

# LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR: SU IMPLICACIÓN EN EL CÁNCER COLORRECTAL

L. De la Cruz-Merino, F. Henao-Carrasco, T. García-Manrique

Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla.

## Introducción

El término inmunidad proviene de la palabra latina "inmunitas", referido a la protección de los senadores romanos frente a los procesamientos legales mientras ocupasen su cargo público. Este término ha ido ganando acepciones con el transcurso del tiempo, empleándose en Medicina para definir la reacción que el propio organismo genera para vencer la agresión por patógenos exógenos, inicialmente de índole infecciosa. Más reciente es el reconocimiento de la generación de respuestas inmunes por antígenos derivados de los procesos neoplásicos.

La mayoría de tumores sólidos inducen una reacción inmune en el huésped que es objetivable en los estudios histopatológicos. En este sentido, los tejidos del cáncer colorrectal están infestados de células que forman parte de nuestro sistema inmunológico, sugiriéndose que el número de linfocitos presentes puede jugar un papel pronóstico con potencial impacto en la supervivencia de los enfermos.

En Europa, se diagnostican cada año 376.000 casos nuevos de cáncer colorrectal, con una mortalidad de 203.700 pacientes. Es el cuarto cáncer más frecuente en el mundo, siendo una de las neoplasias más comunes en ambos sexos<sup>1,2</sup>. En la mayoría de los países desarrollados, gracias a las técnicas de screening y diagnóstico y a los avances en el campo de la cirugía y la radio-quimioterapia, se ha logrado una notable mejoría de la supervivencia en las últimas décadas.

La mayoría de los tumores que afectan el área colorrectal son de tipo adenocarcinoma que, en un gran porcentaje de los casos, es de tipo bien o moderadamente diferenciado. Cuando una neoformación colorrectal sobrepasa la barrera de la muscular de la mucosa para llegar a la submucosa, se producen reacciones locales en el tejido del huésped y varias células proinflamatorias se acumulan en los bordes de invasión tumoral, creándose un microambiente inmunitario y una respuesta inmune frente al tumor.

## Microambiente inmune tumoral

El sistema inmune, en condiciones normales, es un guardián eficaz contra el cáncer. La actividad antitumoral del sistema inmune se encuentra mediada inicialmente por la inmunidad innata, que se sirve de células efectoras circulantes como las células Natural Killer (NK), neutrófilos y macrófagos. Posteriormente, entra en escena la inmunidad adaptativa, más tardía, específica y con capacidad de generar células de memoria, constituida fundamentalmente por linfocitos B y T (inmunidad humoral y celular).

El desarrollo del cáncer puede explicarse, al menos en gran parte, por el triunfo de los mecanismos de escape inmunosupresores del tumor frente a los eventos inmunológicos que el huésped genera contra el tumor. Este escenario supone un área de gran interés para los investigadores del microambiente tumoral, con evidencias que apoyan la teoría de que una potente reacción inmune efectiva contra determinados antígenos (epítomos) tumorales puede ocasionar la superación de los mecanismos de escape y, finalmente, la destrucción y el control del cáncer.

Los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) son linfocitos localizados en los infiltrados inflamatorios presentes en los islotes tumorales y en el estroma peritumoral de los tumores sólidos y están compuestos de linfocitos T citotóxicos (TCD8), células NK y linfocitos T colaboradores o helper (TCD4). Entre éstos últimos se encuentran los linfocitos T reguladores (Tregs) anteriormente denominados linfocitos supresores, actores fundamentales en la limitación y el control de la respuesta inmune. Si bien estos Tregs cumplen una función netamente fisiológica de prevención de fenómenos autoinmunes en el huésped, con objeto de evitar una respuesta excesiva a antígenos propios, en el caso de las neoplasias malignas su presencia parece cumplir una función inmunosupresora que impide la destrucción tumoral inmunomediada. La relación entre TCD8/NK y Tregs en el microambiente tumoral-peritumoral parece explicar en última instancia el efecto final de la reacción inmune generada, respuesta inmune efectiva o efecto inmunosupresor y tolerancia-energía<sup>3,4</sup>.

