

INSTITUTO DE ONCOLOGÍA Y RADIOBIOLOGÍA

Estudio de poblaciones linfoides en cáncer de mama

Por: -

Dr. CARLOS CERVANTES*, Dra. GLADYS EXPOSITO**, Dr. LUIS MORENO*** y Téc. MA. E GARCIA****

Cervantes, C. y otros. *Estudio de poblaciones linfoides en cáncer de mama.* Rev Cub Med 19: 1, 1980.

Se cuantificaron los (en sangre periférica en 50 pacientes con cáncer de mama por inmunofluorescencia directa y rosetas E, EA y EAC. Los niveles de linfocitos con inmunoglobulina de superficie celular (IgSC⁺) fueron anormales en 3% de los pacientes y en 54% de los pacientes con rosetas EAC. Los niveles de rosetas EA mostraron frecuentes alteraciones. Los linfocitos T totales no mostraron diferencias cuando se compararon con los valores de la muestra control. Sin embargo, las rosetas formadas por linfocitos que unían más de 7 eritrocitos de carnero (alta densidad de receptores, adr) son significativamente menores ($P < 0.01$) en los pacientes con cáncer de mama que en los controles, mientras que los linfocitos que unían entre 3 y 7 eritrocitos de carnero (linfocitos con baja densidad de receptores (bdr), no mostraron diferencias al compararlos con los controles. Los criterios para analizar linfocitos T son coincidentes en 34% de los pacientes, lo que puede indicar diferentes subpoblaciones de linfocitos T

INTRODUCCION

En el avance de la inmunología moderna, un punto fundamental fue la definición del linfocito como la célula inmunocompetente¹. Posteriormente fue posible demostrar que las respuestas de inmunidad celular y de inmunidad humoral estaban mediadas por dos poblaciones linfoides estrechamente interdependientes, pero diferenciables ontogénica y funcionalmente. Los linfocitos encargados de las respuestas de hipersensibilidad retardada se derivan del timo (linfocitos T) mientras que aquellos involucrados directamente en la síntesis de anticuerpos humorales derivan de la bursa en las aves y posiblemente de la médula ósea en los mamíferos (linfocitos B).

Actualmente es posible diferenciar ambos tipos de linfocitos por una serie de marcadores (cuadro I), lo que permite cuantificar las proporciones de linfocitos T y B en muestra como sangre periférica, ganglio linfático, etc.

Esta tecnología es potencialmente aplicable a estudios en oncología, ya que en los pacientes cancerosos se demuestran frecuentemente alteraciones.

*Médico especialista, jefe del departamento de biología de tumores, IOR.

**Médico especialista, Laboratorio de inmunología de tumores, IOR.

***Médico especialista, Servicio de ginecología, IOR.

R. C. M. Técnico de laboratorio, laboratorio de Inmunología. IOR.
ENERO-FEBRERO. 1980

CUADRO I

Marcadores de Linfocitos **HUMAMOS**

| Marcadores | T | B |
|--------------------------------------|-----|-----|
| Receptor para eritrocitos de carnero | +++ | |
| Suero antitimocito | +++ | |
| IgSC | | +++ |
| Receptor FC | | +++ |
| Receptor C | | +++ |

Inmunitarias*. En el cáncer de mama se ha informado que la evolución de la enfermedad está relacionada con el cuadro histoinmunopatológico de los ganglios linfáticos regionales⁷.

Hemos seleccionado esta localización para estudiar las poblaciones linfoides **en busca de** alteraciones inmunológicas en estos pacientes.

MATERIAL Y METODO

Pacientes. Se estudiaron 50 pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma mamario, agrupados clínicamente atendiendo a la clasificación TNM propuesto por la UICC para el período 1973- 1977", de edades comprendidas entre 34 y 83 años.

