

ARTICULO ORIGINAL

**RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES
ANGIOGÉNICOS Y EL RECLUTAMIENTO DE LINFOCITOS EN
CARCINOMAS MAMARIOS HUMANOS**

Dra. LAGUENS, Graciela *¹; CORONATO, Silvia *; BENENCIA, Fabián ♣ y DI GIROLAMO, Vanda *
Cátedra de Patología B

♣ Center for Research in Reproduction and Women's Health. University of Pennsylvania, Philadelphia, USA.
Facultad de Ciencias Médicas. U.N.L.P.
Calle 60 y 120 (1900) La Plata. Buenos Aires. Argentina

RESUMEN:

La presencia de un infiltrado inflamatorio mononuclear en los tumores malignos es un hecho frecuente que fue relacionado durante años con buen pronóstico. Sin embargo, aún no está del todo aclarado el mecanismo de reclutamiento de las células inmunes hacia el tumor ni por qué las células efectoras de la respuesta inmune no ejercen su acción antitumoral. Una variedad de cáncer de mama denominada carcinoma medular caracterizada por crecimiento celular sólido y un denso infiltrado linfocitario, presenta una pronóstico mejor comparado con los tipos histológicos más comunes. Está bien establecido que el flujo de leucocitos a los tumores está asociado a la angiogénesis. En este estudio demostramos por inmunohistoquímica en carcinomas mamarios, que la presencia de linfocitos T CD4+ (helper) está fuertemente correlacionada con la expresión de VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor) y de ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule). Sin embargo el número de linfocitos T CD8+ en el infiltrado intratumoral supera ampliamente al de CD4+ pero no se correlaciona con dichas moléculas, hecho que sugiere la existencia de otros mecanismos de reclutamiento. También se detectaron pocos casos que presentaban células NK CD57+ intratumorales y en aquellos que eran positivos su número era escaso. Resulta paradójico que pese a la presencia de células efectoras de una respuesta inmune celular en el microambiente tumoral, las células tumorales no sean rechazadas o eliminadas. Son necesarias más investigaciones para determinar el grado de funcionalidad de los linfocitos T helper y T citotóxicos intratumorales, ya que los hallazgos de este trabajo son absolutamente preliminares.

*¹Dirección Electrónica del Autor Responsable: Dra. Graciela Laguens: glaguens@atlas.med.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La presencia de un infiltrado inflamatorio mononuclear en los tumores malignos es un hecho frecuente que fue relacionado durante años con buen pronóstico de la enfermedad ¹. Una variedad de cáncer de mama, denominada carcinoma medular caracterizada por un patrón de crecimiento celular sólido y un denso infiltrado linfocitario, exhibe un pronóstico mejor comparado con los tipos histológicos más comunes tales como el carcinoma ductal infiltrante y el lobulillar infiltrante ². El inmunofenotipo de esas poblaciones linfocitarias ha sido caracterizado por diferentes autores los que han demostrado un predominio de linfocitos T citotóxicos, macrófagos y células dendríticas y una gran pobreza en células NK y linfocitos B. La presencia de la población T citotóxica/supresora y de macrófagos representaría la resistencia del huésped contra el cáncer y explicaría, en parte y en forma simplista, el buen pronóstico de esta variedad histológica ³. Sin embargo, en los carcinomas ductal y lobulillar infiltrantes tanto la estroma como los cordones tumorales también se encuentran infiltrados por células linfocitarias dispersas o en acúmulos focales. Su análisis inmunofenotípico ha arrojado resultados diferentes en la bibliografía; así mientras algunos autores encontraron aumento de los linfocitos CD4+ intratumorales respecto a los CD8+ ⁴, otros demostraron lo contrario.⁵ Esta discrepancia, podría atribuirse a los distintas técnicas de evaluación. Por otra parte, aún no está del todo aclarado el reclutamiento de las células inmunes hacia el tumor ni por qué las células efectoras de la respuesta inmune no ejercen una acción antitumoral eficaz. Está bien establecido que el reclutamiento de leucocitos a los sitios de lesión y/o tumor está asociado a la angiogénesis. En estos últimos años, se ha focalizado la atención en dos moléculas relacionadas con la angiogénesis. Una de ellas es la molécula de adhesión, denominada ALCAM, CD166 (sigla inglesa de Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule) que regula una variedad de funciones celulares tales como la migración, la respuesta inflamatoria y la angiogénesis. Se expresa en monocitos activados y células endoteliales como también en células tumorales. Su ligando se expresa en la superficie de linfocitos T activados. ⁶ En los tumores, ALCAM ha sido descrito en células malignas primarias de melanoma y en las metastásicas como también en líneas celulares de carcinoma de mama, pulmón, colon y próstata. En carcinoma de mama, un fuerte expresión en el citoplasma, se considera como un nuevo marcador biológico de mal pronóstico.⁷

