

Caracterización de linfocitos T en la respuesta inmune de variedades histológicas de tumores malignos de mamas

Characterization of the T cells to the immune answer of histologic varieties of malignant tumors of the breast

Dra. Jenny Yorllana Luna Esquivel; Dra. Honey González Núñez; Lic. Clara María Febles Almeida; Dra. Yamira López García

Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay .Camagüey, Cuba.

RESUMEN

Fundamento: Cuba, como otros países, investiga para dilucidar los mecanismos de defensa antitumoral y la obtención de productos inmunomoduladores con potencial terapéutico y antitumoral.

Objetivo: caracterizar los linfocitos T que infiltran estos tumores, a través del método de inmunofluorescencia indirecta, con la utilización de anticuerpos monoclonales anti-CD3, CD4 y CD8.

Método: se realizó un estudio descriptivo a 41 pacientes operadas de carcinoma de mama, en el Hospital Provincial Oncológico Marie Curie de la provincia de Camagüey, desde mayo de 2005 hasta mayo de 2006. Las muestras de tejido se obtuvieron por extirpación quirúrgica del tumor o glándula mamaria, con diagnóstico positivo de carcinoma. Se realizó la identificación cualitativa de estos linfocitos en los tejidos y se determinó la intensidad del marcaje.

Resultados: de 41 pacientes, 37 presentaron carcinoma ductal infiltrante, 32 de tipo convencional y cinco del tipo comedocarcinoma, el resto presentó carcinoma lobulillar infiltrante; la mayor intensidad del marcaje lo tuvo el comedocarcinoma. La intensidad del marcaje del linfocito T fue mayor para CD3 y CD4 y menor para el CD8.

Conclusiones: se encontraron tres variedades histológicas, carcinoma ductal infiltrante convencional, ductal tipo comedocarcinoma y lobulillar infiltrante, el más frecuente fue el de tipo convencional; sin encontrarse diferencia de respuesta al no detectarse cambios notables en el marcaje.

DeCS: Linfocitos T/inmunología; neoplasias de la mama

ABSTRACT

Background: Cuba, as other countries, investigates to elucidate the antitumoral defense mechanisms and the obtainment of immunomodulator products with therapeutic and antitumoral potential.

Objective: to characterize the T cells that infiltrate these tumors, through the indirect immunofluorescence method, with the use of anti-CD3, CD4 and CD8 monoclonal antibodies.

Method: a descriptive study to 41 patients operated of carcinoma of the breast was performed, in the Oncological Provincial Hospital Marie Curie of Camagüey province, from May 2005 to May 2006. The tissue samples were obtained by surgical extirpation of the tumor or mammary gland, with positive diagnosis of carcinoma. It was carried out the qualitative identification of these lymphocytes in the tissues and the radiolabel intensity was determined.

Results: out of 41 patients, 37 presented infiltrating ductal carcinoma, 32 of conventional type and five of comedocarcinoma type, the rest presented infiltrating lobular carcinoma; the comedocarcinoma had the biggest intensity in the radiolabel. The radiolabel intensity of the T cell was bigger for CD3 and CD4 and minor for CD8.

Conclusions: three histologic varieties were found, conventional infiltrating ductal carcinoma, ductal type comedocarcinoma and infiltrating lobular, the most frequent was the conventional type; no difference answer was found since were not detected remarkable changes in the radiolabel.

DeCS: Tcells/immunology;neoplasia of the breast

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la tercera causa más frecuente de cáncer en el mundo (796 000 pacientes en 1990) y la de más alta incidencia en las mujeres (21 % de todos los pacientes nuevos), con una tasa de crecimiento anual del 0,5 %, por lo que se esperan 1,35 millones de pacientes para el 2010. En el mundo, mueren anualmente alrededor de 314 000 mujeres por esta enfermedad, lo que representa el 14 % de todas las muertes por cáncer en el sexo femenino.¹

