

Potenciación del efecto inmunestimulante del azimexon por la aclacinomicina

C.E. Andrade-Mena, S. Orbach-Arbouys
y G. Mathe

Hôpital Universitaire Paul-Brousse. Institut de Cancérologie et
d'Immunogénétique et Unité de Pharmacologie Humaine des
Cancers. 94804 Villejuif, Francia.

Potentiation of the immuno-stimulating effect of azimexon by aclacinomycin

The stimulatory effect of the optimal dose of azimexon 25 mg/kg on the immune response in mice, can be potentiated by the administration of aclacinomycin in a dose of 4 mg/kg when this drug is given 3 days after azimexon.

We studied the combined effect of azimexon and aclacinomycin on the immune response to sheep red blood cells, utilizing the direct splenic plaque forming cells (19 S) assay and the delayed hypersensitivity reaction to oxazolone.

This potentiation that was observed in both normal and fibrosarcoma C 3-9 bearing mice, suggest a possible clinically useful of these types of combinations.

El efecto estimulante de la respuesta inmune en el ratón por el azimexon, a la dosis óptima de 25 mg/kg, puede ser potenciado por la administración de aclacinomicina a la dosis de 4 mg/kg cuando este fármaco es administrado 3 días después del azimexon.

Nosotros hemos evaluado la interacción de la combinación de estos agentes en la respuesta a los hematies de carnero medida por la técnica de las células formadoras de placas de hemólisis directas (19 S) y por la reacción de hipersensibilidad retardada a la oxazolona.

Este efecto potenciador, observado tanto en ratones normales como en ratones portadores del fibrosarcoma C 3-9, sugirió la posible utilidad clínica de este tipo de combinaciones.

INTRODUCCION

Se ha demostrado que la aclacinomicina potencia la respuesta inmune al igual que el efecto inmunestimulante del BCG¹. También se ha informado que el azimexon incrementa la reacción de hipersensibilidad retardada y la formación de anticuerpos en el ratón² y que este inmunoadyuvante incrementa el porcentaje de linfocitos T en el hombre^{3,4}.

El objetivo de este trabajo fue investigar si la administración combinada de la aclacinomicina y del azimexon podría potenciar aún más la respuesta inmune que como lo hace cada agente por separado.

MATERIAL Y METODOS

Animales y células tumorales

Se utilizaron ratones libres de gérmenes patógenos C₃H/He y (C57BL/6 × DBA₂) F₁, de 6-8 semanas de edad,

Este trabajo fue realizado gracias a los contratos de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (DGRST) N.º 78-2646 y del Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), ATP N.º 59-7891. C.E. Andrade-Mena recibió beca del CONACYT y de la Universidad de Guadalajara, México.

Correspondencia y separatas: C.E. Andrade-Mena, Hôpital Universitaire Paul-Brousse Institut de Cancérologie et d'Immunogénétique et Unité de Pharmacologie Humaine des Cancers. 94804 Villejuif, Francia.

obtenidos del criadero del Centre National de la Recherche Scientifique en Orléans-la Source, Francia. Los animales fueron conservados en condiciones asepticas y utilizados en las 2 semanas siguientes a su llegada al instituto.

El tumor C 3-9 fue proporcionado por la Dra. Lespinats del IRSC de Villejuif, Francia. Este es un fibrosarcoma inducido por el metilcolantreno, el cual es mantenido por trasplantes seriados a receptores singénicos. Para ello los tumores fueron homogeneizados en medio de cultivo adicionado de tripsina. Para el trasplante se inocularon en el abdomen por vía intradérmica 10⁶ células C 3-9 lavadas. Los animales fueron utilizados cuando el tumor alcanzó 1 cm de diámetro.

El número de animales de cada grupo experimental osciló entre 6 y 8.

Fármacos

La aclacinomicina es un antibiótico citotóxico aislado de los cultivos de *Streptomyces galileus*, proporcionado por el laboratorio Roger Bellon, Francia. Se disolvió en NaCl 0,15 M y se inyectó por vía intraperitoneal a la dosis de 4 mg/kg, 4 días antes que el antígeno.

El azimexon (BM 12.531) o 2-[2-cianoaziridinilo (1)]-2-[2-carbonilaziridinilo (1)] propano fue obtenido del laboratorio Boehringer Mannheim GmbH, Rep. Fed. Alemana, y fue administrado intraperitonealmente a la dosis de 25 mg/kg, 7 días antes que el antígeno.

Antígenos

Globulos rojos de carnero (GRC) lavados tres veces con NaCl 0,15 M y suspendidos al 10 %.