La otra molécula es el VEGF (sigla inglesa de Vascular Endothelial Growth Factor) que cumple importantes roles tanto en la angiogénesis fisiológica como patológica. Estimula la proliferación endotelial y actúa como una citoquina proinflamatoria induciendo la expresión de moléculas de adhesión endotelial y de moléculas quimiotácticas para monocitos y linfocitos. ⁸

Basándonos en estas observaciones, iniciamos este estudio que consistió en la caracterización de linfocitos T CD4+ (Helper), linfocitos T CD8+ (Citotóxicos), células NK (natural killer CD57+), de factores angiogénicos (VEGF) y de moléculas de adhesión (ALCAM) en carcinomas de mama, con el fin de investigar la relación entre el reclutamiento de estas células efectoras de la respuesta inmune y algunos factores que regulan la vasculogénesis y la adhesión celular.

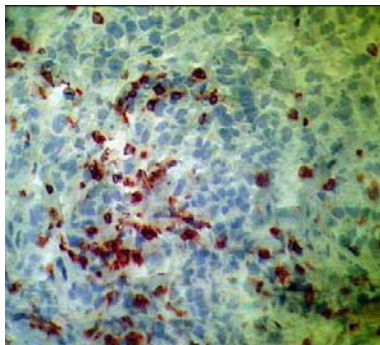


Fig.1: Linfocitos CD8+ intratumorales (x250)

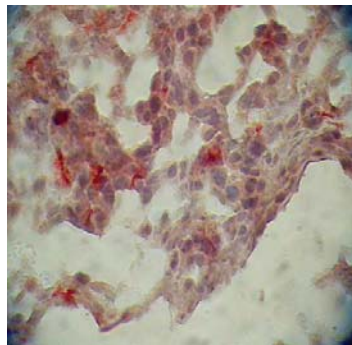


Fig. 2: Linfocitos CD4+ intratumorales (x400)

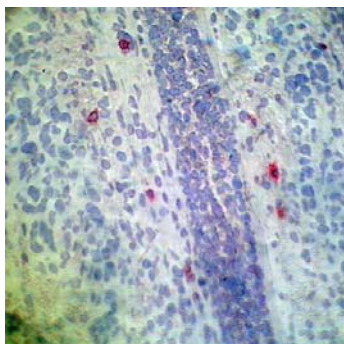


Fig. 3: Células NK CD57+ intratumorales (x250)

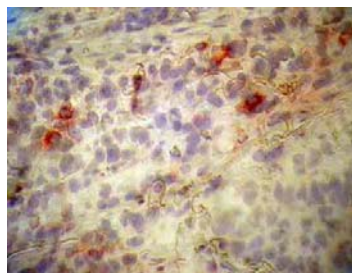


Fig. 4: Expresión de ALCAM en las células tumorales (x 250)

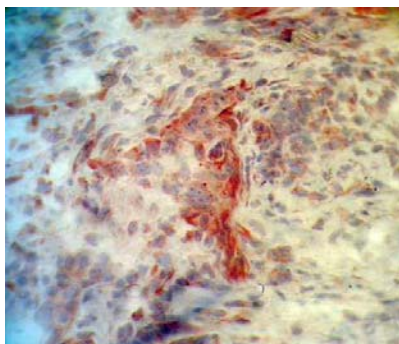


Fig. 5: Expresión de VEGF en las células endoteliales de vasos intratumorales

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 15 carcinomas de mama provenientes de pacientes cuyas edades oscilaron entre los 43 y 75 años y cuyos tipos histológicos, gradación y clasificación TNM figuran en la tabla 1. El material obtenido en el acto quirúrgico fue inmediatamente introducido en OCT (medio de imbibición sintético) para su conservación en frío y cortado en un criostato a -20°C . Los cortes obtenidos de 5 μm de espesor se colocaron en portaobjetos silanizados.