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres de los países desarrollados. Se calcula que en Europa aparecerán unos 130 000 pacientes al año, lo que representa entre un 20 y un 25 % de todos los cánceres de las mujeres. La incidencia anual dentro de los países europeos es variable, entre 50 y 70 por cada 100 000 mujeres en los países nórdicos y occidentales, y de 25 a 40 por cada 100 000 mujeres en los del este y mediterráneos.² En Cuba, esta oncopatía es la localización de cáncer más frecuente (17,8 % del total de pacientes nuevos) y la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres (15,3 % del total de muertes por cáncer). Estudios realizados en nuestro país muestran que Camagüey no se encuentra entre las provincias con mayor incidencia relativa a nivel nacional.³

El cáncer mamario es una hiperplasia ductal o lobulillar con atipias en su etapa inicial de evolución biológica; posteriormente, es un carcinoma in situ, en donde hay integridad de la membrana basal que cuando es invadida, pasa a ser un carcinoma infiltrante ductal o lobulillar. El 80 % son carcinomas ductales infiltrantes y los carcinomas lobulillares oscilan entre el 2 % y el 5 %. La supervivencia de ambos es similar, así como la incidencia de metástasis ganglionares, la mejor supervivencia se asocia a los subtipos tubulares, cribiforme, coloide y papilar.^{4, 5}

Los linfocitos T inmunocompetentes se originan en el timo. En un estadio temprano de su diferenciación en la corteza, éstos sintetizan e insertan en su membrana distintas moléculas de superficie, que permiten a los inmunólogos identificar diferentes subpoblaciones de linfocitos T, mediante el empleo de anticuerpos específicos para estos marcadores de superficie. Dos de estos marcadores son CD4 y CD8, a medida que se diferencian también adquieren moléculas de superficie del complejo mayor de histocompatibilidad MHC (según sus siglas en ingles major histocompatibility complex) que les permite distinguir lo propio del organismo, de las células extrañas. Los linfocitos de fenotipo CD8 llevan moléculas de superficie del MHC de clase I las cuales están presentes en todas las células del organismo; los linfocitos del fenotipo CD4 que sirven posteriormente como células T colaboradoras en la respuesta inmunitaria humoral, llevan moléculas del MHC II las cuales se encuentran en las células del sistema inmunitario. Los linfocitos T sintetizan e insertan receptores para el reconocimiento de antígenos en su membrana durante su diferenciación, denominados con las siglas TCR receptor de células T asociado no covalentemente al llamado complejo CD3 lo que conjuntamente se denomina complejo receptor de las células T.^{6, 7}

Los estudios que relacionan los linfocitos T con los diferentes tipos histológicos de cáncer de mama son escasos y no concluyentes, lo que motivó a la realización de esta investigación, que supondrá un aporte de elementos teóricos valiosos para el desarrollo de futuros proyectos investigativos.

MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo con las 41 pacientes operadas y diagnosticadas histológicamente de carcinoma de la mama, atendidas en la consulta especializada del Hospital Provincial Oncológico Marie Curie de la provincia de Camagüey, desde mayo de 2005 hasta mayo de 2006, con el objetivo de caracterizar los linfocitos T que infiltran tumores malignos de la glándula mamaria a través del método de inmunofluorescencia indirecta, se utilizaron los anticuerpos monoclonales (AcM) anti CD3, anti CD4 y anti CD8.

Se creó un formulario como fuente de información primaria, para lo que se tuvo en cuenta la bibliografía revisada y el criterio de expertos, se incluyeron variables como el tipo histológico de tumor, la presencia de linfocitos T en el tumor y la intensidad del marcaje mediante los AcM anti CD3, anti CD4 y anti CD8.

Formulario

Caracterización de los linfocitos T en la respuesta inmune celular de variedades histológicas de tumores malignos de mamas.