El sistema inmune es un sistema homeostático que dispone de mecanismos de autorregulación para prevenir una respuesta excesiva y lesiva para el organismo con destrucción de células normales. Uno de los puntos de control clave en esta respuesta inmune acontece cuando el receptor de los linfocitos T (LT) reconoce el complejo antígeno-HLA. En este momento se puede inducir, no sólo la activación y diferenciación de las células T sino también la apoptosis de las mismas. La interacción es muy compleja e involucra a una serie de ligandos, uno de los cuales es CD 40, molécula de superficie que hace una aparición temprana en los LT activados. Este ligando es esencial para la formación de anticuerpos por linfocitos B inducidos por LT y para la activación de las células presentadoras de antígeno (APC) que desencadenan la respuesta inmune celular. La interacción del ligando CD 40 con su receptor en las células B y APC ocasiona la regulación al alza de 2 proteínas de superficie en las mismas, CD 80 y CD 86. Cuando CD 80 y CD 86 interactúan con CD 28 en los LT (sinapsis inmune) el resultado es la activación de los LT. Sin embargo, la interacción con el Antígeno 4 asociado a Linfocitos T Citotóxicos (CTLA-4) en los linfocitos T ocasiona anergia o tolerancia inmune. CTLA-4 (CD 152) se produce y moviliza a la sinapsis inmune después de 2-3 días de la activación de las células T, uniéndose a los receptores de células T (RCT) CD 80 y CD 86 (5) (Figura 1).

La unión preferente de CD 80 y CD 86 con CTLA-4 resulta en la reducción en la producción de IL-2 y, por ende, de LT activados. Un retraso temporal en la aparición de CTLA-4 en la superficie de las células T en la sinapsis inmune podría ocasionar la activación de los LT inducidos por RCT y CD 28, de manera que se induciría su activación y expansión, potenciándose la respuesta inmune<sup>6</sup>.

### Valor pronóstico de los linfocitos Infiltrantes de tumor (TIL) en cáncer colorrectal

Los linfocitos son reconocidos al microscopio como pequeñas células que responden a la tinción clásica de hematoxilina-eosina, diferenciándose de forma clara de otras

células de la serie blanca sanguínea como las células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y mastocitos. En un trabajo publicado en Jass JR y cols<sup>7</sup>, se apuntaba la posibilidad de que la infiltración por linfocitos a lo largo del margen invasor del cáncer rectal fuera un factor pronóstico independiente para la supervivencia.

Ropponen KL y col<sup>8</sup> confirmaron el impacto pronóstico de los TIL en el cáncer colorrectal, cuantificando su número en el estroma tumoral y a lo largo del margen invasivo y subdividiendo en cuatro grupos en función del grado histológico, demostrando que son un factor que predice la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. Se observó también que hay una correlación inversa entre la presencia de TIL y el estadio tumoral, así en fases avanzadas de la enfermedad (estadios C y D de Dukes) hay menor número de TIL que en etapas tempranas (estadios A y B de Dukes).

El concepto de TIL fue ampliado para incluir los agregados linfocitarios que se forman alrededor del margen de invasión tumoral (conocidos como "reacciones linfoides similares a la enfermedad de Crohn"). Estos acúmulos de linfocitos parecen ser un factor independiente para aumentar la supervivencia en el cáncer colorrectal derecho<sup>9</sup>.

La hiperplasia folicular y paracortical en los ganglios linfáticos regionales también supone un factor pronóstico importante en el cáncer colorrectal. Phil E y cols<sup>10</sup>, demuestran en su estudio que la respuesta inmune que se lleva a cabo en el tejido linfático regional puede influir en la supervivencia. Este estudio es de una importancia particular ya que correlaciona la respuesta inmune que se produce en el lecho tumoral y la que se forma en el primer asentamiento linfático. Ambas respuestas están en relación directa, así las células dendríticas inmaduras migran desde la localización primaria tumoral hasta el ganglio linfático regional para madurar y convertirse en células presentadoras de antígeno para los linfocitos T.