TABLA I Aumento del efecto estimulante del azimexon por la aclacinomicina en la respuesta de las células esplénicas formadoras de placas de hemólisis contra GRC en ratones normales

Grupos de ratones normales tratados con	CFP directas/bazo (Media ± DE)	
Nada	46.400 ± 7.561	} α = 0,01
Azimexon	55.760 ± 6.509	
Aclacinomicina	53.960 ± 8.180	} α = 0,02
Azimexon y aclacinomicina	68.080 ± 6.176	

El día 0 fue el día de la inyección intraperitoneal del antígeno (0,5 ml de una suspensión de GRC al 10%). El azimexon (25 mg/kg) y la aclacinomicina (4 mg/kg) fueron inyectados intraperitonealmente, 7 y 4 días, respectivamente, antes que el antígeno. El número de CFP directas anti-GRC fue evaluado 5 días después de haber administrado los GRC.

TABLA II Aumento del efecto estimulante del azimexon por la aclacinomicina en la respuesta de las células esplénicas formadoras de placas de hemólisis contra Ø GRC en ratones portadores de tumores

Grupos de ratones portadores de tumores tratados con	CFP directas/bazo (Media ± DE)
Nada	78.200 ± 3.569
Azimexon	105.120 ± 2.142
Aclacinomicina	92.800 ± 4.019
Azimexon y aclacinomicina	114.540 ± 2.237

El tumor fue inducido por la inoculación intradérmica de 10⁵ células del fibrosarcoma C 3-9. El número de células esplénicas formadoras de placas de hemólisis fue determinado 5 días después de la inyección de 0,5 ml de una suspensión al 10% de GRC. El azimexon fue inyectado intraperitonealmente a la dosis de 25 mg/kg y la aclacinomicina a la dosis de 4 mg/kg. El azimexon y la aclacinomicina fueron administrados 7 y 4 días antes, respectivamente, que el antígeno. Las diferencias entre todos los grupos fueron estadísticamente significativas (p < 0,01).

La 4-etoximetilfenil-2-fenil oxazolona fue obtenida de BDH Ltd., Poole, Inglaterra.

Recuento de células formadoras de placas de hemólisis (CFP)

El número de células formadoras de placas de hemólisis frente a GRC fue determinada según la técnica descrita por Cuningham⁵, 5 días después de la inyección intraperitoneal de 0,5 ml de una suspensión de GRC al 10%.

Reacción de hipersensibilidad retardada (HSR)

Sobre la piel depilada de la región dorsal de los animales se aplicó 0,1 ml de una solución de oxazolona al 3% (w/v) disuelta en acetona. Seis días más tarde se aplicó en una oreja 20 µl de una segunda dosis reveladora de oxazolona al 0,5% (w/v) disuelta en volúmenes iguales de acetona y aceite de oliva. Se midió el espesor de la oreja con un micrómetro 24 h después de aplicada la dosis reveladora. La diferencia entre la oreja tratada y la opuesta sirvió como indicadora del grado de inflamación provocada por la reacción al hapteno sensibilizante⁶.

TABLA III Aumento del efecto estimulante del azimexon por la aclacinomicina en la hipersensibilidad a la oxazolona en ratones normales

Grupos de ratones normales tratados con	Inflamación de la oreja 1/10 mm (Media ± DE)	
Nada	9,8 ± 1,1	} α < 0,01
Azimexon	21,0 ± 0,7	
Aclacinomicina	20,0 ± 0,7	
Azimexon y aclacinomicina	25,2 ± 0,4	

El azimexon fue inyectado intraperitonealmente a la dosis de 25 mg/kg y la aclacinomicina a la dosis de 4 mg/kg. El día 0 fue el día de la sensibilización por la oxazolona. El azimexon y la aclacinomicina fueron administradas 7 y 4 días antes, respectivamente, que el antígeno.

TABLA IV Aumento del efecto estimulante del azimexon por la aclacinomicina en la hipersensibilidad a la oxazolona en ratones portadores de tumores

Grupos de ratones portadores de tumores tratados con	Inflamación de la oreja 1/10 mm (Media ± DE)	
Nada	1,6 ± 1,6	} α < 0,01
Azimexon	9,0 ± 2,0	
Aclacinomicina	5,8 ± 1,3	
Azimexon y aclacinomicina	14,2 ± 1,6	

El tumor fue inducido por la inoculación intradérmica de 10⁵ células del fibrosarcoma C 3-9. El azimexon fue inyectado intraperitonealmente a la dosis de 25 mg/kg y la aclacinomicina a 4 mg/kg. El día 0 fue el día de la sensibilización por la oxazolona. El azimexon y la aclacinomicina fueron administrados 7 y 4 días, respectivamente, antes que el antígeno.

Análisis estadísticos

Las comparaciones estadísticas se hicieron utilizando la prueba de U de Mann-Whitney que es una prueba no paramétrica.

RESULTADOS

Efecto del azimexon y de la aclacinomicina sobre las CFP directas

En los animales normales la aplicación de la combinación de azimexon y aclacinomicina demostró causar el mejor efecto estimulante (68.080, α = 0,02) que la aplicación del azimexon (55.760, α = 0,01) o de la aclacinomicina (53.963 α = 0,01) solos, cuando fueron comparados con los controles (46.400) (tabla I).