Tipo histológico

1-Ductal infiltrante convencional _____

2-Comedocarcinoma _____

Lobulillar infiltrante _____ Presencia de linfocitos

1-CD3 Sí _____ No _____

2-CD4 Sí _____ No _____

3-CD8 Sí _____ No _____

Intensidad del marcaje para CD3, CD4 y CD8

1-Débil _____

2-Moderado _____

3-Intenso _____

4-Negativo _____

Operacionalización de las variables, muestras de tejido y técnicas

Las muestras del tejido mamario se obtuvieron por exéresis o extirpación quirúrgica del tumor o glándula mamaria, con diagnóstico positivo de carcinoma de mama, en mujeres de más de 30 años de edad, las muestras se tomaron dentro de las seis primeras horas posteriores a su extirpación quirúrgica.

De los tejidos mamarios obtenidos se tomaron fragmentos con un tamaño de 1 x 1 cm. Un corte del fragmento de cada paciente se examinó por un histólogo, se utilizó la coloración de hematoxilina y eosina, método que se aplica en los laboratorios de anatomía patológica del país.

Se procedió de igual forma a realizarle a los cortes de cada paciente, la técnica inmunohistoquímica (IHQ) de inmunofluorescencia indirecta (IFI), por el método convencional para identificar la presencia de linfocitos T infiltrados en el tumor, se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti linfocitos T (anti CD3, anti CD4 y anti CD8) y un segundo anticuerpo marcado con fluoresceína, que evidenció la unión del anticuerpo monoclonal con el antígeno del linfocitos T correspondiente.

Las preparaciones se observaron en un microscopio de inmunofluorescencia, lo que permitió la identificación cualitativa de estos linfocitos en los tejidos en estudio y la intensidad del marcaje se informó a través del sistema de cruces: (+) débil, (++) moderado, (+++) intenso y (-) para el negativo.

RESULTADOS

En cuanto al diagnóstico histológico realizado a las 41 pacientes estudiadas se apreció que el carcinoma ductal infiltrante se encontró en 37 pacientes, para un 90, 24 % y el tipo más representado fue el convencional. Con respecto a la variedad histológica el mayor por ciento correspondió a los carcinomas ductales infiltrantes convencionales (78, 04 %), el resto fueron comedocarcinomas infiltrantes (12, 20 %) y lobulillares infiltrantes (9, 76 %). Tabla 1

Tabla 1. Diagnóstico histológico y tipos de cáncer de mama encontrados

Diagnóstico histológico	Tipos histológicos	No.	%
Carcinoma ductal infiltrante	Comedocarcinoma	5	12,20
	Convencional	32	78,04
Lobulillares infiltrantes		4	9,76
T o t a l		41	100

Fuente: Formulario

Respecto a la relación entre el tipo histológico de neoplasia mamaria y la intensidad del marcaje de los linfocitos T con los anticuerpos monoclonales estudiados, se observó que la mayor intensidad del marcaje lo tuvo el comedocarcinoma, para los tres anticuerpos (80 %), es de señalar que los por cientos de marcaje fueron iguales para CD3 y CD4, no así para CD8 donde la variedad carcinoma ductal infiltrante convencional se presentó en menor por ciento (68, 7 %).
Tablas 2, 3, 4

Tabla 2. Tipo histológico según intensidad del marcaje para el anticuerpo monoclonal

Tipo histológico	Número de muestras	CD3								Positividad	
		D	%	M	%	I	%	N	%	Frecuencia	%
CDI	32	8	25	12	37,5	4	12,5	8	25	24	75
CLI	4	2	50	-	-	1	25	1	25	3	75

Tabla 3. Tipo histológico según intensidad del marcaje para el anticuerpo monoclonal anti-CD4

Tipo Histológico	Número de muestras	CD4								Positividad	
		D	%	M	%	I	%	No.	%	Frecuencia	%
CDI	32	10	31,3	5	15,6	9	28,1	8	25	24	75
CLI	4	2	50	1	25	-	-	1	25	3	75
CDIC	5	2	40	-	-	2	40	1	20	4	80
Total	41	14	34,15	6	14,63	11	26,83	10	24,39	31	75,6

Tabla 4. Tipo histológico según intensidad del marcaje para el anticuerpo monoclonal anti-CD8