En la mayor parte de los tumores colorrectales, los tejidos tumorales están infiltrados por un escaso número de linfocitos y solamente el área que corresponde al margen tu-

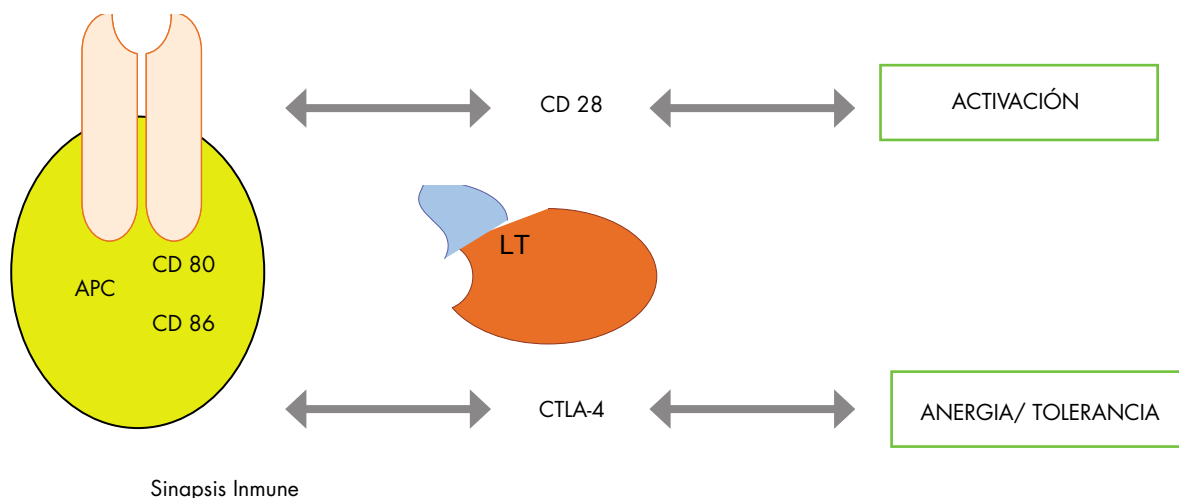


Figura 1

Interacción molecular en la sinapsis inmune. Fuente: elaboración propia.

moral es la que contiene una mayor densidad de linfocitos y otras células inflamatorias. Normalmente, acompañando a los linfocitos, suele haber otro tipo de células proinflamatorias como los neutrófilos y macrófagos. Los linfocitos suelen ser células T CD4 o CD8, mientras que las células B se observan generalmente en los folículos linfoides que raramente se encuentran presentes. Los linfocitos intraepiteliales son, por regla general, del tipo CD8. El número de estos CD8 se correlaciona con una mayor supervivencia libre de enfermedad, tal y como han demostrado distintos estudios<sup>11-12</sup>. Estos resultados sugieren la importancia de los TIL, particularmente aquellos del subtipo T CD8+, los cuales poseen un efecto antitumoral constatado por el efecto positivo que producen en la supervivencia de los pacientes.

Diederichsen AC y cols<sup>13</sup> demostraron mediante un análisis de citometría de flujo que una bajo ratio de CD4/CD8 es un factor pronóstico independiente para una mayor supervivencia. También dejan claro el papel inmunosupresor que pueden ejercer los linfocitos T reguladores CD4+, CD25+ y FOXP3+.

En el año 2006, Galon JC y cols publicaron en Science<sup>14</sup> un estudio de enorme relevancia y trascendencia clínico-patológica. Se analizaron genómicamente 75 casos de carcinoma colorrectal operados en estadios I a III, y 415 casos con tissue microarrays, observándose cómo los tumores que no recaían tenían mayor densidad de células inmunes (TCD3, TCD8, TCD45RO-memoria y granzima B) en las regiones tumorales analizadas, frente a los que recidivaban. En este estudio se demuestra que la expresión de la inmunidad adaptativa con Th1 es inversamente proporcional a la recurrencia tumoral, así los pacientes con un incremento de la expresión de genes para Th1 tenían mejor pronóstico. Se analizó tanto el centro tumoral como los márgenes de invasión y aquellos pacientes que no presentaron recurrencia tenían mayor densidad de células inmunes, tanto en el centro tumoral como en los márgenes. Los enfermos con baja densidad de linfocitos totales TCD3 y linfocitos de memoria (CD45RO+) tenían muy mal pronóstico, similar al de los enfermos con metástasis a distancia (estadios IV). Los enfermos fueron estratificados de acuerdo a la clasificación UICC-TNM, objetivándose que una intensa respuesta inmune in situ se relacionaba con un pronóstico favorable independientemente de la extensión local del tumor y la afectación ganglionar locoregional. Las conclusiones de este estudio deberían llevar a un replanteamiento del abordaje diagnóstico e histopatológico de esta neoplasia y de sus consecuencias pronósticas e inclusive terapéuticas, toda vez que se demuestra que el tipo, densidad y localización de las células del sistema inmune en carcinoma colorrectal tiene un valor pronóstico superior e independiente de los factores pronósticos clásicos en esta neoplasia (estadio según clasificación UICC-TNM y afectación ganglionar).

