 10, interleukin 6 and interferon- γ gene polymorphisms in melanoma patients. *Melanoma Res.* 2002; 12:465-9.
 50. Merville P, Rousset F, Banchereau J, Klein B, Bacaille R. Serum interleukin 10 in early stage multiple myeloma. *Lancet.* 1992;340:1544-5.
 51. Cascinelli N, Belli F, MacKie RM, Santinami M, Bufalino R, Morabito A. Effect of long term adjuvant therapy with interferon alpha 2a in patients with regional node metastases from cutaneous melanoma: A randomized trial. *Lancet.* 2001;358:866-9.
 52. Cameron DA, Cornbleet MC, MacKie RM, et al. Adjuvant interferon alpha 2b in high risk melanoma – the Scottish Study. *Br J Cancer.* 2001;84:1146-9.
 53. Moschos SJ, Kirkwood JM, Konstantinopoulos PA. Present and future prospects for adjuvant therapy of melanoma: time to build upon the foundation of high-dose interferon alfa-2b. *J Clin Oncol.* 2004;22:11-4.