Tipo histológico	Número de muestras	CD8								Positividad	
		D	%	M	%	I	%	N	%	Frecuencia	%
CDI	32	9	28,1	9	28,1	4	12,5	10	31,3	22	68,7
CLI	4	2	50	-	-	1	25	1	25	3	75
CDIC	5	2	40	1	20	1	20	1	20	4	80
Total	41	13	31,71	10	24,39	6	14,63	12	29,27	29	70,7

DISCUSIÓN

Diariamente, se generan en el organismo células con transformaciones potencialmente malignas que son identificadas y destruidas rápidamente por el sistema inmune debido a un proceso denominado inmunovigilancia, teoría que fue propuesta por Thomas y Burnet en el año 1957.⁸

Una evidencia clínica de este fenómeno es la alta frecuencia de tumores malignos que se desarrollan en personas inmunodeficientes, otras evidencias clínicas y experimentales, muestran la presencia de infiltrado de linfocitos en algunos tumores, esto es asociado a un mejor pronóstico en comparación con tumores histológicamente similares sin infiltrado.^{9,5}

Azzopardi y Hartmann,¹⁰ en la clasificación histológica adoptada por la OMS, mencionan que la frecuencia de carcinoma ductales infiltrantes de tipo convencional se encuentra entre un 75 % a un 85 %, los de tipo comedocarcinoma entre el 5 % y el 10 % y los lobulillares infiltrantes se encuentran entre el 8 % y el 10 %, los resultados de esta investigación coinciden con los obtenidos por estos autores.¹¹

Tanto las células CD3, CD4 como las células CD8 tienen capacidad para inducir resistencia contra el crecimiento tumoral, aunque por mecanismos distintos. Las células CD8 ejercen un efecto antitumoral directo, debido a la capacidad citotóxica de éstas, mientras el efecto mediado por CD3 y CD4 se debe a la producción de citocinas. Buttler¹³ resalta la importancia de la utilización de anticuerpos monoclonales para la detección de infiltrados linfocitarios y de otros marcadores biológicos en el cáncer de mama, mediante técnicas inmunohistoquímicas (inmunofluorescencia directa e indirecta).¹²⁻⁴

En una investigación multicéntrica realizada en Illinois, Estados Unidos, se identificaron CD4 y CD8, entre otros marcadores, en neoplasias mamarias, se concluyó que estos fueron factores diagnósticos y predictores de relevancia del carcinoma intraductal, sobre todo en la variedad comedocarcinoma, resultado similar a la presente investigación en lo que respecta a los anticuerpos monoclonales (CD4 y CD8) que se utilizaron en el estudio y lo explican debido a su histología, grado de diferenciación y por ciento de necrosis, entre otros.¹⁵ Otros investigadores refuerzan estos hallazgos y señalan que los mismos (CD8) inhiben la tumorigénesis, la invasión linfática y por tanto aumentan la sobrevida de esta oncopatía.¹⁶

Willerford,¹⁴ en una investigación randomizada que incluyó 1 444 pacientes portadoras de cáncer de mama, detecta frecuencias inferiores de CD3, CD4, y CD8, lo cual justifica lo planteando, o sea, que la presencia de estos es inversamente proporcional a la agresividad histológica del tumor (comedocarcinomas infiltrantes, mixtos, inflamatorio, entre otros) y al grado de diferenciación celular.

Camp et al¹⁷ en un meta-análisis realizado en Estados Unidos de Norteamérica el cual incluyó 2 345 pacientes con enfermedades mamarias, también detectó elevados por cientos de infiltrados linfocitarios de CD3 y CD8, señalan, además, que el primero de estos se observó con frecuencias más elevadas en las enfermedades mamarias malignas. Otras publicaciones internacionales detectaron resultados similares, aunque además de incluir la detección de los anticuerpos CD3, CD4 y CD8 utilizaron otros anticuerpos monoclonales con fines terapéuticos, el primero usó el CD40 y el segundo el CD95.¹⁸

CONCLUSIONES

Entre las muestras escogidas se hallaron tres variedades histológicas, carcinoma ductal infiltrante convencional, carcinoma ductal tipo comedocarcinoma y carcinoma lobulillar infiltrante, el más frecuente fue el de tipo convencional.