Tabla 1

Histología	Grado histológico	TNM	ALCAM	VEGF	CD4	CD8	CD57
CIS	II	T1N0M0	0	1	1	1	0
CDI	II	T2N0M0	0	0	0	1	0
CDI	III	T2N0M0	1	1	2	3	0
CDI	II	T2N0M0	1	0	0	1	0
CA. NOS	III	T3N0M0	0	0	0	3	0
CLI	II	T2N1M0	1	1	2	2	1
CLI	II	T2N1M0	0	0	0	2	0
CDI	III	T1N0M0	1	1	2	3	0
NOS	III	T2N0M0	0	1	2	3	1
CA TUBULAR	I	T1N0M0	0	0	0	3	0
CDI	III	T3N0M0	1	1	1	3	0
CDI	II	T2N0M0	1	1	3	2	2
CDI	II	T1N0M0	0	1	0	0	0
CDI	II	T1N0M0	0	0	0	1	0
CDI	II	T2N1M0	0	0	0	3	0

NOTA:

CDI: carcinoma ductal infiltrante

CLI: carcinoma lobulillar infiltrante

NOS: carcinoma de mama sin otra especificación

Ca.tubular

CIS: Carcinoma In Situ

Sobre ellos se efectuaron técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales CD4 (linfocitos T helper) CD8 (linfocitos T citotóxicos/supresores) CD57 (Natural Killer), ALCAM y VEGF de origen comercial. Todos los antisueros fueron proporcionados por el Dr. Fabián Benencia del *Center for Research in Reproduction and Women's Health, University of Pennsylvania, Philadelphia USA* (tabla 2). La inmunomarcación se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: incubación durante una hora con el antisuero primario a temperatura ambiente previo bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% por espacio de 20 minutos. Posteriormente los cortes se incubaron 30 minutos con el antisuero secundario biotinilado para más tarde hacerlo con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa.

Como control negativo, se reemplazó la incubación con el antisuero primario específico por PBS. En todos los pasos, los lavados se hicieron con PBS (Phosphate Buffer Saline). Para el revelado se utilizó ethyl-carbazol como cromógeno y la Hematoxilina de Mayer como contracoloración. Como medio de montaje se utilizó gelatina glicerizada. La inmunomarcación fue evaluada según el método modificado de Ben-Ezra y Shiehani : 0= ausencia de positividad; 1+= 0 a 50 % de células marcadas; 2+= 50-75% de células marcadas; 3+= 75-100% de células marcadas. Los datos en cada grupo fueron analizados y comparados estadísticamente por el Test de Correlación Lineal de Pearson.

Tabla 2

Anticuerpo	Origen comercial	Expresión principal
Anti-CD4	DAKO CYTOMATION	T Colaboradores
Anti-CD8	BD Biosciences	T citotóxicos/supresores
Anti-CD57	DAKO CYTOMATION	Células NK, linfocitos T activados
Anti- ALCAM	R and D Systems	Molécula de adhesión leucocitaria
Anti-VEGF	Santa Cruz Biotechnology	Células endoteliales
Enzyme Staining System	Vector Laboratories	Anti- Mouse Universal Reagent

RESULTADOS

Los diagnósticos histológicos de los casos de carcinoma mamario, su gradación y ubicación dentro de la clasificación TNM junto con resultados del análisis inmunohistoquímico están volcados en la tabla 1. La gradación histológica de los casos de carcinoma mamario, se realizó según la clasificación de Bloom y Richardson modificada⁹. Se pudo demostrar que la población celular NK CD57+ estaba prácticamente ausente en casi todos los casos (13%). En los pocos casos que presentaban células NKCD57+, éstas se ubicaban exclusivamente en los cordones tumorales, en forma dispersa (Fig.3).

La población linfoidea T predominante fue la de los linfocitos CD8+, tanto en la densidad como en el porcentaje (93%) de los casos. La densidad y porcentaje (54%) de linfocitos T CD4+, en relación con los CD8+, fue menor en ambos casos. Los linfocitos T CD4+ y los CD8+ se ubicaban tanto en la estroma como en los cordones tumorales (Fig. 1 y 2). La positividad para ALCAM en las células tumorales se demostró en casi 50% de los casos, siendo un poco mayor la de VEGF (60% de los casos) (Fig. 4 y 5). La expresión de VEGF y de ALCAM se correlacionaron significativamente ($r = 0.4910$ $p < 0,05$), indicando que en general los casos de carcinoma mamario que expresan ALCAM también expresan VEGF. Se encontró correlación significativa entre la expresión de ALCAM y VEGF con los linfocitos CD4+ ($r = 0.6378$, $p < 0.01$ y $r = 0.7916$, $p < 0.0004$ respectivamente). Respecto a la correlación entre la densidad de linfocitos T CD8+ y la expresión de ALCAM y VEGF, el coeficiente de correlación (r) fue de 0,2182, $p < 0,4$ y $r = 0,6250$ $p < 0.8$ respectivamente, indicando la ausencia de asociación entre estas moléculas y la población T CD8+. Por otro lado, no se encontró correlación entre la expresión de ALCAM y VEGF con el grado ni con el tipo histológico.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados indican que las células tumorales del carcinoma mamario pueden expresar en forma conjunta ALCAM y VEGF. Por otra parte, observamos que la presencia de linfocitos T CD4+ que juegan un rol central en la amplificación y regulación de la respuesta inmune celular, está fuertemente correlacionada con la expresión de estas moléculas. Sin embargo, el número de linfocitos T CD8+ en el infiltrado intratumoral supera ampliamente al de CD4+. Los linfocitos T CD8+ constituyen las principales células efectoras de la respuesta inmune adaptativa, capaces de lisar a las células tumorales.