Los mismos efectos fueron observados en los animales portadores de tumor en los cuales la aplicación de la combinación azimexon y aclacinomicina fue la que indujo el efecto estimulante más acentuada (114.540, α = 0,01) cuando fue comparado con el efecto del azimexon (105.120, α = 0,01) o el de la

aclacinomicina (92.800, $\alpha = 0,01$), que tuvieron sólo una respuesta superior a la del grupo control (78.200) (tabla II).

Efecto del azimexon y de la aclacinomicina sobre la HSR a la oxazolona

El grupo de animales normales a los cuales se les administró la combinación de azimexon y aclacinomicina fue el que respondió en forma más acentuada a la oxazolona, mientras que el que recibió el azimexon solo, mostró un aumento de la reacción que fue superior a la observada en el que recibió aclacinomicina y también a la del grupo control (tabla III). Resultados paralelos fueron obtenidos en los animales portadores de tumores en los cuales esta reacción se encuentra normalmente deprimida (tabla IV).

DISCUSION

Los resultados mostraron que el tratamiento con la aclacinomicina posterior a la aplicación del azimexon potencia el efecto de éste. Este efecto potenciador de la aclacinomicina puede ser debido a la eliminación de células supresoras, como se ha descrito previamente¹⁰.

Asimismo, podemos pensar que la aclacinomicina elimina las células supresoras normalmente presentes en el animal, además de las que pueden ser inducidas por el azimexon. En cuanto a este agente, se sabe que incrementa el número de células T⁴, sin poder precisar si aumenta la subpoblación de células T ayudantes, la de T supresoras o ambas. Podemos pensar que al igual que hacen otros agentes inmunoadyuvantes, el azimexon puede inducir ambos tipos de células además de potenciar la respuesta inmune^{7, 8}, y que por ello la combinación de estos agentes resultará más efectiva que la aplicación de ellos por separado.

Por otra parte, la eliminación de las células supresoras en el individuo portador de tumor es bastante importante, ya que hay evidencia de que las células supresoras son las responsables de la inmunodepresión en estos casos⁹, y que la restauración de la integridad del sistema inmune es importante para obtener la inhibición del crecimiento tumoral.

Otros autores han informado de la obtención de resultados positivos con este tipo de combinaciones en animales normales¹⁰, pero negativos en animales portadores de tumores¹¹. De ahí surge la necesidad de precisar cómo la interacción entre los agentes inmuno y quimioterapéuticos puede afectar el sistema

inmune de los animales normales o portadores de tumores, así como considerar cuál es la secuencia ideal para la aplicación más adecuada de estos agentes, y poder así utilizarlos clínicamente.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Dr. Héctor Gómez Estrada su ayuda en la preparación de este manuscrito.

Bibliografía

1. Orbach-Arbouys S, Andrade-Mena CE, Berardet M, Mathe G. Potentiated immune response after administration of aclacinomycin. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1982; 68:117-121.
2. Schultz JI, Florentin I, Bourret C, Bicker U, Mathe G. Delayed type hypersensitivity response and humoral antibody formation in mice treated with a new immunostimulant 2-[2-cyano-aziridinyl(1)]-2-[2-carbomoyl aziridinyl (1)] propane, BM 12.531 IRCS Med Sci 1978; 6:215.
3. Bicker U. Immunomodulating effects of BM 12531 in animals and tolerance in man. *Cancer Treat Rep* 1978; 62:1.987-1.990.
4. Boerner D, Bicker U, Ziegler AE, Stosiek V, Peters HJ. Influence of BM 12.531 (Prop. inn azimexon) on the lymphocyte transformation and the percentage of active T-lymphocytes in vivo and in vitro in man. *Cancer Immunol Immunother* 1979; 6:237-242.
5. Cunningham AJ, Szmberg A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. *Immunology* 1968; 14:599-600.
6. Asherson GL, Ptak W. Contact and delayed hypersensitivity in the mouse I. Active sensitization and passive transfer. *Immunology* 1968; 15:405-416.
7. Florentin I, Huchet R, Bruley-Rosset M, Halle-Panenko O, Mathe G. 1976. Studies on the mechanisms of action of BCG. *Cancer Immunol Immunother* 1976; 1:31-39.
8. Orbach-Arbouys S, Poupon MF. Active suppression of in vitro reactivity of spleen cells after BCG treatment. *Immunology* 1978; 34:431-437.
9. Naor D. Suppressor cells: permitters and promoters of malignancy. *Adv Cancer Res* 1979; 29:45, 125.
10. Dimitrov NV, Denny TN, La Vigne R. Immune responses during administration of adriamycin and *Corynebacterium parvum*. *Clin Immunol Immunopathol* 1978; 9: 177-183.
11. Dimitrov NV, Denny TN, Weisman MF, Cameron DG. Effect of adriamycin and *Corynebacterium parvum* in tumor bearing mice: modulation of response to sheep red blood cells. *JNCI* 1979; 63:423-426.