En la mayoría de las muestras se identificó el infiltrado linfocitario, que evidenció una respuesta inmune celular frente al tumor. La intensidad del marcaje del linfocito T fue ligeramente mayor para CD3 y CD4 y menor para el CD8.

No se encontró diferencia de la respuesta inmune celular en ninguno de los tipos histológicos, al no detectarse cambios notables en el marcaje frente a los diferentes hallazgos histopatológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Manual Merck. Ginecología y obstetricia. Enfermedades de la mama. Madrid, España 2005.
2. Fisher B. From Halsted to prevention and beyond: advances in the management of breast cancer during the twentieth century. *Eur J Cancer* 2004; 35(14):1963-73.
3. Morales R, Pollán A. Morbilidad del cáncer de mama en la mujer. *Rev Cubana Med Gen Integr* 1999.
4. Hishii M, Kurnick JT, Ramirez-Montagut T, Pandolfi F. Studies of the mechanisms of cytolysis by tumor infiltrating lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 388-94.
5. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer* 2002; 28A:859-64.
6. Hieken MD, Farolan MD. Predicting the biologic behavior of ductal carcinoma in situ: An analysis of molecular markers. *Surgery* 2001; 130(4):593-601.
7. Shimokawara I, Imamura M, Yamanaka N, Ishii Y, Kikuchi K. Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance: an immunoperoxidase study with anti-human T- and B-cell sera. *Cancer* 2002; 49:1456-64.
8. Bland KI, Vezeridis MP, Copeland EM. Mama: Carcinoma de la mama. En: Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, Daly JM, Fisher JE, Galloway AC. *Principios de cirugía*. 7 ed. Interamericana:Mc Graw-Hill; 2006.p.603-43.
9. Offringa R. Tumour immunology exploitation of the weapon of immune destruction for cancer therapy: taking aim before firing. *Curr Opin Immunol* 2005, 17: 159-62.
10. Pardo M, Saavedra M, Sepúlveda S. Aspectos epidemiológicos del cáncer de mama. *Rev Hosp Clin Univ Chile* 2001; 10(3):216-20.
11. Hadden JW. The Immunology of Breast Cancer. *Clin Immunother* 2005; 4(4):279-300.
12. Usui T, Shimokawara I, Hirata K, Ebata T, Asaishi K, Hayasaka H, et al . Relationship between T cell infiltration in breast cancer tissues and prognosis. *Gan No Rinsho* 2003; 29:1634-7.
13. Butler MDJ, Hieshima MDA. Monoclonal antibody staining and impact of surgical technique on the identification and quantitation of steroid receptors in human breast cancer. *Am J Surg* 2006;154 (15):1162-66.
14. Willerfod DM, Hoffman PA, Gallatin WM. Expression of lymphocyte adhesion receptors. Anatomic partitioning and linkage to activation. *J Immunol* 2004; 142:3416-22.
15. Finn OJ. Tumor immunology at the service of cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:127-9.
16. Schwartzentrubart DJ, Solomon D, Rosemberg SA. Characterization of lymphocytes infiltrating human breast cancer specific immune reactivity deleted by measuring cytokin secretion. *J Immunotherapy* 2002; 12(1):320-60.
17. Camp BJ, Dyhrman ST, Memoli VA, Mott LA, Barth J. In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes. *Annals of Surgical Oncology* 2006; 3 (2): 176-84.

18. Miller AR, McBride WH, Hunt K, Economou JS. Cytokine-mediated gene therapy for cancer. *Ann Surg Oncol* 2004; 1:436-50.

Recibido: 27 de junio de 2008.

Aceptado: 17 de febrero de 2009.

Dra. Jenny Yorllana Luna Esquivel. Especialista de I Grado en Histología. Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay .Camagüey, Cuba. yorllana@finlay.cmw.sld.cu