Poblaciones celulares. Los linfocitos se separaron de sangre periférica obtenida por punción venosa momentos antes de la preanestesia para la biopsia con heparina sin preservativo, 25 U/ml de sangre. La sangre se diluyó al 50% con solución Earle y se depositaron 10 ml cuidadosamente sobre 5 ml de verografín al 15,2% en agua destilada (densidad 1,078), centrifugándose a 1 500 g, 25 min a 4°C". La pureza de las células mononucleares recobradas os de un 95% aproximadamente. Los hematíes contaminantes non hemolizados con tri cloruro de amonio, pH 7,2, 15 minutos a 37°C" y lavados 3 veces con solución Earle. Del 5 al 15% de células mostraron diámetros de 10-12 micras o mayores, con núcleo escotado,

las que fueron consideradas monocitos.¹¹

La viabilidad de las células así obtenidas se evaluó por el test de exclusión del azul tripán. siendo usualmente superior al 95%. La concentración de las células se ajustó entre 2-3 x 10⁶ cel/ml para estudios de rosetas e inmunofluorescencia

Los hematíes humanos se lavaron 3 veces con solución salina amortiguada al igual que los de carnero. Estos últimos se conservan por no más de una semana en solución Alsever, a 4°C.

Estudio de poblaciones. En las poblaciones linfoides obtenidas se estudió la presencia de IgSC por inmunofluorescencia. de receptores para Fe por rosetas EA y para el complemento por rosetas EAC. La formación de rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero se realizó como marcador de linfocitos T.

- a) La inmunofluorescencia directa de linfocitos se realizó según *Cerottini*¹² con ligeras modificaciones con un antisuero de oveja contra inmuno- globulinas humanas marcado con isotiocianato de fluoresceína (Wellcome. MF 01, lote K 9631) diluido 1:20 con tampón T.D. La lectura fue hecha en un microscopio de fluorescencia ML-2A (URSS).
- b) Las rosetas EA se realizaron de acuerdo con el método de Huber¹³. por incubación de eritrocitos humanos con un antisuero de conejo inmunizado con hematíes AB (+), en concentraciones subaglutinantes. En una segunda etapa se incuban los linfocitos con los hematíes así tratados.
- c) Para obtener las rosetas EAC se incubaron los hematíes EA lavados y tratados con suero humano normal fresco diluido 1:10 con solución salina amortiguada como fuente de complemento, según *Michlmayer*¹⁴
- d) Las rosetas E se realizaron de acuerdo con *Jondal*¹⁵ excepto que al final fueron fijadas en glutaraldehído al 0,6% en amortiguador T.D., pH 7,3¹⁶. Se consideraron rosetas de alta densidad de receptores (adr) para eritrocitos de carnero las formadas por linfocitos que unían más de 7 eritrocitos y las de baja densidad de receptores (bdr), aquéllas en que un linfocito une entre 3 y 7 hematíes de carnero.

CUADRO II

| | POBLACIONES LINFOIDES | | | | | |
|-------------|-----------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|---------------|
| | IgSC | EA | EAC | E _t | Eadr | Ebdr |
| N | 16,58 | 21,45 | 21,04 | 75,23 | 18,00 | 57,00 |
| | ± 5,01 | ± 6,93 | ± 6,28 | ± 7,75 | ± 5,96 | ± 8,00 |
| CAMA | 15,45 | 27,36 | 29,15 | 71,23 | 13,04 | 56,97 |
| | ± 4,58 | ±12,48 | ±12,26 | ±19,47 | ± 7,31 | ±17,79 |
| | NS | p<0,01 | p<0,01 | NS | p<0,01 | NS |

La tabla expresa la media ± la desviación estándar. N: individuos normales.

CAMA: pacientes con cáncer de mama.

NS: estadísticamente no significativo.

El análisis estadístico se realizó por el test de la t de Student.

RESULTADOS

El cuadro II muestra los valores normales de linfocitos T y linfocitos B obtenidos en 30 controles, con las técnicas utilizadas en este trabajo¹⁰. Las poblaciones de linfocitos T y B en pacientes con cáncer de mama no tratados del actual estudio difieren en las medias de la muestra normal, fundamentalmente en los linfocitos B estudiados por rosetas EAC y no según se estudian por inmunofluorescencia.