El VEGF, considerado una citoquina multifuncional, además de actuar como promotor de la angiogénesis, es un factor regulador del tráfico de células T tanto en órganos y tejidos linfáticos como no linfáticos. Actúa sobre células endoteliales promoviendo la expresión de moléculas de adhesión, como E-selectina, ICAM-1 y VCAM, así como la expresión de genes de la quimioquina IP10, que tiene su receptor CxCR3 en linfocitos T⁸.

ALCAM tiene, entre otras funciones, la de favorecer la migración celular. Su ligando está presente en numerosas células, incluidos los linfocitos CD4+ y CD8+ activados. De esta manera, la afluencia de células T en el infiltrado intratumoral podría responder a la expresión de ambas moléculas sobre las células tumorales.

En trabajos previos en nuestro laboratorio ¹⁰, hemos demostrado en ganglios linfáticos regionales de pacientes portadoras de cáncer mamario, un predominio de linfocitos CD8+ sobre CD4+ con inversión de la fórmula normal.

La correlación entre la expresión de moléculas de adhesión y de factores angiogénicos con la infiltración de linfocitos T helper, sugieren que estas moléculas están efectivamente implicadas en su reclutamiento intratumoral. En cambio, el flujo de linfocitos T citotóxicos no parece estar correlacionado con estas moléculas, hecho que sugiere la existencia de otros mecanismos de reclutamiento. Sin embargo, resulta paradójico que pese a la presencia de células efectoras de una respuesta inmune celular en el microambiente tumoral, las células tumorales no sean rechazadas o eliminadas.

Las células NK junto con los linfocitos T median los estadios iniciales de la vigilancia inmunológica. Son capaces de eliminar las células tumorales y reclutar monocitos in vivo. De esta manera la pobreza de células NK en el infiltrado intratumoral podría contribuir a la progresión de las neoplasias ^{11,12}.

Serán necesarias más investigaciones para determinar el grado de funcionalidad de los linfocitos T helper y T citotóxicos, ya que los hallazgos de este trabajo son absolutamente preliminares.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Ishigami, S et al. *Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma*. Cancer 2000; 88, 577-583
- 2.- Gaffey, MJ et al. *Medullary carcinoma of the breast. Identification of lymphocyte subpopulations and their significance*. Mod.Pathol 1993; 6:721-728
- 3.- Kuroda, H. et al. *Immunophenotype of lymphocytic infiltration in medullary carcinoma of the breast*. Virchows Arch. 2005; 446:10-14
- 4.- Bilik R et al. *Characterization of T-lymphocyte subpopulations infiltrating primary breast cancer*. Cancer Immunol. Immunother. 1989 28,(2): 143-147
- 5.- Georgiannos SN et al. *The immunotherapy and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancers, the role of the major histocompatibility complex in cell-mediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicators*. Surgery 2003;134: 827-834
- 6.- Ikeda K et al. *Molecular isolation and characterization of a soluble isoform of activated leukocyte cell adhesion molecule that modulates endothelial cell function*. J.Biol.Chem. 2004; 279 (53): 55315-55323
- 7.- Dietel M et al. *Cytoplasmatic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer*. J. Clin.Pathol. 2006; 59(4): 403- 409
- 8.- Reinders Marlies E.J. et al. *Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity*. J Clin Invest 2003, 112(11):1655-1665
- 9.- Bloom HJG et al. *Histologic grading and prognosis in breast cancer: A study of 1709 cases of which 359 have been followed for 15 years*. Br.J.Cancer 1957; 2: 353-377.
- 10.- Di Girolamo V, Laguens R, Coronato S, Salas M, Portiansky E and Laguens G. *Quantitative and functional study of breast cancer axillary lymph nodes and those draining other human malignant tumors*. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2000;19;2: 155-159
- 11.- Shingu K, Helfritz A, et al. *Kinetics of the early recruitment of leukocyte subsets at the sites of tumor cells in the lung: natural killer cells rapidly attract monocytes but not lymphocytes in the surveillance of micrometastasis*. Int. J. Cancer 2002 ;May 1;99:74-81

12. –Fogler WE, Kirk V. et al. *Recruitment of hepatic NK Cells by IL-12 is dependent on IFN- γ and VCAM-1 and is rapidly down-regulated by a mechanism involving T cells and expression of Fas. J.Immunol.* 1998, 161:6014-6021