Múltiples análisis dejan claramente indicado que el impacto en la supervivencia de los linfocitos CD8+ en el cáncer de colon es más evidente cuando el período de seguimiento es mayor. De hecho, en un seguimiento entre los pacientes que presentan niveles altos y bajos de CD8+, las curvas de supervivencia en los dos primeros años de seguimiento se encuentran muy unidas y empiezan a separarse a medida que van pasando los meses. Los pacientes que se estudiaron durante más tiempo, presentaron una menor incidencia de recidiva local y de metástasis a distancia; esto podría estar condicionado porque la respuesta inmune en el tejido dañado inhiba la producción de metástasis o microme-

tástasis, tanto en los ganglios linfáticos regionales como en localizaciones a distancia.

Chiba T y cols<sup>15</sup> propugnaron en su trabajo la hipótesis de que la presencia de linfocitos T CD8+ en el tejido tumoral podría generar un estado de inmunovigilancia en el organismo que impidiera la producción de metástasis a distancia del tejido tumoral. Asimismo, Pages F y cols<sup>16</sup>, demostraron que una invasión metastática temprana se asociaba a una pobre respuesta inmune en el tejido tumoral. Un hecho similar se observa en el seguimiento de los pacientes que presentan una hiperplasia de la zona paracortical de los ganglios linfáticos regionales, pues las curvas de supervivencia en los primeros años de seguimiento se presentan muy unidas, separándose a lo largo del tiempo, a favor de aquellos pacientes que presentan un grado de hiperplasia paracortical mayor.

## Células natural killer: su función en el cáncer de colon

Las células "natural killer" destruyen in vitro algunos tipos de células tumorales, especialmente células que han reducido la expresión de HLA-1 pero expresan ligandos para activar los receptores de las células NK. Las moléculas HLA-1 (presentes en la mayoría de las células sanas del organismo) producen señales inhibitorias sobre las células NK, por ello los tumores sin HLA-1 (que escapan más fácilmente al control por parte de los linfocitos T) son susceptibles a NK<sup>17</sup>.

La mayoría de las células NK expresan el marcador CD69 activado cuando se produce enfermedad en el intestino grueso. Por el contrario, hay muy poca expresión de CD69 en las células NK en la mucosa colónica normal. Cuando hay una mayor infiltración por células "asesinas" NK, se produce un descenso en el número de ganglios linfáticos regionales metastatizados por la enfermedad tumoral.

El número de células NK juega un papel independiente como factor pronóstico para una mayor supervivencia global y libre de enfermedad. Estas células generalmente se encuentran localizadas a lo largo de los márgenes invasivos del tumor. Estos hallazgos sugieren que las células NK conviven en un microambiente inflamatorio con otro tipo de células de nuestro sistema inmune para hacer frente a la enfermedad neoplásica<sup>18, 19</sup>.

## Inestabilidad de microsatélites e infiltración por TIL

El alto nivel de inestabilidad en los microsatélites de DNA se produce en el cáncer colorrectal hereditario no polipósico y en algunos casos de tumores colorrectales. En ellos, suele haber una infiltración del epitelio tumoral por linfocitos CD3+ y CD8+ que puede ser el resultado de un reconocimiento inmunológico anómalo de proteínas mutadas en la superficie epitelial. Se postula que la inestabilidad de los microsatélites pueda estar asociada con una mayor infiltración de linfocitos T en los tejidos tumorales<sup>20, 21</sup>.

## Células dendríticas y su interrelación con TILs

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno más potentes. Numerosos estudios en la actualidad intentan indagar en su función para poder utilizarlas en el campo de la inmunoterapia activa (vacunas).