En el cuadro II se observa que los valores E totales E_t sumados a los de linfocitos EAC (E_t + EAC), se acercan al 100%, mientras que E_t + IgSC son inferiores.

Los linfocitos T totales no son esencialmente diferentes entre pacientes e individuos normales (p > 0,05). Sin embargo, cuando analizamos las rosetas de alta densidad (E de alta densidad de receptores, adr, en el cuadro II) el promedio es inferior en el grupo de pacientes (70% del valor normal). Las medias difieren significativamente (p < 0,01). Aun más, en esta muestra había 4 pacientes con valores elevados de Eadr. Cuando se separan del grupo

de pacientes estudiados el valor obtenido en pacientes cancerosos es sólo el 60% del valor normal.

La frecuencia con que coinciden los valores dados por indicadores para medir linfocitos T coinciden en sólo el 34%. Esto puede indicar que los criterios para analizar linfocitos T pueden poner de manifiesto 2 subpoblaciones diferentes en realidad (cuadro III). Al intentar relacionar estas alteraciones con los resultados del TNM no se pudieron obtener definiciones concluyentes en esto puede influir el volumen de la casuística estudiada.

CUADRO III

FRECUENCIA DE VALORES ANORMALES DE LINFOCITOS T EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA

| E | Valores anormales | |
|-------------|-------------------|-----------|
| | Altos (%) | bajos (%) |
| | 28 | 28 |
| Eadr | 7 | 53 |
| Ebdr | 36 | 28 |

DISCUSION

Las poblaciones linfoides pueden ser indicadores de aspectos importantes en los estudios de interrelación inmunológica entre el huésped y su tumor. Así vemos que en los pacientes estudiados hay diferencias con la población control utilizada. Este es un dato importante, porque es el primer paso obligado para estudios posteriores y ha brindado resultados demostrativos. Las diferencias con la muestra normal se pueden agrupar en anomalías de la población B, de la población T y coincidencias de anomalías en ambos casos.

Las anomalías de la población B se observan fundamentalmente en las rosetas EAC. Se demuestra aumentos en el 54% de los pacientes estudiados, mientras que por IgSC sólo se obtuvieron valores del 3%. El otro aspecto llamativo es la disminución de Eadr en el 53% de los pacientes, como anomalía de los linfocitos T. Es de destacar la frecuencia con que ambos tipos de anomalías se asocian, en algo más del 40% de los pacientes.

Es decir, que un primer punto a discutir, al reflejo en las poblaciones linfoides de la interacción huésped-tumor, puede tener una respuesta positiva, por los resultados mostrados.

Un aspecto de interés es la disminución de rosetas Eadr. Las diferencias de coincidencias con Eadr plantea la posibilidad de que estamos en presencia de una subpoblación linfóide T, detectable por el criterio utilizado. Ya anteriormente-

te habíamos indicado esta alteración". Su confirmación ahora en un grupo mayor de casos es importante. Además se altera más frecuentemente que la población Eadr. Esto puede interpretarse como una mayor sensibilidad de este parámetro. En estos momentos no podemos decidir si es una subpoblación de linfocitos T, o se trata de células en estadios de maduración diferentes. De todas formas, es notable que su disminución se acompaña de aumentos complementarios de Eadr en un numeroso grupo de pacientes. Esto está de acuerdo con lo informado por otros autores que no encuentran disminución de las poblaciones T y no han utilizado este criterio discriminativo¹⁸. La importancia de Eadr disminuida, está en que quizás refleje al nivel de las poblaciones linfoides la capacidad decreciente de montar respuestas de inmunidad celular en pacientes cancerosos. Otra alternativa es que la disminución de Eadr refleje el compromiso del sistema inmunológico del paciente en una respuesta activa. En este sentido, la disminución de células T supresoras sería lo esperado¹⁹.

De cualquier forma, otra posibilidad que puede ser tal vez aprovechada al estudiar las poblaciones linfoides, es su comportamiento según las alternativas de la enfermedad neoplásica, y pueda seguirse la evolución de la enfermedad de acuerdo con el cuadro poblacional linfóide que el paciente muestra al diagnóstico y durante el tratamiento, es decir, su posible significación pronóstica.

SUMMARY

Cervantes, C. et al. *Study of lymphoid populations in breast cancer. Rev Cub Med* 19: 1, 1980.

Peripheral blood lymphocytes from 50 patients with breast cancer were quantified by direct immunofluorescence and E, EA and EAC rosettes. The levels of lymphocytes with cell surface immunoglobulin (IgSC⁺) were abnormal in 3% of patients and 54% of those with EAC rosettes. EA rosette levels were frequently disturbed. Total T lymphocytes did not show differences when compared to control sample values. However, rosettes formed by lymphocytes which attached over 7 sheep erythrocytes (lymphocytes with a high density of receptors) are significantly smaller ($p < 0,01$) in patients with breast cancer when compared to controls, while lymphocytes which attached between 3 and 7 sheep erythrocytes (lymphocytes with a low density of receptors) did not show differences when compared to controls. Criteria applied in the analysis of T lymphocytes involved a coincidence in 34% of patients, a fact which may point out different subpopulations of T lymphocytes.

RÉSUMÉ

Cervantes, C. et al. *Etude de populations lymphoïdes dans le cancer du sein.* Rev Cub Med 19: 1, 1980.

Nous avons réalisé la numération des lymphocytes du sang périphérique chez 50 patientes porteuses de cancer du sein, au moyen de l'immunofluorescence directe, ainsi que des rosettes E, EA et EAC. Les taux de lymphocytes avec immunoglobuline de surface cellulaire (IgSO) ont été anormaux chez 3% des patientes et chez 54% des patientes ayant des rosettes EAC. Les taux de rosettes EA ont fréquemment montré des altérations. Les lymphocytes T totaux, n'ont pas montré de différences lorsqu'ils ont été comparés aux valeurs de l'échantillon contrôle. Cependant, les rosettes formées par des lymphocytes liant plus de 7 érythrocytes de mouton (haute densité de récepteurs, HDR) sont significativement plus petites ($p < 0,01$) chez les patientes porteuses de cancer du sein que chez les témoins, tandis que les lymphocytes qui liaient entre 3 et 7 érythrocytes de mouton (lymphocytes de basse densité de récepteurs, BDR) n'ont pas montré de différences lors d'établir la comparaison avec les contrôles. Les critères pour l'analyse des lymphocytes T coïncident chez 34% des patients, ce qui peut indiquer différentes sous-populations de lymphocytes T.

PE3KME

CepBaHTec, K. H. *ÆP.HccJie^OBaHHe jimm\$oTH^eckoro HacedeHue y- nauweHTOB, CTpa,ua;omHx paKOM rpyAH.* Her Cub Med 19: 1, 1980.

Ehjih KOJiwHecTBeHHO onpe^eHieHH jihnk)0Uth nepntjaepieckOii kpobh y- 50 naitHeHTOB, CTpaiafomwx paKOM rpyun; onpe,nejieHHe dhjio nnoBejie- Ho rTOe,nCTBoM KMMYfiio-nyopieieHijiiHH HenocpsACTBeHHoi h p03eTOK E, EA h EAC. ypoBHH ji MMcbo uh tob c HMMYH0rji00yjiHHOM KJieTO'iHOH noBepx HocTH (IgSC⁹) du/m anopwajibhumh y 3% h3 oómero ^HCJia naueHTOB, a 54% naueHTOB. p03eTKH EAC. ypoBHH p03eTOK EA noKa3ajih Ha ^ac Tue H3MSheHHH. ÓÓ!UH6 JIHM(())OUHTH T He IIOKa3ajih paJIHKHH, KOBJa - OHH ÓHLUH COHOTaBJieHH CO 3Ha^eHHHM KOHTpOJiHOK npOÓU. OßHäKO,- D03eTKH, CtpOpMHpOBaHHHe H3 Jiro/KDOUHTOB, KOTOpue OÓ^cejyihHKIT ÓOJiee 7 apHTDOuHTOB ääpana (BHCoKan öjiothoctb nöjy^aTejien, ADR) *6tuir-* 3HaHTT6JIBHO MeHBHMH (p-^0,01) y ITäUHeHTOB, CTpa^aKUIUX paKOM rpi .uh, tieM y KOHTpOJiBHx naueHTOB; b to BQewiH Kak jihVkJouhtu, koto pae 00T>ejxHHK)T ot 3 jio 7 spHTpoutHTOB äaäaHa (jihm^ouhtu c hh3Koh ruioTHOCTM) no^ynaTe^en, bdr) , He noKa3ajin pa3Jih^HH npi nnoBe^e - HHH CpaBHeHHfl HX C KOHTpOJiBHMH. KpHTeOH B OTHOineHHH aHa.7IH3a - jihm(())Ouhtob T cosna^aioT b 34% h3 Bcex näuHeHTOB, • ^to MoæeT yKa3y BaTL na oa3Jih^iHHe cyöHacedeHHH jihmçouhtob T.