En el cáncer colorrectal, las células dendríticas se distribuyen a lo largo de todo el margen invasivo tumoral, una vez que ya han alcanzado la maduración en los folículos linfoides<sup>22</sup>. El valor pronóstico de estas células es muy importante. Dadabayev AR y cols<sup>23</sup> publicaron que células con HLA II están distribuidas por el estroma tumoral y los casos con mayor concentración de células con HLA II se asocian a una supervivencia menor; esto puede ser debido a que las células presentes con HLA II sean todavía inmaduras, ya que las células maduras escasean en la zona tumoral. También, una sobreexpresión de la molécula de adhesión intercelular ICAM-1 por los fibroblastos del estroma tumoral podría interferir en la función de las células dendríticas<sup>24</sup>.

## Conclusiones

Cada vez se tienen mayores y mejores evidencias científicas de la importancia de la respuesta inmune anti-neoplásica en tumores sólidos. En carcinoma colorrectal, numerosos trabajos avalan el valor pronóstico de la densidad de infiltración por TIL, dependiendo del subtipo específico de linfocitos que los componen. Así, la mayor frecuencia de células efectoras TCD8 y NK en los islotes tumorales y en el tejido peritumoral parecen asociarse a una mejor supervivencia a largo plazo.

Pese a que la investigación en este campo prosigue y son muchas las incógnitas por despejar, los datos disponibles avalan la universalización del estudio histopatológico sistemático del microambiente tumoral en relación con la respuesta inmune del huésped en todos los casos de carcinoma colorrectal.

## BIBLIOGRAFÍA

- Boyle P, Ferlay J. Cancer Incidence and Mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16(3):481-488.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(2):74-108.
- Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(4):295-307
- Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, Platell C, Iacopetta B Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Jan 10; 27(2):168-9.
- Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006; 354: 1166-1176
- Langer LF, M Clay TM, Morse MA. Update on anti-CTLA-4 antibodies in clinical trials. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 1245-1256
- Jass JR, Love SB, Northover JMA. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987; 1: 1303-1306
- Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol* 1997; 182: 318-324.
- Harrison JC, Dean PJ, El-Zeky F, Vander Zwaag R. Impact of the Crohn's-like lymphoid reaction on staging of right-sided colon cancer: results of multivariate analysis. *Hum Pathol* 1995; 26: 31-38.
- Pihl E, Nairn RC, Milne BJ, Cuthbertson AM, Hughes ESR, Rollo A. Lymphoid hyperplasia: a major prognostic feature in 519 cases of colorectal carcinoma. *Am J Pathol* 1980; 100: 469-80.
- Menon AG, Janssen-van Rhijn CM, Morreau H, Putter H, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest* 2004; 84: 493-501.
- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H. CD8+ T-cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 3491-4.
- Diederichsen AC, Hjelmberg JB, Christensen PB, Zeuthen J, Fenner C. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 423-8.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Page C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960-4.
- Chiba T, Ohtani H, Mizoi T, Naito Y, Sato E, Nagura H, Ohuchi A, Ohuchi K, Shiiba K, Kurokawa Y, Satomi S. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *Br J Cancer* 2004; 91: 1711-7.
- Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 2654-66.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors. *Immunol Today* 1997; 18:89-95
- Aptsiauri N, Carretero R, García-Lora A, et al. Regressing and progressing metastatic lesions: resistance to immunotherapy is predetermined by irreversible HLA class I antigen alterations. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57:1727-1733
- Tsuruyama T et al. NKT cell infiltration in human colorectal cancer as a prognostic factor. 95th General Meeting of the Japanese Society of Pathology 2006.
- Ishikawa T, Fujita T, Suzuki Y, Okabe S, Yuasa Y, Iwai T, Kawakami Y. Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 2003; 63: 5564-72.
- Michel S, Benner A, Tariverdian M, Wentzensen N, Hoefler P, Pommerenke T, Grabe N, von Knebel Doeberitz M, Kloor M. High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer.* 2008; 99(11):1867-73.
- Suzuki A, Masuda A, Nagata H, Kameoka S, Kikawada Y, Yamakawa M, Kasajima T. Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. *J Pathol* 2002; 196: 37-43.
- Dadabayev AR, Sandel MH, Menon AG, Morreau H, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH, Janssen-van Rhijn C, Ensink NG, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Kuppen PJ. Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 978-986.
- Mizoi T, Ohtani H, Suzuki Y, Shiiba K, Matsuno S, Nagura H. Inter-cellular adhesion molecule-1 expression by macrophages in human gastrointestinal carcinoma: possible roles as host immune/inflammatory reaction. *Pathol Int* 1995; 45: 565-572.