BIBLIOGRAFIA

1. *Gowans, J.L.* Initiation of immune responses by small lymphocytes. *Nature* 196: 651, 1962.
2. *Bentwich, S.; H. Kunkel.* Specific properties of human T and B lymphocytes and alterations in disease. *Transpl Rev* 16: 29, 1973.
3. *Raff, M.C. i and B* lymphocytes and immune responses. *Nature* 242: 19, 1973.
4. *Pilch, Y.H.H.G. Sidney.* Lymphocyte-mediated immune responses in neoplasia. *Am J. Clin Pathol* 62 184, 1974.
5. *Oettgen, H.F. et al.* Immunology of human tumors. *Med Clin North Am* 53: 761, 1971.
6. *Black, M.M.; F.D. Speer.* Lymph node reactivity in cancer patients. *Surg Gynecol Obstet* 110: 177, 1970.
7. *Tsakraklides, V. et al.* Prognostic significance of the regional lymph node histology in cancer of the breast. *Cancer* 34: 1259, 1974.
8. **U.I.C.C.** Clinical stage TNM classification of the tumors for the years 1973-1977.
9. *Medzhiradsky. J. et al.* Diminished in vitro toxic effect of PHA for lymphocytes of rats bearing syngeneic tumors. *Neoplasma* 20: 4, 1973.
10. *Boyle, W.* An extension of the ⁵¹Cr release assay for the estimation of mouse cyto- toxins. *Transplantation* 6: 67, 1968.
11. *Cervantes, C. et al.* Estudio de subpoblacion linfoïdes humanas. *Rev Cub Med* 17- 4591978.

12. *Cerottin, J.C.; K.T. Brunner. Localization of mouse isoantigens on cell surfaces as revealed by immunofluorescence. Immunology 13: 395, 1967.*
13. *Huber, H. et al. The IgG receptor: an immunological marker for the characterization of mononuclear cells. Immunology 17: 7, 1969.*
14. *Michlmayer, G.; H. Huber. Receptor sites for complement on certain human peripheral blood lymphocytes. J Immunol 105- 670 1970.*
15. *Jondal, M. et al. Surface markers on human T and B lymphocytes. J Exp Med 136: 207, 1972.*
16. *Pang, G.M.T. et al. Spontaneous rosettes as a T lymphocyte marker: a modified method giving consistent results (SRBC rosettes). J Immunol Meth 4: 41, 1974.*
17. *Cervantes, C.; G. Expósito. Estudio de poblaciones de linfocitos T en cáncer de mama. V Congreso Cubano de Oncología y I para los Países de la Cuenca del Caribe. Resúmenes p. 51, 1978.*
18. *Anderson, J.M. et al. Evaluation of leukocyte functions six years after tumor autograft in human mammary cancer. Br J Cancer 28- 83. 1973. (Suppl. 1).*
19. *Gershon, R.K. Regulation of concomitant immunity. Activation of suppressor cells by tumor excision. Immunological parameters of host-tumor relationships. New York. Vol. 3, p. 198. Editado por D.W. Weiss. A.P. Inc. 1974.*